

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. MED. WOLFGANG HERR
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Einfluss von Vitamin D und Vitamin A auf humane T-Zellen

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON
ANDREA KAISER

2017

meinen Eltern

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. MED. WOLFGANG HERR
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

Einfluss von Vitamin D und Vitamin A auf humane T-Zellen

INAUGURAL - DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MEDIZIN

DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

VORGELEGT VON
ANDREA KAISER

2017

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Marina Kreutz

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Sigrid Karrer

Tag der mündlichen Prüfung: 04.08.2017

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	I
Abkürzungsverzeichnis.....	IV
Abbildungsverzeichnis	VII
Tabellenverzeichnis	X
1. Einleitung.....	1
1.1. Das Immunsystem.....	1
1.2. Antigenpräsentierende Zellen und MHCs.....	2
1.2.1. Unreife DCs und deren Reifung zu professionellen APCs	3
1.2.2. Erkennung von Pathogenen durch PRRs	5
1.3. Die T-Zell-vermittelte Immunantwort.....	7
1.3.1. Stimulation naiver T-Lymphozyten durch Dendritische Zellen	8
1.3.2. Effektorfunktionen von T-Lymphozyten.....	10
1.3.3. FOXP3 ⁺ regulatorische T-Zellen	11
1.3.4. CD8αα-T-Zellen.....	14
1.3.5. Memory-T-Lymphozyten	14
1.4. Vitamin D vermittelte Immunmodulation	15
1.4.1. Vitamin D Metabolismus	16
1.4.2. Vitamin D Rezeptor.....	18
1.4.3. Einfluss von Vitamin D auf dendritische Zellen und T-Lymphozyten	19
1.5. Vitamin A vermittelte Immunmodulation	20
1.5.1. Vitamin A Metabolismus	20
1.5.2. Vitamin-A-Rezeptor	22
1.5.3. Einfluss von Vitamin A auf dendritische Zellen und T-Lymphozyten	22
1.6. Die Graft-versus-Host-Disease (GvHD)	24
1.6.1. Klinik der GvHD	24
1.6.2. Pathogenese der akuten GvHD	25
1.6.3. Rolle dendritischer Zellen in der GvHD und deren Modulation durch TLR-, NLR- sowie TGFβ-Signalwege.....	26
1.6.4. T-Lymphozyten als Effektorzellen der GvHD und des GvL-Effekts	28
1.6.5. Einfluss von Vitamin D und Vitamin A auf die GvHD	29

2. Zielsetzung	32
3. Material	33
3.1. Geräte.....	33
3.2. Verbrauchsmaterialien.....	33
3.3. Chemikalien, Flüssigkeiten, Farbstoffe	34
3.4. Kits	35
3.5. Medien, Puffer, Lösungen.....	35
3.6. Spenderzellen.....	36
3.7. Antikörper	36
3.7.1. Spezifische Antikörper	36
3.7.2. Isotypen	37
3.8. Software und Datenbanken	38
4. Methoden	39
4.1. Zählen von Zellen	39
4.2. Einfrieren von Lymphozyten	39
4.3. Auftauen von Lymphozyten	39
4.4. Leukapherese – Gewinnung mononukleärer Zellen	40
4.5. Dichtegradientenzentrifugation.....	40
4.6. Gegenstrom-Elutriation – Auftrennung der mononukleären Zellen	41
4.7. Generierung dendritischer Zellen und TGF β -dendritischer Zellen	43
4.8. MLR (Mixed Leukocyte Reaction)	43
4.9. Bestimmung der Zellzahl mittels CASY®	45
4.10. Proliferationsmessung	46
4.11. Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern.....	47
4.11.1. Oberflächenfärbung.....	47
4.11.2. Intrazellularfärbung	47
4.12. Durchflusszytometrie	48
4.13. Bestimmung ALDH-Aktivität Dendritischer Zellen mittels ALDEFLUOR™ assay.....	49
4.14. Statistik.....	52
5. Ergebnisse	53
5.1. Lymphozyten-Zellzahl nach der MLR	53
5.2. Proliferation der Lymphozyten in der MLR.....	55
5.3. Oberflächeneigenschaften der T-Lymphozyten.....	59

5.4. IL-2- und IFN γ -Gehalt der T-Zellen	61
5.5. Anteil FOXP3-positiver T-Zellen	63
5.6. CD8 $\alpha\alpha$ -positive T-Zellen.....	66
5.7. CD62L-negative T-Zellen	67
5.8. Aktivität der ALDH in Dendritischen Zellen.....	71
6. Diskussion	74
6.1. Einfluss der bakteriellen Stimuli LPS und MDP auf dendritische Zellen und die T-Zell-vermittelte Immunantwort	74
6.2. TGF β -DCs und die T-Zell-vermittelte Immunantwort	80
6.3. Einfluss der Vitamine D und A auf dendritische Zellen und die T-Zell-vermittelte Immunantwort.....	83
6.3.1. 25VD und Retinal hemmen die klonale Expansion der T-Lymphozyten im Rahmen allogener Immunantworten	85
6.3.2. 25VD und Retinal beeinflussen die T-Lymphozyten-Polarisation im Rahmen allogener Immunantworten.....	89
6.3.3. Retinal vermindert die CD62L-Expression von CD4 $^{+}$ und CD8 $^{+}$ T-Lymphozyten	
96	
6.4. Dendritische Zellen setzen Retinal in Retinsäure um	98
6.4.1. iDC produzieren RA, IFN γ erhöht die Produktion.....	98
6.4.2. TGF β steigert die Fähigkeit der DCs RA zu produzieren	100
7. Zusammenfassung.....	102
8. Literaturverzeichnis.....	106
9. Anhang	133
Danksagung	138
Eidesstattliche Erklärung.....	140

Abkürzungsverzeichnis

1,25VD	Calcitriol (1,25(OH) ₂ D ₃ , 1,25(OH) ₂ Vitamin D ₃ , 1,25-Dihydroxy-VitaminD ₃)
25VD	Calcidiol (25(OH)D ₃ , 25(OH)Vitamin D ₃ , 25-Hydroxy-Vitamin-D ₃)
9cisRA	9-cis-Retinsäure
ABC-Transporter	„ATP binding cassette“-Transporter, Familie von Transmembranproteinen, die energieabhängig Substrate über die Zellmembran transportieren
ADH	Alkohol-Dehydrogenase
aGvHD	Akute GvHD („graft versus host disease“)
AK	Antikörper
ALDH	Aldehyd Dehydrogenase
APC	Antigenpräsentierende Zelle
APC(-Cy7)	Allophycocyanin (Farbstoff für Antikörper) bzw. Tandemfarbstoffkonjugat für AK aus APC und dem Cyaninfarbstoff 7
aSZT	allogene Stammzelltransplantation
ATP	Adenosintriphosphat
BAA	BODIPY™-Aminoacetat – Produkt des ALDEFLUOR™ assay
BAAA	BODIPY™-Aminoacetaldehyd – aktiviertes Substrat des ALDEFLUOR™ assay
CCR7	Chemokinrezeptor 7 (vom CC-Typ)
CD	„Cluster of Differentiation“
CED	Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen (Morbus Crohn, Colitis Ulcerosa)
cGvHD	Chronische GvHD („graft versus host disease“)
cpm	„Counts“ pro Minute (Zerfälle pro Minute)
CSF	Kolonie-stimulierender Faktor
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten
DAMP	Schädigungs-assoziiertes molekulares Muster („damage-associated molecular pattern“)
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
DC	Dendritische Zelle
DEAB	Diethylaminobenzaldehyd
DMSO	Dimethylsulphoxid
FACS	„Fluorescence Activated Cell Sorting“
FCS	Fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat (Farbstoffkonjugat für AK)
FOXP3	„Forkhead Box P3“, Transkriptionsfaktor regulatorischer Zellen
FSC	„forward scatter“, Vorwärtsstreulicht in der Durchflusszytometrie, abhängig von der Größe der untersuchten Zellen
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten-Kolonie stimulierender Faktor
GvHD	„Graft versus Host Disease“
GvL	„Graft versus Leukemia“

GvT	„Graft versus Tumor“
HLA	Humanes Leukozytenantigen
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
id.	idem, hier „in derselben Konzentration“/„in denselben Konzentrationen“
iDC	Unreife Dendritische Zelle („immature dendritic cell“), in dieser Arbeit mittels IL-4 und GM-CSF aus Monozyten gesunder Spender differenziert
IEL	Intraepitheliale Lymphozyten
IFNy	Interferon γ
IL	Interleukin
IPEX	Immundysregulations-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-chromosomal-Syndrom
LPS	Lipopolysaccharid
MALT	Mucosaassoziiertes lymphatisches Gewebe
mDC	Reife dendritische Zelle („mature dendritic cell“)
MDP	Muramyl-Dipeptid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex („Major Histocompatibility Complex“)
MLR	Gemischte Lymphozytenreaktion („Mixed Lymphocyte Reaction“)
MNC	Mononukleäre Zelle
MO	Monozyt
MS	Multiple Sklerose
NaCl	Natriumchlorid
NLR	NOD-ähnlicher Rezeptor („NOD-like receptor“)
NOD	Nukleotidbindende-Oligomerisationsdomäne
NOD2	NOD-enthaltender Rezeptor 2
PD-1	Rezeptor auf T-Lymphozyten „programmed-death-1“
PD-L1	Ligand des PD-1 „programmed-death-ligand 1“
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster („pathogen-associated molecular pattern“)
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung („Phosphate Buffered Solution“)
PE	Phycerythrin (Farbstoffkonjugat für AK)
PE-Cy5	Tandemfarbstoffkonjugat für AK aus Phycoerythrin und dem Cyaninfarbstoff 5
PE-Cy7	Tandemfarbstoffkonjugat für AK aus Phycoerythrin und dem Cyaninfarbstoff 7
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol-Myristat-Aacetat
PRR	Pathogenerkennungsrezeptor („pathogen recognition receptor“)
RA	Retinsäure
RALDH	Retinaldehyddehyrogenase
RAR	Retinsäurerezeptor
RARE	„Retinoic Acid Response Elements“

Abkürzungsverzeichnis

rpm	„Rotations per minute“
RPMI	RPMI 1640 (Zellkulturmedium, Roswell Park Memorial Institute medium)
RT	Raumtemperatur
RXR	Retinoid-X-Rezeptor
SEM	Standardabweichung des Mittelwerts („standard error of the mean“)
SNP	Einzelnukleotidpolymorphismen („single nucleotide polymorphism“)
SSC	„sideward scatter“, Seitwärtsstreulicht in der Durchfluszytometrie, u.a. abhängig von der Granularität der untersuchten Zellen
T _{CM}	Zentrale Memory T-Zelle („central memory“)
TCR	T-Zellrezeptor („T-cell receptor“)
T _{Eff}	Effektor-T-Zelle
T _{EM}	Effektor Memory T-Zelle
TGFβ	Transformierender Wachstumsfaktor β („transforming growth factor β“)
TGFβ-DC	„TGFβ Dendritische Zelle“, in dieser Arbeit mittels IL-4, GM-CSF und TGFβ aus Monozyten gesunder Spender differenziert
T _{H1} , T _{H17}	T-Helper-1-Zelle, T-Helper-2-Zelle, T-Helper-17-Zelle
T-L	T-Lymphozyt
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor („Toll-like-receptor“)
T _N	Naive T-Zelle
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
V450	Pacific Blue®, 6,8,Difluoro-7-Hydroxycoumarin (Farbstoffkonjugat für AK)
VDR	Vitamin D Rezeptor
VDRE	„Vitamin D Response Elements“

Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1-1: Reifung dendritischer Zellen (DC)</i>	4
<i>Abbildung 1-2: PRR-Signalwege</i>	5
<i>Abbildung 1-3: Aufbau des $\alpha\beta$TCR.....</i>	7
<i>Abbildung 1-4: Stimulation naiver T-Lymphozyten durch DCs</i>	8
<i>Abbildung 1-5: TGFβ-Sekretion und –Effektorfunktionen</i>	13
<i>Abbildung 1-6: Zentrale- und Effektor-Memory-T-Zellen</i>	15
<i>Abbildung 1-7: Vitamin D Metabolismus</i>	17
<i>Abbildung 1-8: Einfluss von Vitamin D auf DCs und T-Lymphozyten</i>	19
<i>Abbildung 1-9: Vitamin A Metabolismus</i>	21
<i>Abbildung 1-10: Pathogenese der GvHD.....</i>	26
<i>Abbildung 1-11: Modulation der GvHD.....</i>	31
<i>Abbildung 4-1: Dichtegradientenzentrifugation</i>	40
<i>Abbildung 4-2: Elutriation: Rotor</i>	41
<i>Abbildung 4-3: Prinzip der Elutriation</i>	41
<i>Abbildung 4-4: MLR.....</i>	43
<i>Abbildung 4-5: Übersicht über die MLR-Ansätze und Folgeexperimente</i>	45
<i>Abbildung 4-6: Messvorgang und Differenzierung vitaler und toter Zellen im CASY®Zellzähl- und Analysegerät</i>	46
<i>Abbildung 4-7: „Gating“-Strategie auf CD4$^{+}$ und CD8$^{+}$T-Lymphozyten</i>	49
<i>Abbildung 4-8: Versuchsaufbau der ALDEFLUOR™ assay Experimente</i>	50
<i>Abbildung 4-9: „Gating“-Strategie in den ALDEFLUOR-Experimenten</i>	51
<i>Abbildung 5-1: Verringerung der Zellzahl nach der MLR durch 25VD, Retinal und den Einsatz von TGFβ-DC.....</i>	54
<i>Abbildung 5-2: Hemmung der Proliferation in der MLR durch die Zugabe von 25VD und Retinal</i>	55
<i>Abbildung 5-3: Von der DC-Zellzahl unabhängige Hemmung der allogenen T-Zell-Proliferation durch die Zugabe von 25VD und Retinal.....</i>	56
<i>Abbildung 5-4: Verminderte Proliferation in der MLR mit TGFβ-DCs</i>	58

Abbildung 5-5: Einfluss von LPS und MDP auf den Prozentsatz von CD25 ⁺ CD4 ⁺ oder CD25 ⁺ CD8 ⁺ T-Lymphozyten	59
Abbildung 5-6: Einfluss von LPS, MDP, 25VD und Retinal auf die Expression des IL-2 Rezeptors in CD4 ⁺ T-Lymphozyten in der MLR.....	60
Abbildung 5-7: Der Zusatz von LPS bewirkt eine gesteigerte IFNy-Produktion durch T-Lymphozyten in der MLR.....	61
Abbildung 5-8: Verminderte IFNy-Produktion durch T-Lymphozyten unter dem Einfluss von 25VD und 25VD+Retinal.....	62
Abbildung 5-9: Einfluss von 25VD, Retinal und TGF β auf den Anteil FOXP3 ⁺ innerhalb CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten in der MLR.....	64
Abbildung 5-10: Einfluss von 25VD, Retinal und TGF β auf den Anteil FOXP3 ⁺ an den CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten in der MLR.....	65
Abbildung 5-11: Anteil CD8 $\alpha\alpha^+$ Zellen in $\alpha\beta$ TCR ⁺ CD8 α^+ T-Lymphozyten nach MLRs mit LPS....	66
Abbildung 5-12: Anteil CD8 $\alpha\alpha^+$ Zellen in TCR $\alpha\beta^+$ CD8 α^+ T-Lymphozyten nach MLRs mit LPS+MDP.....	67
Abbildung 5-13: Retinal bewirkt die verminderte Expression von CD62L auf CD4 ⁺ T-Lymphozyten in der MLR.....	68
Abbildung 5-14: Retinal bewirkt die verminderte Expression von CD62L auf CD8 ⁺ T-Lymphozyten in der MLR.....	69
Abbildung 5-15: Retinal bewirkt die verminderte Expression von CD62L auf CD4 ⁺ T-Lymphozyten in der MLR.....	70
Abbildung 5-16: ALDEFLUOR-positive DC und TGF β -DC nach zwei Tagen Stimulation mit LPS, IFNy oder TGF β	71
Abbildung 5-17: ALDEFLUOR-positive DC nach zwei, drei und vier Tagen Stimulation mit IFNy oder TGF β	72
Abbildung 6-1: Einfluss der bakteriellen Stimuli LPS und MDP auf DCs und die T-Zell-vermittelte Immunantwort	77
Abbildung 6-2: Einfluss von TGF β -DCs auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort	81
Abbildung 6-3: Einfluss der Vitamine D und A auf DCs und die T-zell-vermittelte Immunantwort	84
Abbildung 7-1: Einfluss von TGF β -DCs sowie der Vitamine D und A auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort	105
Abbildung 9-1: Lymphozyten-Zellzahl nach vier Tagen MLR.....	133
Abbildung 9-2: Einfluss von 25VD und Retinal auf die Proliferation der Lymphozyten in der MLR mit MDP oder ohne bakteriellen Stimulus	134

<i>Abbildung 9-3: Einfluss von LPS und MDP auf den Anteil FOXP3⁺ an den CD4⁺CD25⁺T-Lymphozyten in der MLR.....</i>	135
<i>Abbildung 9-4: Einfluss von 25VD, 1,25VD, Retinal und 9cisRA auf die Expression von CD62L auf CD4⁺T-Lymphozyten in der MLR</i>	136
<i>Abbildung 9-5: Einfluss von 25VD, 1,25VD, Retinal und 9cisRA auf die Expression von CD62L auf CD8⁺T-Lymphozyten in der MLR</i>	137

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1-1: T-Zell-Subgruppen und deren Funktion	10
Tabelle 1-2: 1,25VD wird insbesondere durch mDC gebildet. Effektor-T-Lymphozyten und iDC weisen eine starke VDR-Expression auf	18
Tabelle 1-3: Immunmodulatorische Eigenschaften von Retinsäure unter verschiedenen Umgebungsbedingungen	23
Tabelle 3-1: Geräte.....	33
Tabelle 3-2: Verbrauchsmaterialien	34
Tabelle 3-3: Chemikalien, Farbstoffe, Medien	35
Tabelle 3-4: Kits	35
Tabelle 3-5: Medien, Puffer, Lösungen.....	35
Tabelle 3-6: Spenderzellen.....	36
Tabelle 3-7: Antikörper	37
Tabelle 3-8: Isotypen	37
Tabelle 3-9: Software	38
Tabelle 4-1: Elutriation: Fraktionen, Volumen, Flussrate	42
Tabelle 5-1: Unter LPS sinkt der Anteil FOXP3 ⁺ an den CD4 ⁺ CD25 ⁺ T-Lymphozyten in der MLR	63
Tabelle 6-1: Zusammenfassung der Effekte von LPS und MDP auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort	79
Tabelle 6-2: Zusammenfassung der Effekte von TGFβ-DCs auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort	83
Tabelle 6-3: 25VD, Retinal und der Einsatz von TGFβ-DCs hemmen die klonale T-Lymphozyten-Expansion in MLRs.....	89
Tabelle 6-4: 25VD und Retinal beeinflussen die T-Lymphozyten-Polarisation	95
Tabelle 6-5: Retinal vermehrt den Anteil CD62L ⁻ T-Lymphozyten	97
Tabelle 6-6: DCs und TGFβ-DCs setzen Retinal in RA um, IFNγ und TGFβ steigern die ALDH-Aktivität.....	101
Tabelle 7-1: Einfluss von 25VD und Retinal auf die allo-T-Lymphozyten Antwort in MLRs mit DCs und TGFβ-DCs.....	103

1. Einleitung

1.1. Das Immunsystem

Mikroorganismen wie Bakterien, Viren, Pilze und Parasiten, sowie die Entartung und unkontrollierte Vermehrung körpereigener Zellen stellen eine ständige Bedrohung für den Menschen da. Eine ganze Reihe verschiedener Moleküle, Zellen, Gewebe und Organe, die man zusammen als Immunsystem bezeichnet, sind darauf spezialisiert, diese Gefahr abzuwenden [1, 2].

Den ersten Schutz gegen das Eindringen von Pathogenen bieten die chemisch-physikalischen Barrieren der Haut und Schleimhäute [3]. Auch der Besiedelung des menschlichen Körpers mit etwa 100 Billionen Mikroorganismen muss eine bedeutende Schutzfunktion zugesprochen werden [4, 5].

Gängige Einteilungsschemata für das Immunsystem im engeren Sinne unterscheiden angeborenes und erworbene Immunsystem, mit jeweils humoralen und zellulären Anteilen. Daneben können primär lymphatische von sekundär lymphatischen Organen und Geweben abgegrenzt werden. Knochenmark und Thymus stellen, als Entstehungs- und Prägungsort der Immunzellen, die primär lymphatischen Organe da. Zu den Sekundären zählen dagegen die Milz, Lymphknoten und das Mucosa-assoziierte lymphatische Gewebe (MALT). Hier sind optimale Bedingungen für den Kontakt der Immunzellen mit Pathogenen, wie auch für den Kontakt der Zellen untereinander und damit für deren Aktivierung und Differenzierung gegeben [1–3].

Das angeborene oder auch unspezifische Immunsystem ist von Geburt an vorhanden und steht bei Infektion als erste Verteidigungslinie unmittelbar zur Verfügung. Es differenziert nur in sehr beschränktem Ausmaß zwischen einzelnen Pathogenen. Die wichtigsten Zellen sind hier Granulozyten (neutrophile, basophile, eosinophile), Monozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen (DCs), Mastzellen und NK-Zellen. DCs sind phagozytotisch aktiv und spielen an der Schnittstelle zwischen angeborener und erworbener Immunität eine zentrale Rolle (siehe Kapitel 1.2.) [3]. Zum humoralen Anteil des angeborenen Immunsystems gehören das Komplementsystem, Zytokine, Lysozym und Defensine. Diese löslichen

Substanzen aktivieren entweder andere Immunzellen oder bewirken selbst die Abtötung von Erregern [1–3].

Als lösliche Anteile des adaptiven, spezifischen oder auch erworbenen Immunsystems sind vor allem Immunglobuline (Antikörper) sowie verschiedene Interleukine und Chemokine zu nennen [1, 2]. Den zellulären Anteil stellen hier B- und T-Lymphozyten. B-Lymphozyten bekämpfen Pathogene indem sie zu antikörperproduzierenden Plasmazellen differenzieren. T-Lymphozyten sind in der Lage veränderte Zellen abzutöten oder die Funktion anderer Immunzellen durch Zytokine zu modulieren, wodurch sie die resultierende Immunantwort entscheidend beeinflussen (siehe Kapitel 1.3.) [3].

Adaptive Immunantworten zeichnen sich durch eine hohe Spezifität gegenüber den Zielstrukturen aus: jede T-Zelle erkennt über ihren T-Zell-Rezeptor (TCR) nur ein bestimmtes Antigen. Gleches gilt für B-Zellen und Antikörper. Durch somatische Rekombination von Gensegmenten („rearrangement“) wird die Entstehung einer ungeheuren Vielzahl verschiedener spezifischer Rezeptoren möglich (Diversität). Verglichen mit dieser Vielfalt an Rezeptormolekülen trifft der Mensch in seiner Umwelt nur auf eine geringe Anzahl an (pathogenen) Antigenen. So ist sichergestellt, dass es gegen jeden Erreger passende Lymphozyten im Körper gibt. Da die Spezifität der Lymphozyten durch das Zufallsprinzip der somatischen Rekombination entsteht, müssen autoreaktive Zellen in Prägungsprozessen im Knochenmark (B-Lymphozyten) bzw. Thymus (T-Lymphozyten) eliminiert oder durch Mechanismen der peripheren Toleranz im Zaum gehalten werden [1–3].

1.2. Antigenpräsentierende Zellen und MHCs

Um T-Zell-vermittelte Immunantworten in Gang zu setzen muss es zunächst zur Aktivierung naiver T-Lymphozyten kommen (siehe Kapitel 1.3.1.). Hierzu ist der Kontakt der T-Zell-Rezeptoren mit sogenannten MHCs („Major Histocompatibility Complexes“), die beim Menschen auch als HLAs (Humane Leukozytenantigene) bezeichnet werden, unabdingbar. MHCs sind Zelloberflächenproteine, die sich interindividuell stark unterscheiden. Sie dienen der Präsentation kleiner Erregerfragmente oder zelleigener Eiweißbruchstücke. Es gibt zwei verschiedene Arten der MHCs, die jeweils von spezialisierten T-Lymphozyten erkannt werden. Klasse I MHCs, die auf allen kernhaltigen Zellen vorkommen, präsentieren zelleigene oder im Zytoplasma der Zelle vorhandene Proteinfragmente. Untypische Fragmente finden

sich bei virusinfizierten oder entarteten Zellen. Dagegen werden Klasse II MHCs nur von speziellen sogenannten antigenpräsentierenden Zellen (APCs) exprimiert. Drei Zellarten können als APC fungieren: DCs, Makrophagen und B-Lymphozyten. Sie sind in der Lage Erreger zu phagozytieren und zu zersetzen. Dabei entstehen kurze Peptidfragmente mit denen die Klasse II MHCs beladen werden [1–3].

1.2.1. Unreife DCs und deren Reifung zu professionellen APCs

Für die T-Zell-Aktivierung stellen DCs die potentesten und damit wichtigsten APCs dar. DCs stammen von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab, die unter anderem über Monozytenvorstufen zu DCs differenzieren [1]. In vitro werden DCs aus Monozyten durch Stimulation mit GM-CSF und IL-4 gewonnen [6].

Aus dem Blut wandern die noch unreifen DCs (iDCs „immature dendritic cells“) in verschiedenste Gewebe, wie Haut, Schleimhäute und Organparenchym [7]. Dort bilden sie mobile Zytoplasmatafortsätze aus, was ihnen die typische sternförmige Gestalt verleiht und namensgebend¹ war. Als „sentinel“² Zellen sind iDCs darauf spezialisiert ihre Umgebung ständig auf eindringende Erreger zu untersuchen und anschließend zu phagozytieren [8]. Die Pathogene induzieren die Aktivierung und Reifung der DCs (siehe Kapitel 1.2.2.) [2]. Dabei verlieren die DCs die ausgeprägte Fähigkeit zur Phagozytose, stattdessen erscheinen innerhalb kürzester Zeit zahlreiche peptidbeladene MHC-II-Komplexe und costimulatorische Moleküle auf der DC-Oberfläche. Aufgrund der Fähigkeit naive T-Lymphozyten mittels Antigen-MHC-Komplex und Costimuli zu aktivieren spricht man nun von mDCs („mature dendritic cells“, reife DCs). Durch die Aktivierung sezernieren die mDCs außerdem proinflammatorische Zytokine. Daneben verändert sich die Ausstattung mit Adhäsionsmolekülen und Chemokinrezeptoren, weshalb eine Migration der mDCs entlang der Lymphbahnen in sekundär lymphatische Organe erfolgt. Dort treten sie mit einer Vielzahl naiver T-Lymphozyten in Kontakt [8–11].

¹ dendritisch, griech. „verästelt“, „verzweigt“

² sentinel, engl. „Wachposten“

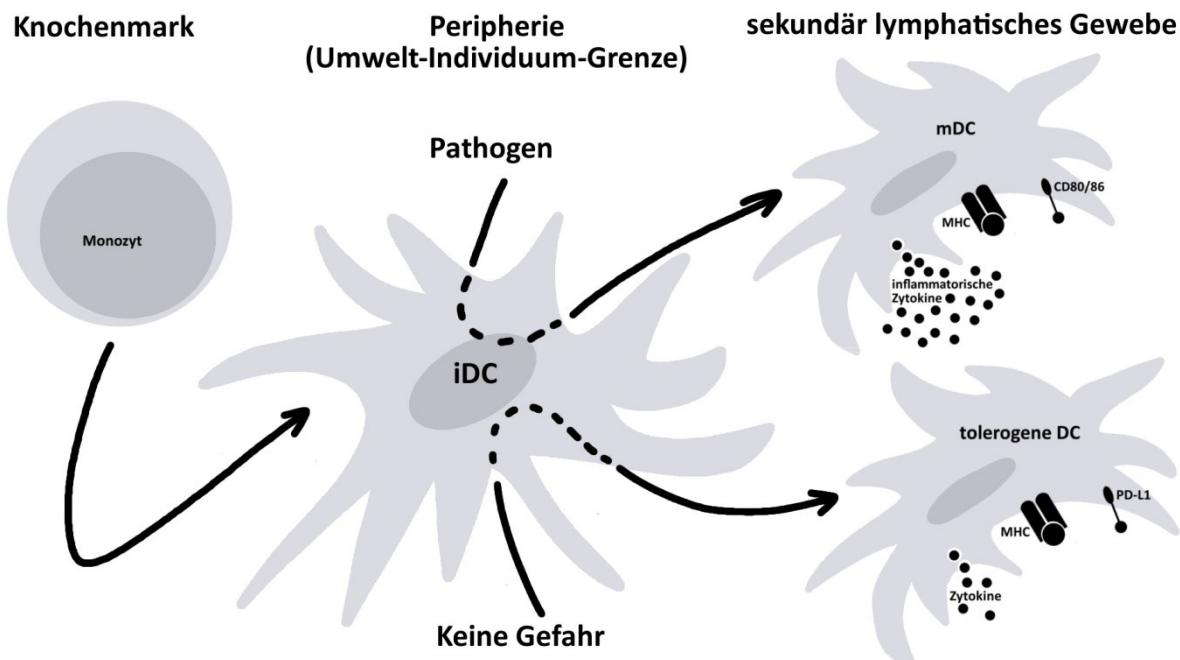


Abbildung 1-1: Reifung dendritischer Zellen (DC)

DCs stammen von hämatopoietischen Stammzellen des Knochenmarks ab, die über myeloide Vorläuferzellen und Monozyten (links) zu unreifen DCs (iDCs, Mitte) differenzieren und über die Blutbahn in periphere Gewebe gelangen. Dort suchen die iDCs die Umgebung ständig nach Pathogenen und Gefahrensignalen ab. Nach Antigenaufnahme kommt es zur Reifung und Migration der DCs in sekundär lymphatische Organe. Unter der Einwirkung von Pathogenen oder Gefahrensignalen entstehen dabei mDCs (rechts oben), die zahlreiche MHC-Komplexe und costimulatorische Moleküle (z.B. CD80/86) auf ihrer Oberfläche tragen und proinflammatorische Zytokine produzieren. Sie sind potente APCs. Werden keine Gefahrensignale detektiert, können tolerogene DCs (rechts unten) entstehen, die kaum Zytokine produzieren und weniger costimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen. Stattdessen exprimieren sie coinhibitorische Moleküle wie PD-L1. Abbildung frei nach [1, 2, 7]

DCs sind jedoch nicht nur an der Induktion von Immunantworten beteiligt. Sie spielen auch in der Vermittlung von Toleranz eine entscheidende Rolle. Im „steady-state“, das heißt ohne den Einfluss von Pathogenen und körpereigenen molekularen Warnsignalen (PAMPs/DAMPs, „pathogen/danger associated molecular patterns“), nehmen iDCs ständig körpereigene Antigene auf und präsentieren sie an T-Lymphozyten. Diese sogenannten tolerogenen DCs exprimieren kaum costimulatorische Moleküle. Stattdessen vermitteln sie mittels Oberflächenproteinen inhibitorische Signale und produzieren toleranzvermittelnde Zytokine. Neben der Abwesenheit von Reifungstimuli kann auch der Einfluss regulatorischer T-Zellen (T_{reg}) oder immunmodulatorischer Zytokine (IL-10, TGF β) die Entstehung tolerogener DCs bedingen [1, 9, 10, 12–15]. In vitro sollen DCs beispielsweise unter dem Einfluss von Retinsäure oder TGF β tolerogene Eigenschaften entwickeln [16, 17].

1.2.2. Erkennung von Pathogenen durch PRRs

DCs und andere Zellen, exprimieren zur Erkennung von Pathogenen verschiedene Mustererkennungsrezeptoren (PRRs, „pathogen recognition receptors“). Als Teil des angeborenen Immunsystems sind PRRs in der Keimbahn kodiert und besitzen deshalb nur begrenzte Diversität³. Sie sind spezifisch für Strukturen, die für Erreger überlebenswichtig sind, aber im menschlichen Organismus nicht vorkommen (PAMPs) oder für Moleküle, die Gefahr signalisieren (DAMPs). Zu den bedeutendsten PRRs gehören unter anderem Toll-like-Rezeptoren (TLRs) und NOD⁴-like-Rezeptoren (NLRs) [1, 18–20].

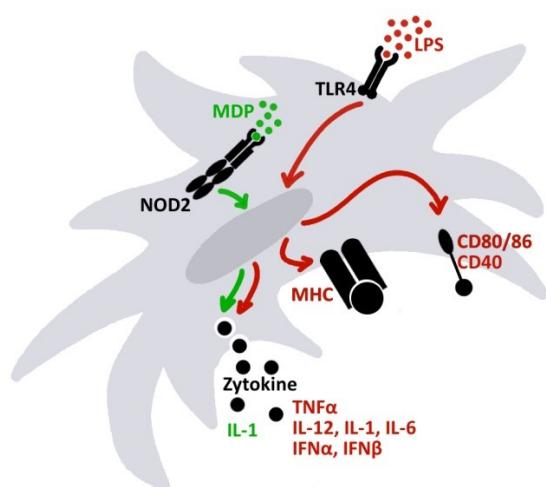


Abbildung 1-2: PRR-Signalwege

Die Erkennung von Gefahrenstoffen und Pathogenen erfolgt im angeborenen Immunsystem durch die hoch konservierten PRRs. DCs exprimieren unter anderem die hier dargestellten PRRs TLR4 und NOD2. TLR4 detektiert LPS, NOD2 MDP. Über komplexe, sich teilweise überschneidende Signalwege bewirken die bakteriellen Stimuli in DCs einerseits die Produktion inflammatorischer Zytokine, wie IL-1, IL-12 und TNF α . LPS induziert in DCs zudem die Reifung, weshalb an der DC-Oberfläche vermehrt MHC-Ag-Komplexe sowie costimulatorische Moleküle (CD80/86, CD40) erscheinen. Die Signalwege sind hier stark vereinfacht dargestellt und jeweils farblich markiert (rot: LPS-, grün: MDP-Signalweg). Abbildung frei nach [1, 20, 21]

Toll-like-Rezeptoren

Es gibt verschiedene humane TLRs, die unterschiedliche (mikrobielle) Stimuli erkennen [19, 22]. Die meisten TLRs sind auf der Plasmamembran lokalisiert und erkennen als PAMPs vor allem Oberflächenstrukturen von Bakterien, Pilzen und Parasiten [18–20]. Die Bindung der PAMPs an die Transmembranrezeptoren leitet die Signalübertragung über komplex regulierte Signalwege ein, was unter anderem eine Induktion proinflammatorischer Zytokine bewirkt [1, 18–20, 22, 23].

LPS (Lipopolysaccharid) wird als Bestandteil der äußeren Wand gramnegativer Bakterien bei deren Zerfall freigesetzt und ist dann als Endotoxin in der Lage stärkste Immunantworten bis hin zum Kreislaufversagen durch septischen Schock auszulösen. Die Erkennung bereits

³ Ca. 1000 verschiedene PAMPs können durch PRRs erkannt werden. Das adaptive Immunsystem kann dagegen ca. 10^7 verschiedene Antigene unterscheiden.

⁴ NOD „nukleotidbindende Oligomerisierungsdomäne“

geringer Mengen an LPS befähigt das Immunsystem jedoch auch adäquat auf Infektionen mit gramnegativen Bakterien zu reagieren [24–27].

Die TLR-4-Aktivierung durch LPS bewirkt die Reifung der DCs und beeinflusst durch die induzierten Zytokine die T-Zell-Polarisation (siehe Abbildung 1-2 und Kapitel 1.3.1.) [18, 21]. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass unter gemeinsamen Einfluss von LPS und Vitamin D in DCs ein deutlich verändertes Zytokinrepertoire induziert und deren Reifung verlangsamt wird [28, 29].

NOD-like-Rezeptoren

NOD-like-Rezeptoren (NLRs) ermöglichen als zytosolische PRRs die Erkennung intrazellulärer Erregerbestandteile und Gefahrensignale[23, 30–32]. Ein wichtiger bereits genauer charakterisierter Vertreter ist NOD2, der MDP (Muramyl-Dipeptid) erkennt. MDP ist ein Abbauprodukt des Peptidoglykans (Mureins), welches Bestandteil der Zellwand grampositiver, wie auch gramnegativer Bakterien ist [23, 30].

Auch die Bindung von MDP an seinen Rezeptor kann die Bildung proinflammatorischer Zytokine induzieren (siehe Abbildung 1-2) [20, 31, 32]. Diese beeinflussen die T-Zell-Polarisation (siehe Kapitel 1.3.1.) und sind an der Ausbildung lokaler und systemischer entzündlicher Reaktionen beteiligt, beispielsweise durch die Induktion von Fieber oder der Produktion von Akut-Phase-Proteinen [1].

NLRs ergänzen die TLRs in ihrer Funktion auf eingedrungene Erreger angemessen zu reagieren. Sie können synergistisch mit TLRs wirken und die Immunantwort verstärken, kooperativ mit TLRs wirken indem sie Erreger detektieren, die der Erkennung durch TLRs entgangen sind und sie können immunregulatorisch wirken da ihre Aktivierung zum Teil notwendig ist um die volle Wirkung eines TLR-Signals zu ermöglichen [31].

NLRs spielen auch bei der Aufrechterhaltung der Immunhomöostase eine wichtige Rolle, was sich in der Assoziation verschiedener entzündlicher und maligner Erkrankungen mit einer Dysregulation der NLR-Funktion durch SNPs in NOD-Genen zeigt (siehe Kapitel 1.6.3.) [31].

1.3. Die T-Zell-vermittelte Immunantwort

Als zellulärer Teil der adaptiven Immunantwort spielen T-Zellen eine essentielle Rolle in der Bekämpfung von Erregern und entarteten Zellen. Sie sind jedoch auch an der Pathogenese von Transplantatabstoßungen, Überempfindlichkeitsreaktionen, chronisch entzündlichen Erkrankungen und weiteren immunologischen Erkrankungen beteiligt [1–3, 7].

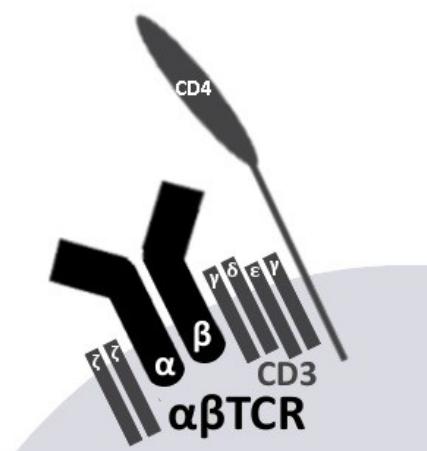


Abbildung 1-3: Aufbau des $\alpha\beta$ TCR

Der $\alpha\beta$ -T-Zell-Rezeptor setzt sich zusammen aus je einer α - und einer β -Kette, die den variablen Antigenerkennungsrezeptor bilden, dem assoziierten konservierten CD3-Komplex (bestehend aus γ -, δ -, ϵ -, und ζ -Ketten), der die Signalübertragung einleitet, sowie einem Co-Rezeptor CD4 oder CD8 (hier als CD4 dargestellt), der an der MHC-Bindung und damit Antigenerkennung beteiligt ist und nach dem T-Zellen in $CD4^+$ T-Helfer-Zellen und $CD8^+$ CTL eingeteilt werden. $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptoren sind ähnlich aufgebaut, statt der α - und β -Ketten finden sich hier je eine γ - und eine δ -Kette. Sie sollen eine geringere Diversität aufweisen. Abbildung nach [1, 7], modifiziert.

T-Lymphozyten tragen auf ihrer Oberfläche antigenspezifische T-Zell-Rezeptoren, die sich i.d.R. aus einer α -Kette, einer β -Kette, dem assoziierten CD3-Komplex und einem Co-Rezeptor zusammensetzen (siehe Abbildung 1-3). Nach Funktion und Co-Rezeptor teilt man T-Lymphozyten in $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen ein. $CD4^+$ T-Lymphozyten aktivieren durch Zytokinausschüttung weitere Immunzellen und werden daher als T-Helfer-Zellen (T_H) bezeichnet. $CD8^+$ T-Lymphozyten töten infizierte oder veränderte Zellen ab und werden deshalb zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) genannt. Daneben gibt es geringere Anzahlen weiterer T-Zell-Subgruppen, darunter die $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten, die, soweit bekannt, gerade in epithelialen Barrieren wie der Darmschleimhaut, Immunantworten gegen häufige Erreger auslösen. Insgesamt handelt es sich bei $\gamma\delta$ -T-Lymphozyten um eine wenig erforschte Zellpopulation [1–3, 7].

Alle T-Lymphozyten stammen von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab, die über lymphoide Vorläuferzellen im Thymus zu naiven T-Lymphozyten differenzieren. Die naiven, d.h. antigenunerfahrenen T-Lymphozyten rezirkulieren durch die sekundär lymphatischen Gewebe um mit einer Vielzahl dendritischer Zellen in Kontakt zu treten. Dadurch wird die Wahrscheinlichkeit maximiert auf eine DC zu treffen die das passende Antigen präsentiert [1, 3, 7].

1.3.1. Stimulation naiver T-Lymphozyten durch Dendritische Zellen

Die wesentlichen Ziele der Aktivierung antigenspezifischer naiver T-Lymphozyten sind die Generierung einer großen Anzahl antigenerfahrener T-Lymphozyten aus einer geringen Anzahl naiver T-Lymphozyten (klonale Expansion) und die Differenzierung zu Effektor-T-Zellen (siehe Kapitel 1.3.2.) sowie langlebigen Gedächtnis-T-Zellen (siehe Kapitel 1.3.4.) [1]. Voraussetzungen für die Aktivierung und Differenzierung naiver T-Lymphozyten sind die Erkennung des passenden Antigens (**Signal 1**), ausreichende Costimulation (**Signal 2**) und der Einfluss von Zytokinen (**Signal 3**) [1, 33–37].

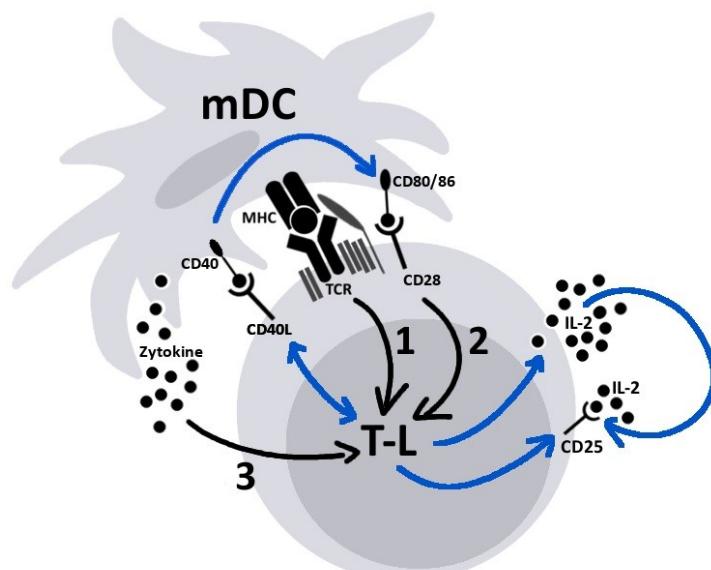


Abbildung 1-4: Stimulation naiver T-Lymphozyten durch DCs

Zur Stimulation naiver T-Lymphozyten durch DCs sind drei Signale nötig (schwarze, nummerierte Pfeile): 1. die Präsentation des passenden Antigens mittels MHC an den TCR, 2. ausreichende Costimulation (z.B. CD80/86 der DC an CD28 der T-Lymphozyten), 3. Einwirkung von Zytokinen (z.B. IL-12). Diese Signale bewirken in T-Lymphozyten (blaue Pfeile) eine Hochregulation von CD40L, das mit CD40 der DCs interagiert und diese dazu „lizenziert“ noch mehr costimulatorische Moleküle zu produzieren (sog. „cross-talk“ zwischen DCs und T-Lymphozyten). Daneben werden T-Lymphozyten zur IL-2-Produktion und Hochregulation von CD25 angeregt, das einen Teil des IL-2-Rezeptors darstellt. IL-2 regt T-Lymphozyten zur Proliferation an wodurch es zur klonale Expansion der antigenspezifischen T-Lymphozyten kommt. Abbildung frei nach [1].

Die Antigenerkennung erfolgt durch den TCR und ist begrenzt auf Antigene die über MHCs präsentiert werden [1, 38, 39]. Das obligatorische zweite Signal für die Aktivierung ist die Interaktion costimulatorischer Oberflächenmoleküle aktiverter APCs mit stimulatorischen Oberflächenrezeptoren der T-Lymphozyten [33, 40–42]. Reife DCs exprimieren am meisten costimulatorische Moleküle, weshalb sie als einzige naive T-Lymphozyten aktivieren können [1]. Neben stimulatorischen Rezeptoren, sind auf T-Lymphozyten jedoch auch inhibitorische Rezeptoren, wie beispielsweise PD-1 („programmed-death-1“) vorhanden, die mit Oberflächenmolekülen, wie PD-Ligand-1 (PD-L1), auf (tolerogenen) DCs interagieren und die T-Zell-Aktivierung supprimieren können. Das Fehlen costimulatorischer Signale und ein

Überwiegen coinhibitorischer Signale resultieren in Apoptose, Anergie oder in der Bildung regulatorischer T-Zellen (siehe Kapitel 1.3.3.) [1, 33, 43].

Auf die adäquate Stimulation eines T-Lymphozyten durch eine mDC hin sezerniert dieser IL-2 und exprimiert unter anderem verstärkt CD25 auf seiner Oberfläche. IL-2⁵ stimuliert das Überleben, die Proliferation und die Differenzierung der T-Lymphozyten. CD25 ist ein Teil des IL-2-Rezeptors, weshalb die Hochregulation auf aktivierte T-Lymphozyten deren Proliferation und Differenzierung weiter steigert (positives Feedback). So kommt es zur Proliferation der aktivierte T-Lymphozyten, wodurch multiple Klone eines antigenspezifischen T-Lymphozyten entstehen (klonale Expansion), wohingegen naive T-Lymphozyten, die nicht antigenspezifisch sind nicht zur Proliferation angeregt werden [1, 44, 45].

Daneben gibt es eine ganze Reihe costimulatorischer und coinhibitorischer Moleküle und Signalwege. Wie genau die Balance zwischen Stimulation und Inhibition reguliert wird und wie sich unterschiedliche Umgebungsbedingungen (z.B. lokale Vitamin D Konzentration) auswirken ist noch nicht vollständig geklärt [33, 46].

Wie in Abschnitt 1.2. beschrieben werden in DCs je nach Erreger unterschiedliche PRR-Signalwege in Gang gesetzt, was die Expression verschiedener Costimulatoren/Coinhibitoren und die Sekretion bestimmter Zytokinprofile auslöst. Die unterschiedlichen Zytokine bewirken die Differenzierung (Polarisation) der aktivierte CD4⁺T-Lymphozyten in verschiedene Effektor-T-Helfer-Subgruppen, weshalb man auch vom dritten Signal zur T-Zell-Aktivierung spricht. Die Polarisation in die Subgruppen (T_{H1} , T_{H2} , T_{H17} und regulatorische T-Zellen: T_{reg}) wird dadurch verstärkt, dass die zugehörigen T-Helfer-Zellen Zytokine produzieren, die die Entstehung der anderen Subgruppen hemmen und die eigene vorantreiben (siehe Tabelle 1-1). T_{H1} entstehen v.a. unter dem Einfluss von IL-12 und IFN γ , T_{H2} unter dem von IL-4 sowie IL-10 und T_{H17} unter dem gemeinsamen Einfluss von TGF β und IL-6 oder IL-21. Die Entstehung der T_{reg} soll durch tolerogene DCs mit wenigen costimulatorischen Molekülen, sowie unter dem Einfluss von TGF β (ohne gleichzeitige Wirkung proinflammatorischer Zytokine), IL-10 und Retinsäure vermittelt werden [1, 47–51].

⁵ IL-2, auch TCGF, „T-cell growth factor“, T-Zell-Wachstumsfaktor

Die Aktivierung der T-Lymphozyten führt außerdem zur Veränderung ihrer Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren, wodurch die aktivierte, antigenerfahrene T-Lymphozyten das lymphatische Gewebe verlassen und in Entzündungsherden im peripheren Gewebe einwandern. Ein Beispiel ist die Herabregulation des Oberflächenmarkers L-Selektin (CD62L), der zuvor die Einwanderung naiver T-Lymphozyten ins lymphatische Gewebe vermittelte. Manchmal spricht man bei der Veränderung der Migrationseigenschaften vom vierten Signal im Rahmen der T-Zell-Aktivierung [1, 33].

1.3.2. Effektorfunktionen von T-Lymphozyten

Antigenerfahrene T-Lymphozyten üben ihre Effektorfunktionen im peripheren Gewebe erst dann aus, wenn ihnen erneut das Antigen, für das sie spezifisch sind präsentiert wird. CD4⁺-T-Lymphozyten sind dabei weiterhin auf APCs und MHC-II, jedoch nicht unbedingt auf DCs angewiesen, wohingegen CD8⁺-T-Lymphozyten nun von allen kernhaltigen Zellen mit passendem MHC-I-Ag-Komplex aktiviert werden können. Effektor-CD4⁺-T-Lymphozyten sezernieren je nach T-Helfer-Subgruppe verschiedene Zytokine und aktivieren dadurch andere Immunzellen [1].

	T _H 1	T _H 2	T _H 17	T _{reg}	CTL
Induzierende Zytokine, Umgebungsbedingung	IL-12, IFN γ	IL-4	IL-6 & TGF β , IL-21 & TGF β , IL-1	TGF β (& RA), IL-10, IL-2	IFN γ
Sezernierte Zytokine, Effektor-moleküle	IFN γ TNF α/β	IL-4, IL-10	IL-17, IL-21, IL-22	TGF β , IL-10	Perforin, Granzym, Fas-Ligand
Immun-funktionen	Abwehr intrazellulärer Bakterien und Viren	Abwehr extrazellulärer Pathogene, wie Parasiten	Abwehr v.a. extrazellulärer Bakterien und Pilze	Regulation der Immunantwort, Aufrechterhaltung der Homöostase und Selbst-Toleranz	Abtötung virusinfizierter und entarteter Zellen
Assoziierte Erkrankungen	(a)GvHD, CED, Diabetes mellitus Typ-1	Asthma bronchiale, Allergien, (c)GvHD	(a)GvHD, MS, Psoriasis, CED, Allergien	IPEX	Organschädigung durch Abtötung von Parenchymzellen

Tabelle 1-1: T-Zell-Subgruppen und deren Funktion

Durch unterschiedliche Umgebungsbedingungen bei der T-Lymphozyten-Aktivierung, z.B. vorherrschendes Zytokinmilieu, kommt es zur Polarisation der T-Helfer-Zellen in verschiedene Subgruppen: u.a. T_H1, T_H2, T_H17, T_{reg}, die bestimmte Immunfunktionen wahrnehmen, jedoch auch in der Pathogenese von Erkrankungen des Immunsystems entscheidend beteiligt sind. Von den CD4⁺-Effektor-T-Lymphozyten lassen sich die CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) abgrenzen. Abkürzungen: RA: Retinsäure, (a/c)GvHD: (akute/chronische) Graft versus Host Disease, CED: Chronisch Entzündliche Darmerkrankungen, MS: Multiple Sklerose, IPEX: Immundysregulation, Polyendokrinopathie, Enteropathie, X-chromosomal Syndrom. Tabelle nach [51], modifiziert [1].

T_H1 sezernieren v.a. IFNy und induzieren zellvermittelte Immunantworten gegen intrazelluläre Bakterien und Viren durch Stärkung der phagozytotischen Aktivität und Zytotoxizität in anderen Immunzellen [1, 51–53]. IFNy gilt als essentieller Faktor in der Pathogenese vieler Erkrankungen, darunter die akute GvHD (siehe Kapitel 1.6.) [54, 55].

T_H2 schaffen durch ihre Zytokine Bedingungen, die für die Parasitenabwehr wichtig jedoch auch der Ausgangspunkt allergischer Reaktionen sind. Zudem sind T_H2 an Wundheilung, Fibrose und Umbauprozessen („Remodeling“), z.B. im Rahmen chronischer Entzündungsreaktionen, beteiligt [1, 51].

T_H17 triggern Entzündungsreaktionen in denen Neutrophile der vorherrschende Zelltyp sind, was die Abwehr extrazellulärer Bakterien und Pilze verstärkt. T_H17 stimulieren außerdem die Barrierefunktion von Schleimhäuten und sind in die Pathogenese verschiedenster entzündlicher Erkrankungen wie z.B. aGvHD und CED involviert [1, 51, 55].

Die T-Helper-Subgruppen stellen heterogene Zellpopulationen mit zum Teil erheblicher Plastizität da. Vor allem T_H17 und T_{reg} sollen im Rahmen veränderter Umgebungsbedingungen, ihr linientypisch sezerniertes Zytokinprofil ändern und in andere Effektor-T-Lymphozyten differenzieren [56–60].

CTL (Effektor-CD8⁺T-Lymphozyten) werden durch ihre Zielzellen aktiviert mit denen sie enge Zellkontakte formieren. Die an diesen Schnittstellen sezernierten zytotoxischen Moleküle oder exprimierten Liganden für Todesrezeptoren lösen in infizierten oder mutierten Zellen den kontrollierten Zelltod (Apoptose) aus. Die zytotoxische Aktivität der CTL wird durch die Erkennung physiologischer Antigen-MHC-I-Komplexe auf gesunden Zellen eingedämmt [1, 3, 61].

1.3.3. FOXP3⁺ regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen (**T_{reg}**) sind eine heterogene Gruppe immunmodulatorischer T-Lymphozyten. T_{reg} vermitteln (periphere) Toleranz gegenüber Auto- und Fremdantigenen, d.h. sie schützen den Körper vor überschießenden oder inadäquaten Immunantworten. Außerdem begrenzen T_{reg} inflammatorische Reaktionen, modulieren die Immunantwort gegenüber Organtransplantaten und beeinflussen die Immunprozesse im Rahmen hämatopoetischer Stammzelltransplantationen. Sie sind jedoch auch in die Entstehung der sog. „tumorspezifischen Toleranz“ involviert [1, 62–65].

Charakteristisch für T_{reg} sind die starke Expression des Oberflächenmarkers CD25 sowie die Aktivität des Transkriptionsfaktors Forkhead Box P3 (FOXP3) [1]. FOXP3 vermittelt die T_{reg} -Entstehung und ist zudem essentiell für die Aufrechterhaltung der Funktion der T_{reg} [66–69]. Die Wichtigkeit der regulatorischen T-Zellen für die Aufrechterhaltung der Immunhomöostase zeigt sich in der Entstehung schwerer Autoimmunkrankheiten (IPEX: Immundysregulations-Polyendokrinopathie-Enteropathie-X-chromosomal Syndrom) im Rahmen von Mutationen im FOXP3-Gen [70–72].

Die Induktion der T_{reg} erfolgt u.a. durch tolerogene DCs mit wenig costimulatorischen Signalen (siehe Kapitel 1.2.1.) und ist vom vorherrschenden Zytokinmilieu und weiteren Umgebungsbedingungen abhängig. In Schleimhaut-assoziierten lymphatischen Geweben und mesenterialen Lymphknoten spielt Retinsäure in der Induktion von T_{reg} eine wichtige Rolle, in der Haut 1,25-Dihydroxy-Vitamin D₃ (siehe Kapitel 1.4. und 1.5.). Die wichtigsten Zytokine in der T_{reg} -Induktion sind IL-2, TGFβ und IL-10. Wirken TGFβ und Retinsäure zusammen, so sollen stabilere und effizientere T_{reg} entstehen als unter der alleinigen Wirkung von TGFβ [13, 73–81].

Die Erhaltung regulatorischer T-Zellen ist ebenfalls von den Umgebungsbedingungen abhängig. Sie können ihre tolerogenen Eigenschaften unter inflammatorischen Bedingungen verlieren und zu Effektor-T-Lymphozyten differenzieren. Man spricht von Plastizität der T_{reg} [64, 81, 82].

$CD4^+CD25^+FOXP3^+T_{reg}$ vermitteln ihre immunmodulatorische Wirkung, durch zellkontaktabhängige Suppression von Immunzellen oder durch Zytokinsekretion (v.a. TGFβ und IL-10)[1, 65, 81, 83–89].

Neben den hier beschriebenen $CD4^+CD25^+FOXP3^+ T_{reg}$ existieren weitere regulatorische T-Zellpopulationen, denen auch $CD8\alpha\alpha T$ -L und $\gamma\delta T$ -L zugerechnet werden (siehe Kapitel 1.3.4.)[1, 84, 90, 91].

TGF β

Viele Zellen sind in der Lage auf das immunmodulatorische Zytokin TGF β zu reagieren, so sind TGF β -Rezeptoren auf T-Lymphozyten und DCs, jedoch auch auf Zellen, die nicht zum Immunsystem zählen, wie Fibroblasten und Endo-/Epithelzellen, zu finden. Die Bindung von TGF β an seinen Rezeptor bewirkt die Aktivierung verschiedener Proteinkinasen und Transkriptionsfaktoren, was die Expression unterschiedlicher Gene induziert [1, 92–94].

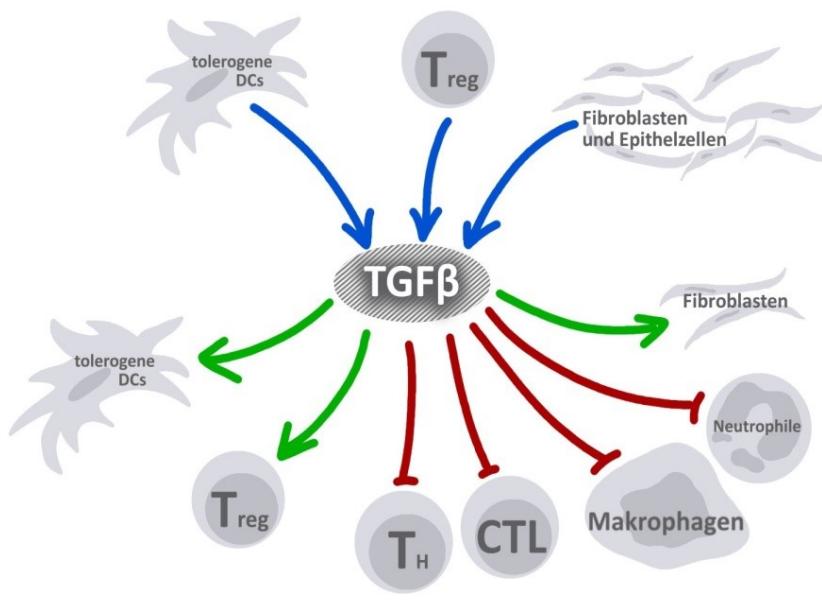


Abbildung 1-5: TGF β -Sekretion und -Effektorfunktionen

TGF β ist eines der Effektorzytikone regulatorischer T-Lymphozyten, wird aber auch von tolerogenen DCs, Fibroblasten und Epithelzellen gebildet (blaue Pfeile). Es stärkt die Bildung und Aktivität tolerogener DCs und regulatorischer T-Lymphozyten (grüne Pfeile). Daneben hemmt TGF β die Bildung und Aktivität einiger T-Helferzellen und zytotoxischer T-Lymphozyten, supprimiert phagozytotisch aktive Zellen wie Neutrophile und Makrophagen (rot markiert) und löst über die Stimulation von Fibroblasten Wundheilung jedoch auch pathologische Umbauprozesse („remodeling“) aus (grüner Pfeil).

Abbildung frei nach [1].

TGF β kontrolliert inflammatorische Reaktionen durch Hemmung der T-Lymphozyten-Proliferation, sowie der T-Helper- und CTL-Effektorfunktionen. Daneben nimmt TGF β unter anderem über die Hochregulation von FOXP3 und Induktion von T_{reg} Einfluss auf die T-Zell-Polarisation (siehe Kapitel 1.3.1. und Tabelle 1-1) [1, 79, 95].

Weitere antiinflammatorische Effekte übt TGF β durch die Suppression von Makrophagen und Neutrophilen aus. Außerdem soll TGF β die Bildung tolerogener DCs induzieren. Durch Stimulation von Fibroblasten löst TGF β zusätzlich Angiogenese und Wundheilung, jedoch auch pathologische Umbauprozesse („remodeling“) aus [1, 92–94, 96–98].

Neben T_{reg} sind unter anderem (tolerogene) DCs, Makrophagen und weitere Immunzellen jedoch auch Fibroblasten und Epithelzellen in der Lage TGF β freizusetzen und so sowohl auto- als auch parakrin immunmodulatorisch zu wirken [13, 76, 79, 93, 94, 96, 98, 99].

Durch Knock-Out der TGF β - oder TGF β -Rezeptor Gene entstehen in Mäusen Krankheitsbilder, die dem IPEX bei FOXP3-/T_{reg}-Defekt ähneln, was die wichtige Stellung des TGF β im Rahmen T_{reg}-vermittelter Immunsuppression veranschaulicht [100–103].

1.3.4. CD8 $\alpha\alpha$ -T-Zellen

Der Co-Rezeptor zytotoxischer T-Lymphozyten, CD8, besteht in der Regel aus je einer α - und einer β -Kette. Dieses Heterodimer verstärkt die $\alpha\beta$ -TCR-abhängige Signalübertragung. In verschiedenen Lymphozyten kommen jedoch auch Homodimere aus zwei α -Ketten vor (CD8 $\alpha\alpha$). Im Unterschied zu den Heterodimeren schwächen die Homodimere die Antigensensitivität des TCR und damit die Signalübertragung ab. Solche CD8 $\alpha\alpha$ -positiven Lymphozyten kommen als intraepitheliale Lymphozyten (IEL) im Darm vor und gelten dort als mitverantwortlich für die Immunhomöostase. Zudem scheint CD8 $\alpha\alpha$ zusätzlich zu CD4 oder CD8 aktivierungsabhängig transient auf Lymphozyten exprimiert zu werden und die Signalübertragung als Co-Repressor zu verringern. Auf diese Weise soll CD8 $\alpha\alpha$ bei der Bildung von Effektor-Memory-Zellen beteiligt sein [104, 105]. Wie Versuche an Mäusen zeigen scheint sowohl die Bildung „single-positiver“ CD8 $\alpha\alpha$ IEL, als auch die transiente Expression von CD8 $\alpha\alpha$ abhängig von TGF β zu sein [106]. Daneben stellt die Anwesenheit des Vitamin D Rezeptors eine Voraussetzung für die Entstehung von CD8 $\alpha\alpha$ -positiven T-Zellen dar [107].

1.3.5. Memory-T-Lymphozyten

Das immunologische Gedächtnis bietet optimalen Schutz vor Keimen mit denen das Immunsystem wiederholt konfrontiert ist. T-Zell-vermittelte Immunantworten gegen ein Antigen vermitteln die Entstehung von langlebigen Gedächtnis-T-Zellen, die in der Lage sind auch Jahre nach dem Erstkontakt spezifisch gegen dasselbe Antigen schnelle und effektive Immunantworten auszulösen [1, 3, 7].

Memory-T-Zellen tragen als charakteristischen Oberflächenmarker unter anderem CD45RO, der Antigenerfahrung anzeigt. Den „Naivitätsmarker“ CD45RA haben sie verloren. Memory-T-Zellen stellen eine heterogene Zellpopulation dar. Neben der Einteilung in CD4 $^+$ und CD8 $^+$ Memory-T-Zellen kann eine weitere Einteilung anhand ihrer Migrationseigenschaften und Funktionen in zentrale Gedächtniszellen (T_{CM}, „central memory“) und Effektor-Gedächtniszellen (T_{EM}, „effector memory“) anhand der Expression von CD62L erfolgen. T_{CM}

exprimieren Chemokinrezeptoren und Adhäsionsproteine (u.a. L-Selektin/CD62L), die für ihr „Homing“ in sekundär lymphatischen Gewebe verantwortlich sind. Sie haben nur ein geringes Potential auf Antigenexposition hin Effektorfunktionen zu entwickeln, jedoch regt der Kontakt mit dem passenden Antigen T_{CM} zu schneller Proliferation und Generierung vieler antigenspezifischer Effektorzellen an. T_{EM} sind dagegen als CD62L-negative Memory-T-Zellen vor allem im peripheren Gewebe lokalisiert und können bei Antigenexposition extrem schnell Effektorfunktionen wie Zytotoxizität oder Zytokinsekretion entwickeln, allerdings proliferieren sie kaum (siehe auch Kapitel 1.6.4.) [1, 108, 109].

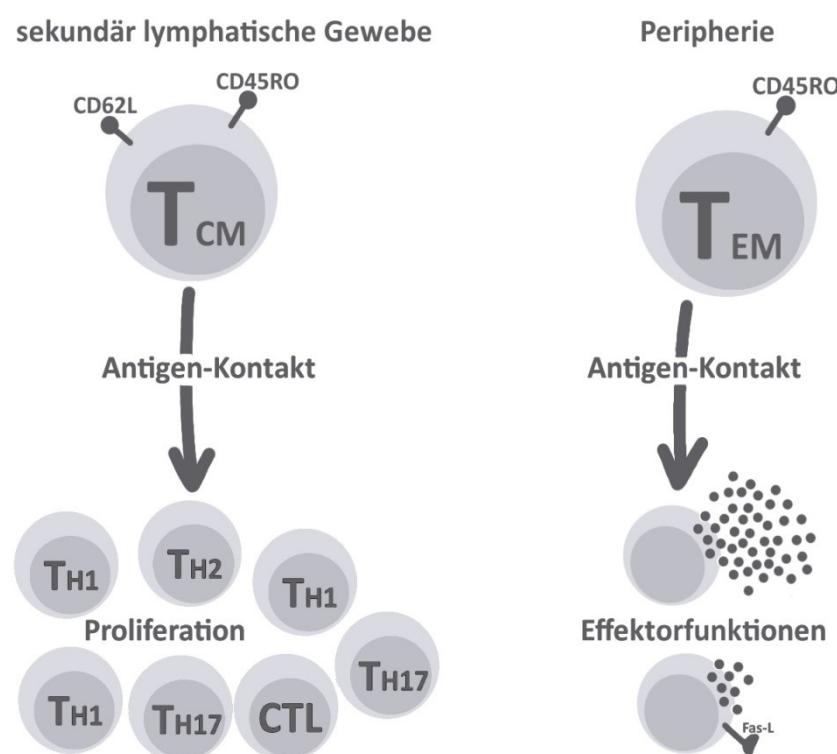


Abbildung 1-6: Zentrale- und Effektor-Memory-T-Zellen

Die $CD45RO^+$ Memory-T-Zellen können in $CD62L^+T_{CM}$ und $CD62L^-T_{EM}$ unterteilt werden. Auf Antigenkontakt hin bilden die in der Peripherie lokalisierten T_{EM} (rechts) rasch Effektorfunktionen, wie Zytokinsekretion oder Expression von Liganden für Todesrezeptoren, aus. Aufgrund der Expression von CD62L sind T_{CM} in sekundär lymphatischen Geweben zu finden. Der Kontakt zum passenden Antigen regt die T_{CM} zur Proliferation an, sodass eine Vielzahl an Effektorzellen entsteht. Abbildung frei nach [1, 108, 109].

1.4. Vitamin D vermittelte Immunmodulation

Im menschlichen Organismus spielt Vitamin D zum einen im Calcium-Phosphathaushalt und damit im Knochenstoffwechsel eine zentrale Rolle, zum anderen nimmt Vitamin D entscheidenden Einfluss auf die Zellen sowohl des angeborenen als auch des adaptiven Immunsystems [110, 111]. Deshalb hat Vitamin D nicht nur durch die klassische Anwendung in der Rachitisprophylaxe und Osteoporosetherapie klinische Relevanz sondern etabliert sich zunehmend in der (experimentellen) Therapie und Prophylaxe von Immunerkrankungen (z.B. Psoriasis, CED, GvHD) [112–115].

1.4.1. Vitamin D Metabolismus

Über die Nahrung⁶ werden in der Regel nur geringe Mengen an Vitamin D aufgenommen. Der Großteil des physiologischen Bedarfs wird durch die UVB-abhängige körpereigene Synthese aus 7-Dehydrocholesterol in der Haut gedeckt⁷ [112, 116, 117]. Dabei entsteht Cholecalciferol (D_3), eine biologisch inaktive Form von Vitamin D. Aktiviert wird D_3 mittels zweifacher Hydroxylierung. Klassischerweise erfolgt die Erste zum $25(OH)D_3$ (Calcidiol, 25VD) in der Leber und die Zweite in der Niere, wobei das biologisch aktive $1,25(OH)_2D_3$ (Calcitriol, 1,25VD) entsteht [111, 116, 118, 119]. 1,25VD gelangt über die Blutbahn an seine Zielorgane (Darm, Niere, Knochen) und bewirkt eine verstärkte Knochenmineralisation sowie Kalzium- und Phosphatabsorption [116]. Die 24-Hydroxylase, deren Expression durch 1,25VD induziert wird, baut 1,25VD schließlich zu einem inaktiven Metaboliten ab, der über die Galle ausgeschieden wird [111, 116, 120].

25VD zirkuliert in 1000-fach höherer Konzentration als das aktive Vitamin (1,25VD) im Blut und bildet die Vitamin-D-Vorkommen im Körper am genauesten ab [112]. Optimale 25VD-Serumspiegel liegen zwischen 75-150 nM [116]. Niedrige Spiegel sind mit einem höheren Risiko für eine ganze Reihe häufiger Erkrankungen (Krebs [116, 116, 121], Diabetes [122–124], Osteoporose [116], Tuberkulose [125], Influenza [126], Morbus Crohn [114, 117] u.a.) sowie mit einem schlechteren Outcome bei Organ- [127, 128] und Stammzelltransplantationen [129, 130] assoziiert. Von einem Mangel spricht man ab Werten unter 50 nM bei denen auch Erkrankungen wie Rachitis bzw. Osteomalazie auftreten {Holick 2007 #175I}[112].

Zusätzlich zu dem oben beschriebenen „klassischen“ Vitamin-D-Metabolismus kann eine Aktivierung von Vitamin D auch peripher erfolgen. Neben Organparenchym-, Endothel- und Epithelzellen exprimieren insbesondere auch einige hämatopoetische Zellen die hierfür notwendigen Enzyme [131–135]. Durch die lokale 25VD Umsetzung entsteht ein besonders 1,25VD reiches Mikromilieu, das sowohl die Immunzellen selbst (autokrine Wirkung), als auch diejenigen in der Umgebung (parakrine Wirkung) beeinflusst ohne dabei systemische Hormoneffekte wie Hyperkalzämie zu erzeugen [110, 136].

⁶ Reich an Vitamin D sind z.B. fettreiche Fischarten wie Lachs, Sardine, Makrele und Thunfisch

⁷ Eine fünf- bis zehnminütige Exposition der Hände, Arme und des Gesichts zwei- bis dreimal pro Woche gilt als ausreichend.

Makrophagen, DCs und T-Lymphozyten exprimieren die 25-Hydroxylase zur Aktivierung von $25(\text{OH})\text{VD}_3$ in $1,25(\text{OH})_2\text{VD}_3$ und zum Teil auch die 1α -Hydroxylase zur Bildung von $25(\text{OH})\text{VD}_3$ aus VD_3 [110, 132, 133, 135–137]. Das Ausmaß der Expression und Aktivität dieser Enzyme hängt von der Differenzierung der Zellen und den Umgebungsbedingungen ab. Es konnte gezeigt werden, dass Reifungsstimuli (z.B. TLR4-Stimulation mittels LPS, T-L-Kontakt) in DCs die 1,25VD-Produktion aus 25VD steigern [133, 134, 138]. Gesenkt wird die 1,25VD-Bildung unter anderem durch eine geringere Verfügbarkeit von 25VD, das heißt beispielsweise durch niedrigere Serumspiegel [138, 139]. Die lokalen 1,25VD-Spiegel und das 25VD-Angebot werden zudem durch deren Abbau zu inaktiven Metaboliten mittels 24-Hydroxylase gesenkt. In DCs erhöht 1,25VD im Sinne eines negativen Feedbacks die 24-Hydroxylase-Expression [29, 135, 139].

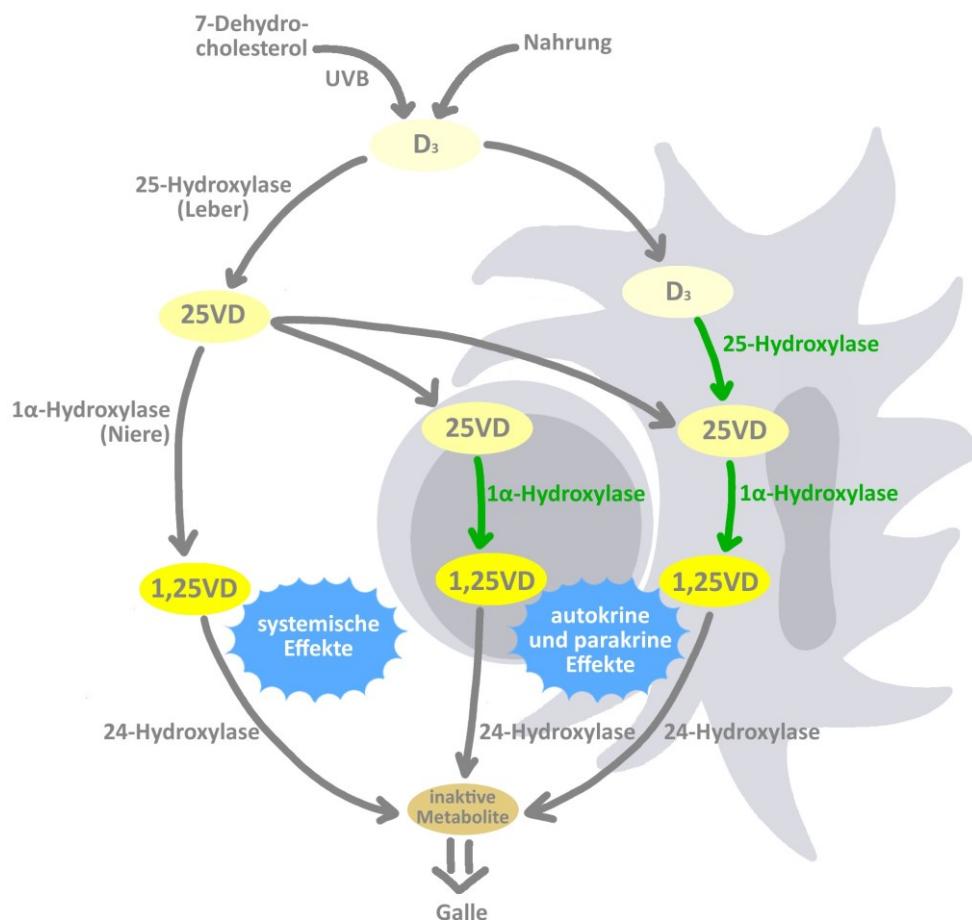


Abbildung 1-7: Vitamin D Metabolismus

Cholecalciferol (D_3), eine inaktive Vorstufe des Vitamin D wird entweder über die Nahrung aufgenommen oder UVB-abhängig in der Haut synthetisiert. D_3 wird mittels zweifacher Hydroxylierung über Calcidiol (25VD) in das biologisch aktive Vitamin Calcitriol (1,25VD) umgesetzt. Die notwendigen Enzyme (25-Hydroxylase und 1α -Hydroxylase) werden einerseits in Leber und Niere (links im Bild) exprimiert, wodurch systemische Vitamineffekte ermöglicht werden. Andererseits besitzen auch DCs und zum Teil T-Lymphozyten die nötigen Enzyme (grüne Pfeile). Durch die lokale Aktivierung entsteht ein besonders 1,25VD-reiches Mikromilieu das auto- und parakrine Effekte vermittelt. Eine weitere Hydroxylierung mittels CYP24A1 überführt 1,25VD schließlich in inaktive Metabolite, die über die Galle ausgeschieden werden können. Abbildung frei nach [110].

1.4.2. Vitamin D Rezeptor

Vitamin D vermittelt seine Effekte über den intrazellulären Vitamin D-Rezeptor (VDR). Die Bindung von 1,25VD an den VDR bewirkt eine Heterodimerisierung des VDR-1,25VD-Komplexes mit RXR (Retinoid-X-Rezeptor) [120, 140, 141]. Die Heterodimere treten mit Co-Aktivatoren/-Repressoren und den VDRE („Vitamin D Response Elements“) der DNA in Kontakt, wodurch mehrere hundert Gene in ihrer Expression beeinflusst werden können [110, 111, 141, 142].

Der RXR dimerisiert jedoch nicht nur mit dem VDR sondern ist der Bindungspartner für ein Drittel aller humanen nukleären Rezeptoren, darunter auch der Retinsäurererezeptor [141]. Da im Signalweg von 1,25VD und Retinsäure dieselben Bindungspartner eine Rolle spielen ist eine gegenseitige Antagonisierung oder Wirkungssteigerung denkbar [110, 143].

Der VDR wurde in diversen humanen Zellen nachgewiesen, unter anderem auch in vielen Immunzellen, wie DCs und T-Lymphozyten [144–146]. Die VDR-Expression hängt vom Differenzierungsstadium und den Umgebungsbedingungen der Immunzellen ab [132, 134, 147]. Eine TCR-abhängige T-Lymphozyten-Aktivierung bewirkt eine VDR-Hochregulation, weshalb vor allem Effektor- und Memory-T-Lymphozyten eine hohe Expression aufweisen [147, 148]. DCs bilden im Zuge ihrer Reifung zu mDCs vermehrt 1,25VD (stärkere 1α -Hydroxylase-Expression, s.o.) allerdings erfolgt gleichzeitig eine VDR-Herunter-Regulation [134]. So wirkt 1,25VD vor allem parakrin auf unreife DCs und aktivierte T-Lymphozyten, wodurch eine adäquate Immunantwort durch die bereits reifen DC ermöglicht, eine überschießende Stimulation weiterer iDCs jedoch verhindert wird [136, 142].

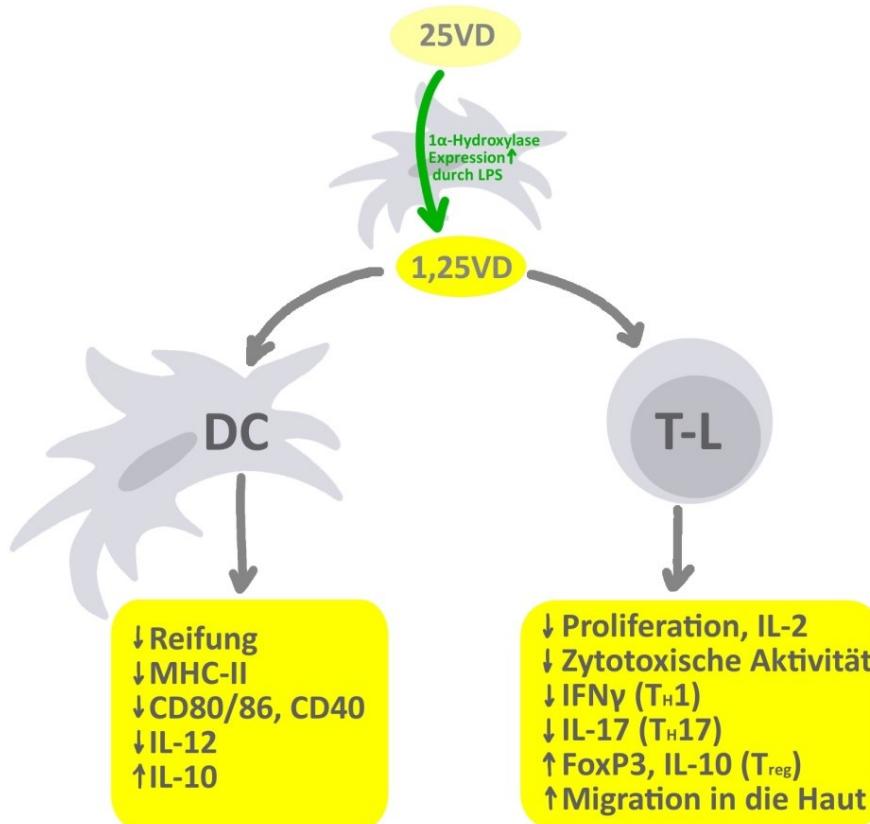
	iDC	mDC	T _N	T _{Eff}
1,25VD-Bildung	+	+++	+	++
VDR-Rezeptorexpression	+++	+	+	+++

Tabelle 1-2: 1,25VD wird insbesondere durch mDC gebildet. Effektor-T-Lymphozyten und iDC weisen eine starke VDR-Expression auf

Im Zuge der Reifung zu mDC exprimieren dendritische Zellen verstärkt die zur 1,25VD-Bildung nötige 1α -Hydroxylase. Auch aktivierte T-Zellen sollen 1,25VD bilden können. Die stärkste VDR-Expression weisen unreife DCs (iDC) und Effektor-T-Lymphozyten (T_{Eff}) auf, sodass das insbesondere durch mDC gebildete 1,25VD vor allem parakrin auf iDC und Effektor-T-Lymphozyten wirkt. Tabelle frei nach [110, 137, 148].

1.4.3. Einfluss von Vitamin D auf dendritische Zellen und T-Lymphozyten

1,25VD hemmt die DC-Differenzierung aus Monozyten und deren Reifung zu professionellen APCs [134, 149]. Zudem scheint 1,25VD in DCs NOD zu induzieren, was deren Reaktion auf bakterielle Stimuli beeinflussen soll [150, 151]. Statt mDCs entstehen unter dem Einfluss von 1,25VD tolerogene DCs mit verminderter Expression von MHC-II-Komplexen und costimulatorischen Molekülen [149, 152–154]. Die Folgen sind eine verminderte Aktivierung naiver T-Zellen, Anergie oder Apoptose der T-Lymphozyten [152, 153]. Zudem beschreiben mehrere Autoren ein unter dem Einfluss von 1,25VD verändertes Zytokinprofil der DCs und zwar dahingehend, dass vermindert T_{H1} - und T_{H17} -polarisierende und verstärkt T_{reg} polarisierende Zytokine sezerniert werden sollen [110, 154, 155].



Die Funktion der T-Lymphozyten wird einerseits durch indirekten (DC-abhängigen) Einfluss andererseits durch direkte 1,25VD-Effekte beeinflusst [147]. Insgesamt bewirkt 1,25VD eine verminderte Proliferation und zytotoxische Aktivität der CD8 $^{+}$ T-Lymphozyten [156, 157]. Auch CD4 $^{+}$ T-Lymphozyten sollen im Sinne verminderter T_{H1} - und T_{H17} -Aktivität weniger IFN γ , IL-2 und IL-17 bilden und stattdessen vermehrt IL-10 und FOXP3 entsprechend stärkerer T_{reg} Funktion [77, 110, 117, 158–162]. Vitamin-D soll durch eine verminderte IL-2-

Produktion und geringere APC-abhängige Aktivierung die CD4⁺T-Lymphozyten-Proliferation hemmen [110]. Unter dem Einfluss von 1,25VD verändert sich außerdem die Ausstattung mit „Homing-Rezeptoren“, was eine Migration der Lymphozyten in die Haut bedingen kann [1, 137].

1.5. Vitamin A vermittelte Immunmodulation

Vitamin A ist am Sehvorgang beteiligt und nimmt Einfluss auf Wachstum, Embryogenese, Reproduktion, Zellproliferation und –differenzierung und die Integrität epithelialer Barrieren, wie Haut und Schleimhäute [163–168]. Vitamin A Mangel ist mit erhöhter Kindersterblichkeit, Infektanfälligkeit und geringeren Impferfolgen assoziiert, was auf eine essentielle Rolle von Vitamin A bei der Induktion (adaptiver) Immunantworten hindeutet [163, 164, 169–172]. Andererseits ist Vitamin A gerade im Darm auch an der Aufrechterhaltung der Homöostase beteiligt und vermittelt Immuntoleranz [164]. Somit besitzt Vitamin A im Immunsystem verschiedene, teils gegensätzliche Funktionen [163, 164, 169].

1.5.1. Vitamin A Metabolismus

Vitamin A wird in Form tierischer Retinylester oder pflanzlicher Carotinoide (Provitamin A) über die Nahrung⁸ aufgenommen [173, 174]. Im Darm und der Leber erfolgt die Umsetzung zu Retinol, welches dann entweder als Ester in der Leber gespeichert wird oder über das Blut die Zielgewebe erreicht wo es mittels zweifacher Oxidation in die biologisch aktive Retinsäure umgesetzt wird [110, 167, 174, 175]. Um den Serumspiegel konstant bei 1-2µM, zu halten erfolgt bei Bedarf eine Hydrolyse der in der Leber gespeicherten Ester [173, 176].

Nach intrazellulärer Aufnahme von Retinol erfolgt die Umsetzung zu Retinal durch die ubiquitär exprimierten Alkohol-Dehydrogenasen (ADH) oder Kurzketten-Dehydroreduktasen. In einem zweiten, irreversiblen und stark regulierten Schritt wird Retinal mittels bestimmter Aldehyd-Dehydrogenasen (ALDH) in Retinsäure (RA) umgewandelt [110, 173, 175, 177].

Es konnte gezeigt werden, dass intestinale Epithelzellen (IEC), wie auch DCs in Peyer-Plaques und mesenterialen Lymphknoten die zur Retinsäurebildung nötigen ALDH (oder RALDH,

⁸ Reich an Vitamin A sind z.B. Karotten, Süßkartoffeln, Kürbis, (Rinder-)Leber sowie künstlich angereicherte Nahrungsmittel wie Cerealien und Margarine.

Retinaldehyd-Dehydrogenasen) exprimieren, wodurch im Darm ein RA-reiches Mikromilieu entsteht [110, 178, 179]. In Versuchen an Mäusen konnte eine (R)ALDH-Expression auch in DCs aus Lunge, Haut und den jeweils assoziierten Lymphknoten nachgewiesen werden [163, 180, 181]. *In vitro* stimulieren GM-CSF, IL-4, TLR-Liganden und RA die ALDH-Expression in (intestinalen) murinen DCs, sodass ein positiver Feedback-Mechanismus und eine gesteigerte RA-Bildung unter inflammatorischen Bedingungen (TLR-Signaling; IL-4 und GM-CSF aus Granulozyten und Makrophagen) vermutet werden [163, 182, 183]. Andere Versuche zeigten jedoch, dass einzelne Entzündungsmediatoren und Parasiteninfektionen die ALDH-vermittelte RA-Produktion vermindern können. Im inflammatorischen Milieu scheinen demnach die jeweils beteiligten Zytokine das Ausmaß der RA-Bildung zu steuern [163, 184, 185].

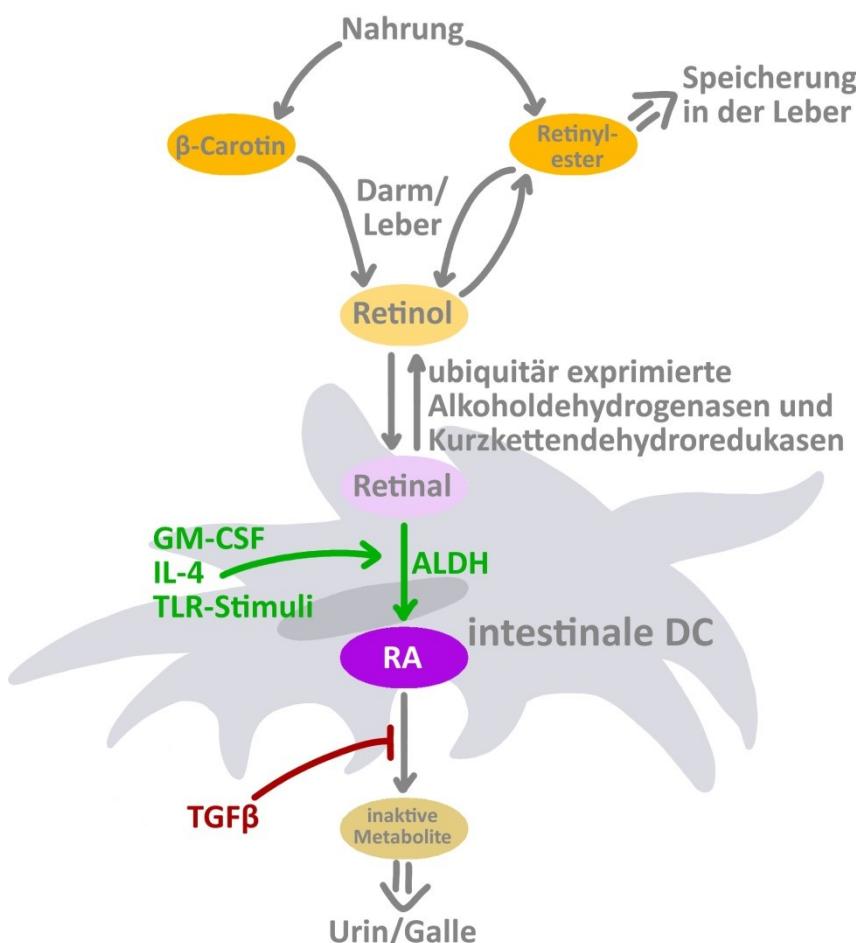


Abbildung 1-9: Vitamin A Metabolismus

Über die Nahrung werden biologisch inaktive Vorstufen des Vitamin A aufgenommen. Es kann eine Speicherung in Form von Retinylestern in der Leber erfolgen oder eine Metabolisierung zu Retinol, welches anschließend mittels ubiquitär exprimierter Dehydrogenasen zu Retinal oxidiert wird. Den entscheidenden Schritt der Aktivierung stellt die zweite Oxidation mittels ALDH zur Retinsäure (RA) dar. Eine ALDH-Expression konnte in intestinalen DCs und einigen murinen DCs der Lunge und Haut nachgewiesen werden. GM-CSF, IL-4 und TLR-Stimuli sollen die ALDH-Expression und damit die lokalen RA-Spiegel erhöhen. Nach Umsetzung in inaktive Metabolite erfolgt die Ausscheidung über die Galle oder den Urin. Dieser Abbau wird vermutlich durch TGFβ gehemmt. Abbildung frei nach [110, 163, 164].

Abgebaut wird Retinsäure mittels Zytochrom P 450 Enzymen zu wasserlöslicheren Metaboliten, die dann über die Galle oder den Urin ausgeschieden werden [110, 167]. Die metabolisierenden Enzyme werden durch RA im Sinne eines negativen Feedbacks induziert

und unter dem Einfluss von TGF β reprimiert, was zu einer Wirkverstärkung von RA im TGF β -reichen Milieu führen soll [164, 186, 187].

1.5.2. Vitamin-A-Rezeptor

Analog zu Vitamin D vermittelt auch Vitamin A seine Effekte über intrazelluläre Rezeptoren. Zu den Retinoidrezeptoren gehören neben den RAR (Retinsäure-Rezeptoren) auch die RXR (Retinoid-X-Rezeptoren), die wie oben erwähnt als Co-Rezeptor vieler nukleärer Rezeptoren (darunter VDR, RAR) dienen [110, 141, 188–190]. Wie VDRs formieren auch RARs Heterodimere mit RXRs und treten mit RARE („retinoic acid response elements“) der DNA in Kontakt, wodurch Liganden-abhängig bestimmte Gene in ihrer Expression beeinflusst werden [141, 164]. Daneben sind Einflüsse von über nukleäre Fettsährerezeptoren sowie über RXR-Homo- und verschiedene RXR-Heterodimere möglich [110, 191, 192].

Soweit bekannt werden RXR und RAR ubiquitär exprimiert und unter dem Einfluss von RA hochreguliert [164, 193]. DCs scheinen durch posttranskriptionale Mechanismen weniger Retinoid-Rezeptoren zu exprimieren als Monozyten und Makrophagen [193].

1.5.3. Einfluss von Vitamin A auf dendritische Zellen und T-Lymphozyten

Vitamin A vermittelt abhängig vom lokalen Zytokinmilieu verschiedene, teils gegensätzliche Effekte [110, 163]. In dendritischen Zellen bewirkt RA eine gesteigerte TGF β -Produktion sowie eine höhere ALDH-Expression (s.o.), was die lokalen RA-Konzentrationen erhöhen und zu einer autokrinen und parakrinen Wirkverstärkung führen soll [76, 99, 182, 194, 195]. Außerdem scheinen die Migrationseigenschaften von DCs dahingehend beeinflusst zu werden, dass sie in Lymphknoten wandern um dort mit naiven T-Lymphozyten in Kontakt zu treten [196]. RA-produzierende DCs induzieren in T-Lymphozyten Darm-Homing-Rezeptoren [178].

In einer inflammatorischen Umgebung, bewirkt RA in DCs eine vermehrte Expression von MHC-II-Komplexen und costimulatorischen Molekülen, wodurch deren Fähigkeit naive T-Zellen zu aktivieren verstärkt wird [163, 197, 198]. Zudem scheint RA in einem inflammatorischen Milieu in DCs die Produktion inflammatorischer Zytokine zu fördern und damit die T_H1 und T_H17 Polarisation zu triggern [199, 200].

In Abwesenheit inflammatorischer Zytokine soll RA dagegen Apoptose in DCs induzieren [197]. Außerdem soll RA zusammen mit TGF β die DC-vermittelte Bildung regulatorischer T-Lymphozyten steigern und die T H 17-Entstehung hemmen [76, 99, 201, 202].

RA beeinflusst CD4 $^+$ T-Lymphozyten einerseits indirekt durch veränderte DC-Eigenschaften, andererseits vermittelt RA auch direkte Effekte auf T-Lymphozyten. Im entzündungsfreien „steady-state“ verschiebt sich das T_{reg}/T H 17-Verhältnis auch über direkte FOXP3-Induktion und Hemmung der T H 17-polarisierenden Transkriptionsfaktoren zugunsten der T_{reg} [110, 186, 202–204]. Das T H 1/T H 2-Verhältnis wird durch RA zugunsten der T H 2 und den assoziierten Zytokinen (v.a. IL-4) und Funktionen verschoben [186, 205–208].

Unter inflammatorischen Bedingungen ist RA dagegen an der Aktivierung naiver T-Lymphozyten, der Migration der T-Lymphozyten zum Entzündungsherd, der T-Zell-Proliferation und der Produktion von IFN γ durch T H 1 sowie IL-17 durch T H 17 beteiligt [163, 169, 199, 209].

In CD8 $^+$ T-Lymphozyten ist RA für die Expression von Darm-Homing-Rezeptoren und die Bildung von Effektorzellen (CTL) wichtig [210–212].

RA &	„steady-state“	Inflammation
DC	↑ Apoptose	↑ costimulatorische Moleküle, ↑ MHC-II
	↓ APC-Funktion	↑ APC-Funktion
	↑ TGF β -Produktion	↑ T H 1-Polarisation, ↑ IFN γ -Produktion
	↑ T _{reg} / ↓ T H 17-Polarisation	↑ T H 17 / ↓ T _{reg} Polarisation
CD4$^+$ T-Zellen	↑ T _{reg} , ↑ FOXP3	↑ T H 17 / ↓ T _{reg}
	↓ T H 1, ↓ IFN γ ; ↑ T H 2, ↑ IL-4	↑ T H 1, ↑ IFN γ

Tabelle 1-3: Immunmodulatorische Eigenschaften von Retinsäure unter verschiedenen Umgebungsbedingungen

In Abwesenheit inflammatorischer Umgebungsbedingungen (Spalte „steady-state“) scheint Retinsäure (RA) immunmodulatorischen Einfluss auf DCs und CD4 $^+$ T-Lymphozyten zu nehmen, wohingegen RA in entzündlichen Umgebungsbedingungen (Spalte „Inflammation“) DCs und CD4 $^+$ T-Lymphozyten aktivieren und so proinflammatorisch wirken soll. Welchen Einfluss RA auf allo-Immunreaktionen nimmt und wie sich ein Zusammenwirken von RA mit Vitamin D bzw. mit anderen Immunmodulatoren wie TGF β und bakteriellen Stimuli auswirkt ist weitestgehend ungeklärt und wird in dieser Arbeit genauer untersucht. Tabelle nach [163], modifiziert.

1.6. Die Graft-versus-Host-Disease (GvHD)

Die Transplantation hämatopoetischer Stammzellen ist die einzige kurative Therapie für eine Reihe hämatologischer und hämatoonkologischer Erkrankungen wie Hämoglobinopathien, verschiedene Formen der Knochenmarksinsuffizienz, Immundefekte, Leukämien und Lymphome [1, 55, 213, 214]. Am häufigsten wird die allogene hämatopoetische Stammzelltransplantation in der Therapie akuter Leukämien und Lymphome eingesetzt [215]. Eine initiale myelo- und immunsuppressive (Radio-)Chemotherapie (Konditionierungsregime) bekämpft einerseits die Grunderkrankung, andererseits ermöglicht sie das Anwachsen des Transplantats (Engraftment) im Knochenmark [1, 55, 213]. Im Anschluss werden hämatopoetische Stammzellen eines HLA- bzw. MHC-kompatiblen Spenders auf den Empfänger übertragen mit dem Ziel einen kompletten Spenderchimerismus zu erreichen, d.h. eine vollständige Übernahme der Hämatopoese (Erythro-, Lympho- und Myelopoese) durch die Spenderzellen [1, 216]. Limitiert wird diese Therapieform durch das Auftreten von Abstoßungsreaktionen, Transplantatversagen, Immundefekten nach der Transplantation, Rezidiven und vor allem durch die Graft-versus-host-disease (GvHD) [1, 213, 214]. Letztere tritt in ca. 40 bis 60% der Transplantationen auf und endet für etwa 15% der transplantierten Patienten letal [55, 217–219]. Die GvHD entsteht durch Immunreaktionen, die von T-Lymphozyten des Spenders (graft) gegen Empfängerantigene (host) ausgelöst werden [1, 219–221].

1.6.1. Klinik der GvHD

Nach zeitlichen und histopathologischen Kriterien unterscheidet man eine akute und eine chronische Form der GvHD. Die akute GvHD (aGvHD) tritt in der Regel innerhalb der ersten 100 Tage nach Transplantation ein und ist durch den Tod epithelialer Zellen vor allem in Haut, Darm und Leber charakterisiert [1, 213, 219, 222].

Klinisch manifestiert sich die aGvHD der Haut in einem makulopapulösen, teils generalisiertem Exanthem bis hin zur Epidermolyse [213, 219, 223]. Die Beteiligung des Gastrointestinaltrakts macht sich durch Inappetenz, Erbrechen, Gewichtsverlust, Bauchschmerzen sowie sekretorischen und teils hämorrhagischen Diarrhoen bemerkbar [213, 214, 219, 224, 225]. In der Leber ist vor allem das Gallengangepithel betroffen,

wodurch es zum cholestatischen Ikterus (direkte Hyperbilirubinämie) und zur Transaminasenerhöhung kommen kann [226, 227].

Die chronische GvHD tritt später ein und ist histologisch durch Fibrose und Atrophie charakterisiert [1, 55, 228]. Das klinische Bild erinnert an verschiedene Kollagenosen und zeichnet sich durch Hautveränderungen, Sicca-Symptomatik, Mukositis, Serositis, Beteiligung der Gelenke und Lunge sowie Leberfunktionsstörungen aus [1, 214, 219, 228].

1.6.2. Pathogenese der akuten GvHD

Die Pathogenese der GvHD wird in mehrere Phasen unterteilt. Zunächst kommt es, in einer ersten Phase, durch das Konditionierungsregime zur Gewebeschädigung. Hierbei werden DAMPs sowie gerade an Umwelt-Individuum-Grenzen (z.B. Haut, Gastrointestinaltrakt) auch PAMPs freigesetzt und konsekutiv die dort lokalisierten antigenpräsentierender Zellen aktiviert. Unreife DCs werden so unter anderem zur Reifung und damit zur Migration in sekundär lymphatische Organe, Präsentation von Peptidfragmenten über MHCs, Expression costimulatorischer Moleküle sowie Sekretion proinflammatorischer Zytokine angeregt [55, 219, 229].

In der zweiten Phase treten die mDCs in den sekundär lymphatischen Organen mit naiven Spender-T-Lymphozyten in Kontakt, die die präsentierten Alloantigene als fremd erkennen. Es kommt zur klonalen Expansion, Differenzierung und Polarisation, wobei vor allem T_H1 und T_H17 entstehen. Es folgt die Migration der T_H1 und T_H17 in die Zielgewebe, wo es zur weiteren Aktivierung von Effektorzellen durch sezernierte Zytokine (IL-2, IFN γ , TNF α , IL-17, IL-21 u.a.) kommt. Neben Neutrophilen, Makrophagen und CD8 $^+$ CTL werden auch NK-Zellen aktiviert [55, 219, 229, 230].

Als Folge kommt es in einer dritten Phase durch Entzündungsmediatoren und zellvermittelte Zytotoxizität zur Apoptose und Nekrose in den Zielgeweben [219, 229, 230]. Dies schränkt die Barrierefunktion weiter ein, wodurch sich die Konzentrationen der DAMPs und PAMPs weiter erhöhen und es zu einer potenteren positiven Feedbackschleife kommt [55, 219, 226, 229].

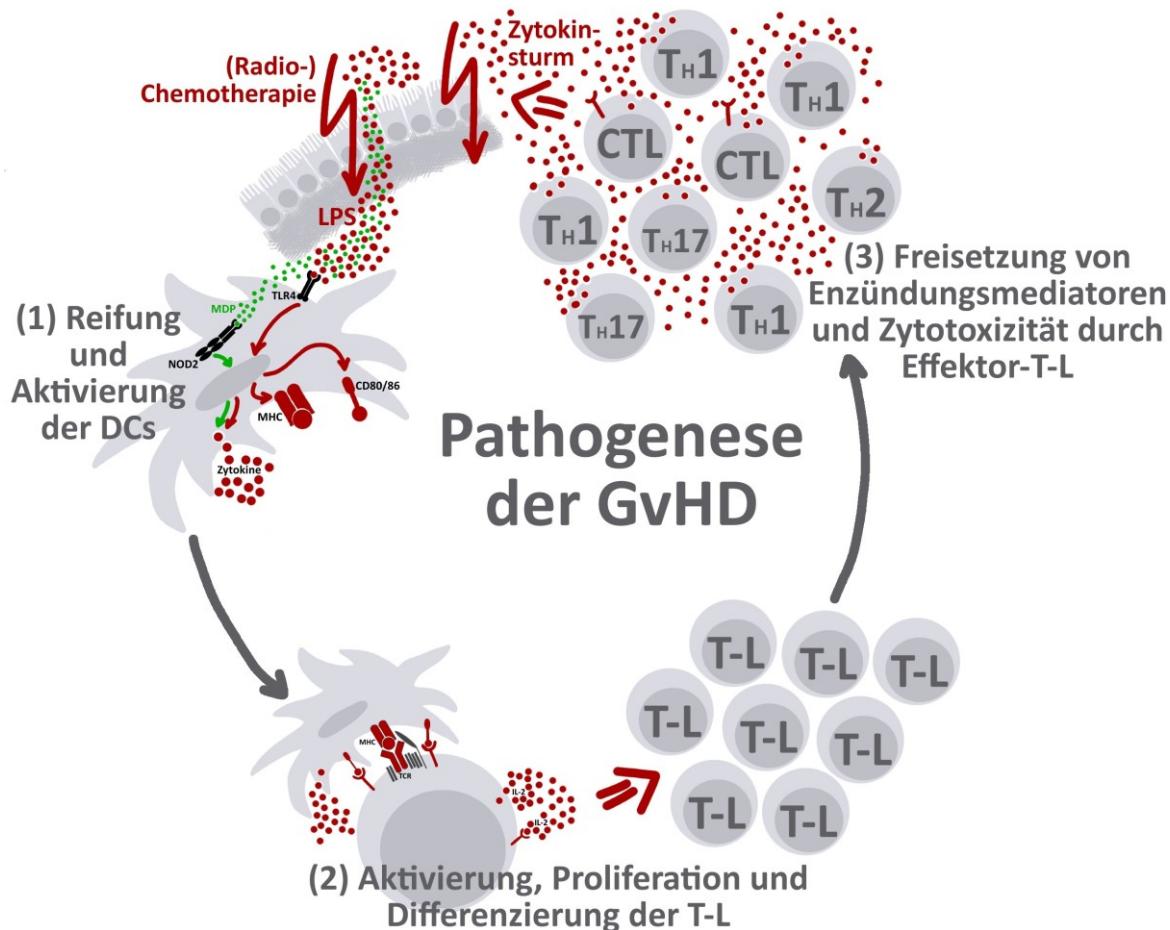


Abbildung 1-10: Pathogenese der GvHD

Die Pathogenese der GvHD kann modellhaft in drei Phasen unterteilt werden. Die durch das Konditionierungsregime geschädigten epithelialen Barrieren werden in der ersten Phase (1) durchlässiger für DAMPs und PAMPs (wie LPS), die in nahe gelegenen DCs die Reifung und Aktivierung sowie deren Migration in sekundär lymphatische Gewebe bewirken. Welchen Einfluss MDP (grün markiert) nimmt ist nicht vollständig geklärt. In den sekundär lymphatischen Geweben treten die mDCs mit allogenen T-Lymphozyten (T-L) in Kontakt, was in der zweiten Phase (2) deren Aktivierung, Proliferation und Differenzierung zu Effektor-T-Lymphozyten bewirkt. Die Effektor-T-Lymphozyten migrieren daraufhin in die Zielgewebe und richten dort in einer dritten Phase (3) durch Zytotoxizität und die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren (Zytokin-sturm) erheblichen Schaden an, was die epithelialen Barrieren zusätzlich schädigt. Abbildung frei nach [219].

1.6.3. Rolle dendritischer Zellen in der GvHD und deren Modulation durch TLR-, NLR- sowie TGF β -Signalwege

Dendritische Zellen nehmen aufgrund ihrer Funktion als APCs und potenteste Aktivatoren der T-Lymphozyten eine wichtige Rolle in der Induktion der GvHD ein [1, 231–233]. Wie in Kapitel 1.2. beschrieben ist ihr Aktivierungs- und Reifungszustand maßgeblich für die Art und das Ausmaß der initiierten Immunantwort. Ausschlaggebend hierfür sind die vorherrschenden Umgebungsbedingungen, wie die Anwesenheit von PAMPs und DAMPs [10, 12, 14, 219]. So konnte gezeigt werden, dass eine keimfreie Umgebung wie auch die bakterielle Dekontamination des Darms die GvHD abschwächen [234–239], weshalb eine

prophylaktische antibiotische Darmdekontamination mittlerweile zu den Therapiestandards bei hämatopoetischen Stammzelltransplantationen zählt [238, 240].

Die Translokation von LPS durch defekte Barrieren mit nachfolgender TLR-4-vermittelter Freisetzung von TNF α gilt als wichtiger, wenn auch nicht unabdingbarer, Pathomechanismus bei der GvHD [238, 241–246]. Neben Antibiotika kann der Einsatz von Probiotika die Konzentration pathogener Bakterienbestandteile wie LPS mindern und so die GvHD abschwächen [242, 247, 248]. Auch eine direkte LPS-Antagonisierung mittels Antiserum oder LPS-Inhibitoren zeigte experimentelle Erfolge [241, 243].

Interessanter Weise sind inflammatorische Prozesse im Darm mit verminderter NOD2-Aktivität assoziiert [238, 249–251]. So konnten NOD2-Genmutationen mit chronisch entzündlichen Darmerkrankungen [242, 252–254] wie auch mit der GvHD in Verbindung gebracht werden [237, 242, 251, 255–258]. In Versuchen an Mäusen zeigte sich, dass NOD2-Defekte mit einer stärkeren APC-Aktivierung, Effektor-T-Lymphozyten-Aktivität und GvHD sowie verminderter Anzahl regulatorischer T-Zellen einhergehen [238, 251]. Auch sind NLRs und TLRs untereinander verknüpft (sog. „cross-talk“), wodurch eine MDP-vermittelte NOD2-Aktivierung TLR-Signale beeinflussen und eine überschießende Aktivierung vermeiden, jedoch die nötige Immunität gegenüber Krankheitserregern erhalten könnte [259–263].

Obwohl in manchen Studien kein signifikanter Zusammenhang zwischen verschiedenen NOD2-Genvarianten und der GvHD gefunden wurde [237, 242, 264–267], scheint der NOD2-Signalweg die Immunantwort eher zu dämpfen und protektiv gegen die GvHD zu wirken [55, 237, 238].

Auch TGF β werden immunregulatorische Eigenschaften zugesprochen, was sich auch auf die GvHD auszuwirken scheint. Versuche an Mäusen zeigten positive Effekte TGF β -behandelter DC auf die GvHD [268]. So lindert die Co-Transplantation TGF β -vorbehandelter Empfänger-DCs im Rahmen einer Knochenmarktransplantation die GvHD [269]. Ähnlich wirkt sich die Co-Transplantation TGF β -behandelter DCs eines zweiten Spenders aus [270, 271]. Daneben verursacht eine Neutralisierung von TGF β mittels Antikörpern bei Mäusen schwere Formen der akuten GvHD [272]. Humangenetische Studien konnten eine Assoziation von TGF β - und TGF β -Rezeptor-Mutationen mit einem erhöhten Erkrankungsrisiko an akuter GvHD nachweisen [273–275]. Die TGF β -Serumspiegel sinken im Rahmen der hämatopoetischen

Stammzelltransplantation drastisch ab und steigen nach Wochen gemeinsam mit den Leukozytenzahlen wieder auf das Ausgangsniveau an [268, 276, 277]. Vor dem Auftreten einer akuten GvHD kommt es erneut zu einem deutlichen TGF β -Abfall im Serum, weshalb TGF β als Biomarker für die GvHD herangezogen werden kann [268, 277, 278]. Ob die niedrigen TGF β -Spiegel ein ursächlicher Pathomechanismus der GvHD oder eine Folge der Erkrankung sind ist noch nicht geklärt [277]. TGF β ist durch die Aktivierung von Fibroblasten, Epithelzellen und glatten Muskelzellen auch an Remodeling, Fibrose und Vernarbung beteiligt [1, 268]. Bezuglich der chronischen GvHD, die durch derartige Prozesse gekennzeichnet ist, konnte eine Korrelation zwischen hohen TGF β -Serumwerten und der Erkrankung festgestellt werden [268, 276]. Eine Neutralisierung von TGF β mittels Antikörpern schwächtet im Mausmodell einige Symptome der chronischen GvHD ab [272]. Als immunmodulierendes Zytokin könnte TGF β eine erhöhte Infektanfälligkeit bedingen [268].

1.6.4. T-Lymphozyten als Effektorzellen der GvHD und des GvL-Effekts

Spender-T-Zellen lösen die GvHD aus, vermitteln jedoch auch den erwünschten GvL-Effekt („Graft versus Leukemia“, auch GvT: „Graft versus Tumor“). Die meisten Therapieansätze lindern zwar die GvHD, schränken jedoch auch die GvL-Reaktion ein [279, 280]. So ist beispielsweise bei T-Zell-freien Transplanteten das Risiko für eine GvHD geringer, jedoch verschlechtern sich gleichzeitig das Engraftment und die GvL-Effekte [1]. Aus denselben Gründen ist das Auftreten einer milden GvHD mit geringeren Rezidiv-Raten und einem verlängertem Überleben assoziiert [279, 281]. Die Herausforderung bei der Entwicklung neuer Therapieansätze ist es Möglichkeiten zu finden, die GvHD und GvL unabhängig voneinander zu beeinflussen. Mögliche Ansätze sind zum Beispiel die Expansion, Depletion oder funktionelle Modifikation verschiedener T-Zell-Subgruppen [55, 279, 280].

T_H1-Zellen vermitteln starke GvHD und GvL-Effekte, wohingegen T_H2-Zellen jeweils eher schwache Effekte vermitteln [55, 229, 279, 282]. IFN γ , das klassische Effektorzytokin der T_H1, konnte einerseits mit starken GvL-Effekten und weniger schwerer GvHD in Verbindung gebracht werden, andererseits ist es auch an der GvHD-Induktion beteiligt und nimmt somit eine komplexe Rolle mit pro- und antiinflammatorischen Eigenschaften sowie einer Antitumorkomponente ein [54, 55, 279, 283, 284].

Auch die CD62L-negativen-Memory-T-Lymphozyten (T_{EM}) stellen eine äußerst interessante T-Zell-Population da, weil sie im Unterschied zu naiven T-Lymphozyten (T_N) und T_{CM} , in Versuchen an Mäusen bei Stammzelltransplantationen keine GvHD verursachen, jedoch mitverantwortlich gemacht werden für den erwünschten GvL-Effekt [285–288]. Neben dem unterschiedlichen Antigen-Repertoire sowie anderen Migrationseigenschaften werden als Ursachen hierfür auch die spezifischen Eigenschaften der T_{EM} mitverantwortlich gemacht [289, 290]. T_{EM} sind in der Lage gegen (veränderte) Empfänger-Zellen aktiv zu werden, was den GvL-Effekt erklärt. Bei andauerndem allo-Antigenkontakt scheinen T_{EM} jedoch aktivierungsabhängig anerg zu werden, d.h. beispielweise weniger Zytokine zu produzieren, oder anfälliger für Apoptose zu werden. Somit können keine prolongierten allo-Immunreaktion und damit keine GvHD entstehen [289, 291, 292]. Empfänger-fremde Antigene, wie zum Beispiel Bestandteile pathogener Keime, werden durch T_{EM} mit passender Spezifität dennoch mit hoher Wahrscheinlichkeit erkannt und eliminiert, sodass ein hinreichender Schutz vor Infektionen besteht [292]. Des Weiteren sollen T_{EM} das Engraftment beschleunigen [286, 292].

Ein weiterer Ansatz ist der Transfer regulatorischer T-Lymphozyten, die in ausreichend hohen Konzentrationen in Versuchen an Mäusen eine GvHD verhindern, wobei die GvL-Effekte erhalten bleiben [55, 280, 293–296]. Mittlerweile konnte auch in ersten klinischen Studien eine Schutzfunktion der T_{reg} vor der GvHD nachgewiesen werden [280, 297]. Problematisch bleiben bislang noch die rechtzeitige Expansion und Isolation ausreichender Mengen an T_{reg} und die begrenzte Linienspezifität der T_{reg} (Plastizität) vor allem im Hinblick auf eine Umwandlung in Effektorzellen [280, 298].

1.6.5. Einfluss von Vitamin D und Vitamin A auf die GvHD

Vitamin D moduliert T-Zell-vermittelte Immunantworten durch die Induktion tolerogener DCs sowie regulatorischer T-Lymphozyten, Hemmung T-Zellproliferation, Verschiebung des T_H1/T_H2 -Gleichgewichts zugunsten der T_H2 , Hemmung der Sekretion inflammatorischer Zytokine und durch Suppression der zytotoxischen Aktivität von $CD8^+CTL$ (siehe Kapitel 1.4.3.) [110, 115, 152, 299]. Deshalb liegt auch ein lindernder Einfluss von Vitamin D auf die T-Zell-vermittelte GvHD nahe [300].

In Versuchen an Ratten konnte die GvHD durch ein synthetisches Vitamin D Analogon deutlich reduziert werden [301]. In humangenetischen Untersuchungen konnte ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen im Vitamin-D-Rezeptor mit dem Auftreten schwerer GvHD-Formen nachgewiesen werden [302, 303]. Klinische Studien zeigten, dass die 25VD- und 1,25VD-Serumspiegel im Rahmen hämatopoetischer Stammzelltransplantationen deutlich absinken und sich erst im Verlauf wieder normalisieren. Anhaltend niedrige Serumspiegel sind mit dem Auftreten einer schweren GvHD assoziiert [129, 304, 305]. Eine prophylaktische UVB-Bestrahlung im Rahmen der hämatopoetischen Stammzelltransplantation erhöht die 25VD-Serumspiegel, ist mit einer erhöhten Anzahl zirkulierender CD4⁺FOXP3⁺T_{reg} und mit einem geringeren Ausmaß der GvHD assoziiert [305]. Auch eine Vitamin-D-Substitution im Rahmen hämatopoetischer Stammzelltransplantationen scheint sich positiv auf die GvHD auszuwirken [300].

Retinsäure kann (zusammen mit TGFβ) ebenfalls T_{reg} induzieren und die Sekretion proinflammatorischer Zytokine hemmen. Unter inflammatorischen Umgebungsbedingungen soll RA jedoch die DC-Reifung, T-Lymphozyten-Aktivierung, T-Zell-Proliferation, T_H1- und T_H17-Polarisation sowie Effektorzytokinsekretion verstärken, was die gegensätzlichen Funktionen der RA unterstreicht (siehe Kapitel 1.5.3.) [110, 163]. In Versuchen an Mäusen zeigte sich eine agravierte intestinale GvHD und erhöhte Mortalität unter dem Einfluss von RA [306, 307]. Eine Vitamin-A-arme Ernährung verlängert analog dazu das Überleben und lindert die intestinale GvHD [308]. In anderen Versuchen bewirkte RA jedoch eine Abnahme der akuten GvHD durch Induktion regulatorischer T-Zellen [309]. Die unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich zumindest teilweise dadurch erklären, dass RA die Migrationseigenschaften der T-Lymphozyten beeinflusst (Induktion des Darm-Homing), was eine Veränderung der Zielorgane der GvHD zur Folge haben kann [308].

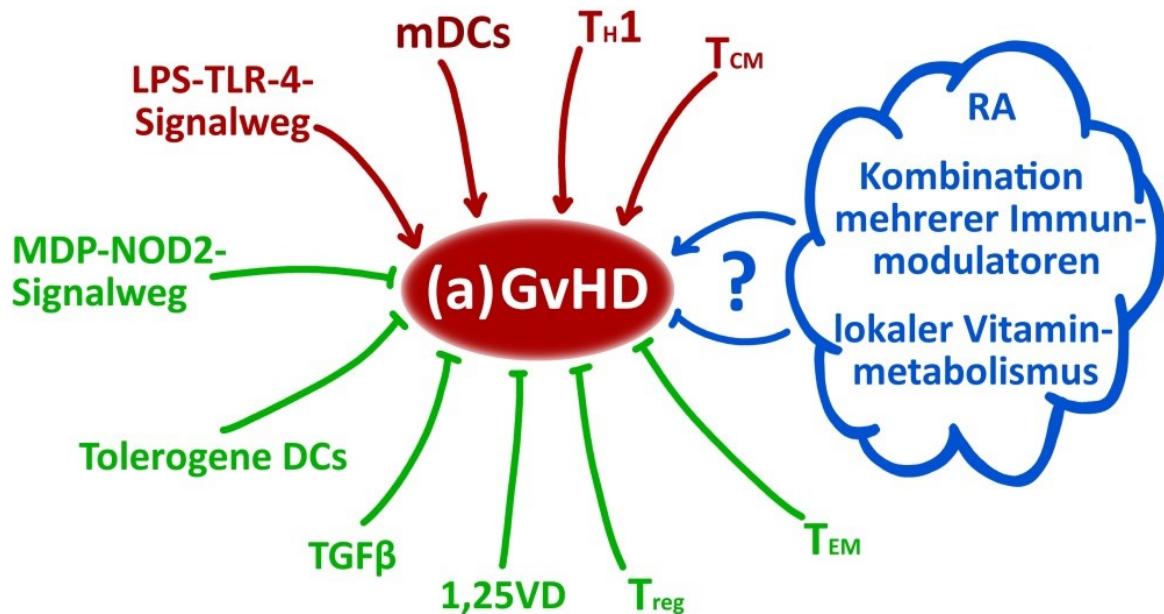


Abbildung 1-11: Modulation der GvHD

Mehrere Einflussfaktoren sollen das Auftreten und die Schwere der akuten Graft-versus-Host Disease (GvHD) modulieren. Verstärkend sollen der LPS-TLR-4-Signalweg, mDCs, T_{H1} und T_{CM} wirken (rot markiert). Lindernde Effekte sind dagegen für den MDP-NOD2-Signalweg, tolerogene DCs, TGFβ, 1,25VD, T_{reg} und T_{EM} beschrieben (grün markiert). Wie genau sich Retinsäure, die Kombination mehrerer Immunmodulatoren (TGFβ, Vitamine A und D, LPS, MDP) sowie der lokale Vitamin D und A Metabolismus (blau markiert) auf die GvHD auswirken ist noch nicht genau geklärt und wird in dieser Arbeit genauer untersucht. Eigene zusammenfassende Abbildung der im Text beschriebenen Effekte.

2. Zielsetzung

Die GvHD limitiert den Erfolg hämatopoetischer Stammzelltransplantationen. T-Zell-vermittelte Immunantworten lösen dabei sowohl die Erkrankung selbst als auch den erwünschten GvT-Effekt aus. Um neue Therapieansätze zu finden ist eine genauere Charakterisierung der beteiligten Zellen und Einflussfaktoren nötig. Versuche an Mäusen, gentechnische Untersuchungen und klinische Studien deuteten auf einen Einfluss der Vitamine D und A, tolerogener Zellgruppen (tolerogene DCs, T_{reg}) sowie von PRR-Signalwegen (TLR, NLR) hin.

DCs induzieren T-Zell-vermittelte Immunantworten, wobei das umgebende Mikromilieu die Zellfunktion und damit Art und Ausmaß der Immunantwort entscheidend beeinflusst. Abhängig ist dieses Mikromilieu einerseits von der Anwesenheit bakterieller Stimuli, Zytokine und Vitamine, jedoch auch von der zelleigenen Zytokinproduktion und Metabolisierung von Vitaminvorstufen.

Ziel dieser Arbeit war es daher T-Zell-vermittelte Immunantworten unter der Einwirkung verschiedener Umgebungsbedingungen und den Vitamin-Metabolismus dendritischer Zellen genauer zu untersuchen. Zu diesem Zweck wurden DCs und T-Lymphozyten verschiedener Spender zusammengebracht um allogene Immunreaktionen (MLR⁹) auszulösen und die Wirkung der Vitamine A und D, bakterieller Stimuli (LPS, MDP) sowie eines Zusammenwirkens mehrerer Umgebungsbedingungen auf die T-Lymphozyten-Proliferation, deren Polarisation und Effektorfunktionen herauszuarbeiten. Um die Rolle tolerogener DCs genauer zu charakterisieren wurden die Ergebnisse dieser Versuche verglichen mit weiteren Ansätzen in denen TGFβ-vorbehandelte DCs eingesetzt wurden.

DCs setzen 25VD zum biologisch aktiven 1,25VD um, wodurch das aktive Vitamin im Mikromilieu seine Effekte ausüben kann. Analog hierzu wurde die Fähigkeit der DCs und TGFβ-DCs untersucht auch Retinal in die biologisch aktive Retinsäure umzusetzen, was die lokalen Bedingungen und damit die T-Zell-vermittelte Immunantwort entscheidend beeinflussen könnte.

⁹ MLR, „mixed leucocyte reaction“, gemischte Leukozytenreaktion

3. Material

3.1. Geräte

Gerät	Hersteller
CASY® Modell TT	Innovatis™, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Deckgläschen	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Elutriator Avanti® J-20 XP, Rotor JE-5.0	Beckman Coulter® GmbH, Krefeld
FilterMate™ Cell Harvester	PerkinElmer® Inc., Rodgau
Inkubatoren BBD 6220	Krendo Laboratory Products, Haereaus® Holding GmbH, Hanau
LSR II analyzer	BD™, Heidelberg
Mikroskope	Carl Zeiss Microscopy GmbH, Jena
Multipipette HandyStep®	Brand GmbH & Co. KG, Wertheim
Multipipette® plus	Eppendorf AG, Hamburg
Neubauer improved Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Pipetboy	Integra Biosciences AG, Zizers, Schweiz
Pipette Research® (fix), 100µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipette Research® (Mehrkanal), 30-300µl	Eppendorf AG, Hamburg
Pipetten Research® (variabel), 0,5-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilbank LaminAir® HA 2472	Haereaus® Holding GmbH, Krendo Laboratory Products, Hanau
TopCount® NXT™	PerkinElmer® Inc., Rodgau
Trennkammer für Gegenstromzentrifugation	Beckman Coulter® GmbH, Krefeld
Vortexer	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage LP1200S	Sartorius AG, Göttingen
Zentrifuge Avanti® J-20KP, Rotor JE-5.0	Beckman Coulter® GmbH, Krefeld
Zentrifuge Megafuge 3.0	Krendo Laboratory Products, Haereaus® Holding GmbH, Hanau
Zentrifuge Sorvall RC 6 plus	Thermo Fisher Scientific™ Inc., Schwerte

Tabelle 3-1: Geräte

3.2. Verbrauchsmaterialien

Artikel	Hersteller
CASY® cups	Innovatis™, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
Combitips® und Combitips® plus (Dispenserspitzen für Multipipette) 0,5ml, 2,5ml, 5ml, 10ml	Eppendorf AG, Hamburg
Einmalfilter Minisart® 0,45µm, 0,8µm	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen
Einmalpipetten 2,5ml, 10ml, 25ml, 50ml	Costar®, Corning® Inc., New York, USA
Einmalspritzen	BD Discardit™, Heidelberg
ept.I.P.S.® Pipettenspitzen 20µl, 200µl, 300µl, 1000µl	Eppendorf AG, Hamburg

Artikel	Hersteller
FACS-Röhrchen steril	BD Falcon™, Heidelberg
Konische Zentrifugenröhren 50ml, 225ml	BD Falcon™, Heidelberg
Kryogefäß	Nalgene™, Thermo Fisher Scientific Inc., New York, USA
Kryoröhrchen	Nunc™, Thermo Fisher Scientific Inc., Roskilde, Dänemark
Reaktionsgefäß 1,5ml, 2,0ml	Eppendorf AG, Hamburg
Sterilfilter	Millipore GmbH, Schwalbach/Ts.
U-Boden Mikrotitierplatten 96Well, 6Well	BD Falcon™, Heidelberg
UniFilter-96 GF/C, White 96-well Barex Microplate with 1.2 µm poresize GF/C filter	PerkinElmer® Inc., Rodgau
Zellkulturflaschen 25m², 75m², 162m²	Costar®, Corning® Inc., New York, USA

Tabelle 3-2: Verbrauchsmaterialien

3.3. Chemikalien, Flüssigkeiten, Farbstoffe

Substanz	Hersteller
AB-Serum	Rotes Kreuz München
CASY®blue	Innovatis™, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CASY®ton	Innovatis™, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim
CompBeads Anti-Mouse Ig, κ und CompBeads Negative Control (FBS)	BD™, Heidelberg
9cis-Retinsäure (9cisRA)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DAPI	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
DMSO	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Dulbecco's PBS (PBS)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
FACS Clean Solution	BD FACSTM, Heidelberg
FACS Flow Solution	BD FACSTM, Heidelberg
FACS Rinse Solution	BD FACSTM, Heidelberg
FCS	PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich
GM-CSF	Leucomax®, Novartis Pharma GmbH, Nürnberg
H ₂ O ₂ 30% (v/v)	Otto Fischer GmbH & Co. KG, Saarbrücken
HANKS-Puffer	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
IFNy, Imukin®, Injektionslösung	Boehringer Ingelheim Pharma GmbH & Co. KG, Ingelheim am Rhein
IL-4	Promokine, PromoCell GmbH, Heidelberg
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
LPS	Alexis®, Enzo® Life Science GmbH, Grünberg
[Methyl- ³ H]Thymidin (1mCi/ml)	Amersham™, GE Healthcare GmbH, Braunschweig
MDP	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
MikoScint™-20	PerkinElmer® Inc., Rodgau

Substanz	Hersteller
0,9% NaCl-Lösung	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Pancoll	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach
PFA Pulver	Merck KGaA, Darmstadt
Penicillin	Gibco™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
2-Propanol 70% (v/v) (Isopropanol)	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Retinal	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
RPMI 1640 w/o L-Glutamine	Life Technologies GmbH, Darmstadt
steriles Wasser	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Streptomycin	Gibco™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
TGFβ (Recombinant Human TGFβ ₁)	Pepro Tech® GmbH, Hamburg
Trypanblau	Gibco™, Life Technologies GmbH, Darmstadt
1,25VD	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
25,VD	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen

Tabelle 3-3: Chemikalien, Farbstoffe, Medien

Substanzen die nicht in der Tabelle erwähnt sind wurden von den Firmen Merck KGaA (Darmstadt) und Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Taufkirchen) bezogen.

3.4. Kits

Substanz	Hersteller
ALDEFLUOR™ kit	Stemcell™ Technologies SARL, Grenoble, Frankreich
Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit	BD Cytofix/Cytoperm™, Heidelberg
FOXP3 / Transcription Factor Staining Buffer Set	eBioscience® Inc., Frankfurt
Leukocyte Activation Cocktail, with BD GolgiPlug™	BD Pharmigen™, Heidelberg

Tabelle 3-4: Kits

3.5. Medien, Puffer, Lösungen

Bezeichnung	Herstellung
AB-Serum-haltiges Medium (5% v/v)	Standardmedium, 5% AB-Serum
DAPI-Arbeitslösung	PBS, 10µg/ml DAPI
Einfriermedium	Standardmedium, 10% FCS, 10% DMSO
FACS-Waschpuffer	PBS, 10% FCS
FCS-haltiges Medium (10% v/v)	Standardmedium, 10% FCS
H ₂ O ₂ -Lösung (6% v/v)	400ml Steriles Wasser, 100ml H ₂ O ₂ (30% v/v)
PFA-Lösung (1% w/v)	5g PFA-Pulver, 500ml PBS
Standardmedium	RPMI 1640 w/o L-Glutamine , 50U/ml Penicillin, 50µg/ml Streptomycin, 2mmol/l L-Glutamin
Trypanblaulösung (0,2% w/v)	0,2g Trypanblau, 100ml 0,9% NaCl-Lösung

Tabelle 3-5: Medien, Puffer, Lösungen

3.6. Spenderzellen

Monozyten, Elutriationsfraktion III		Lymphozyten, Elutriationsfraktion IIa	
09.11.2011	FACS-Experiment 1 (FOXP3, Zytokine, Oberfläche)	26.09.2011	FACS- Experiment 1 FACS- Experiment 2 (Zytokine)
14.11.2011	FACS- Experiment 2 (FOXP3, Oberfläche)	10.11.2011	FACS- Experiment 2
08.12.2011	FACS- Experiment 2 (Zytokine) FACS- Experiment 3 (FOXP3, Zytokine, Oberfläche)	13.12.2011	FACS- Experiment 3
09.01.2011	FACS- Experiment 4 (FOXP3, Zytokine, CD62L)	10.01.2011	FACS- Experiment 4
10.01.2011	FACS- Experiment 5 (FOXP3, Zytokine, Oberfläche)	09.01.2011	FACS- Experiment 5
06.02.2011	ALDEFLUOR- Experiment 1	05.03.2012	FACS- Experiment 6, 8
27.02.2012	FACS- Experiment 6 (FOXP3, CD62L, CD8 $\alpha\alpha$) ALDEFLUOR- Experiment 2	27.02.2012	FACS- Experiment 7
05.03.2012	FACS- Experiment 7 (FOXP3) ALDEFLUOR- Experiment 3		
12.03.2012	FACS- Experiment 8 (FOXP3, Zytokine, CD62L, CD8 $\alpha\alpha$) ALDEFLUOR- Experiment 4		
19.03.2012	ALDEFLUOR- Experiment 5		

Tabelle 3-6: Spenderzellen

3.7. Antikörper

3.7.1. Spezifische Antikörper

Spezifität ¹⁰	Isotyp	Konjugat	Ursprung	Klon	Hersteller
$\alpha\beta$ -TCR	IgM	PE	Maus	T10B9.1A-31	BD Pharmingen™, Heidelberg
$\gamma\delta$ -TCR	IgG _{1k}	FITC	Maus	B1	BD Pharmingen™, Heidelberg
CD1a	IgG _{1k}	PE	Maus	SFCI19Thy1A8	Beckman Coulter® GmbH, Krefeld
CD3	IgG _{1k}	APC	Maus	UCHT1	BD Pharmingen™, Heidelberg
CD3	IgG _{1k}	APC-Cy™7	Maus	SK7	BD Pharmingen™, Heidelberg
CD3	IgG _{2ak}	FITC	Maus	HIT3a	BD Pharmingen™, Heidelberg
CD4	IgG _{1k}	V450	Maus	RPA-T4	BD Horizon™, Heidelberg
CD8 α	IgG _{1k}	PE-Cy™7	Maus	SK1	BioLegend® Inc., San Diego, Kalifornien, USA
CD8 β	IgG _{2ak}	APC	Maus	2ST8.5H7	BD FastImmune™, Heidelberg
CD25	IgG _{1k}	APC	Maus	2A3	BD™, Heidelberg;
CD45RO	IgG _{2ak}	PE	Maus	UCHL1	BD™, Heidelberg;

¹⁰ Reaktivität: anti-human (bei allen verwendeten Antikörpern)

Spezifität ¹⁰	Isotyp	Konjugat	Ursprung	Klon	Hersteller
CD45RO	IgG _{1k}	PE-Cy™5	Maus	UCHL1	BD Pharmingen™, Heidelberg
CD62L	IgG _{1k}	APC	Maus	DREG-56	BD Pharmingen™, Heidelberg
CD247 (pY142) (CD3ζ)	IgG _{2ak}	PE	Maus	K25-407.69	BD Phosflow™, Heidelberg
CD279 (PD-1)	IgG _{1k}	FITC	Maus	MIH4	BD Pharmingen™, Heidelberg
FOXP3	IgG _{2ak}	PE	Ratte	PCH101	eBioscience® Inc., Frankfurt
IFNγ	IgG _{1k}	FITC	Maus	B27	BD Pharmingen™, Heidelberg
IL-2	IgG _{2ak}	PE	Maus	MQ1-17H12	BD Pharmingen™, Heidelberg

Tabelle 3-7: Antikörper

3.7.2. Isotypen

Isotyp	Konjugat	Ursprung	Klon	Hersteller
IgG _{1k}	APC	Maus	MOPC-21	BD Pharmingen™, Heidelberg
IgG _{1k}	APC-Cy™7	Maus	MOPC-21	BD Pharmingen™, Heidelberg
IgG _{1k}	PE-Cy™7	Maus	MOPC-21	BioLegend® Inc., San Diego, Kalifornien, USA
IgG _{1k}	V450	Maus	MOPC-21	BD Horizon™, Heidelberg
IgG ₂	PE	Ratte	k.A.	eBioscience® Inc., Frankfurt
IgG _{2ak}	APC	Maus	G155-178	BD Pharmingen™, Heidelberg
IgG _{2ak}	PE-Cy™5	Maus	G155-178	BD Pharmingen™, Heidelberg
IgG _{ges}	FITC	Maus	k.A.	Beckman Coulter® GmbH, Krefeld
IgG _{ges}	PE	Maus	k.A.	Beckman Coulter® GmbH, Krefeld
IgM _k	PE	Maus	G155-228	BD Pharmingen™, Heidelberg

Tabelle 3-8: Isotypen

3.8. Software und Datenbanken

Software / Datenbank	Hersteller / URL
BD FACSDiva™ Software	BD™, Heidelberg
Citavi Team 3.2.0 und Team 4.3.0.15	Swiss Academic Software GmbH, Wädenswil, Schweiz
CorelDRAW Graphics Suit X5	Corel Corporation, Unterschleißheim
FlowJo	Tree Star Inc., Ashland, Oregon, USA
Gimp 2.8.10	S. Kimball, P. Mattis und das GIMP-Entwicklerteam Free Software Foundation, Inc., Boston, USA
GraphPad Prism® 5.02	GraphPad Software Inc., La Jolla, Kalifornien, USA
LEO Wörterbuch	http://dict.leo.org/ende/index_de.html
Microsoft Office Professional 2010	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim
Mac OS X Lion 10.7.4	Apple Inc., Cupertino, Kalifornien, USA
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/
Wikipedia	https://www.wikipedia.de/
Windows® 7, Windows® 8	Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

Tabelle 3-9: Software

4. Methoden

Sofern nicht gegenteilig beschrieben erfolgte die Zentrifugation von Zellsuspensionen zum Ernten und Waschen jeweils 8min bei 300×g und 4°C.

4.1. Zählen von Zellen

Die Ermittlung von Zellkonzentrationen erfolgte, soweit nicht anders angegeben, mithilfe der Neubauerzählkammer. Durch Anfärben mit Trypanblaulösung konnten hierbei tote Zellen von den vitalen abgegrenzt werden [310].

Aus 50µl Zellsuspension und jeweils 50µl Trypanblaulösung (0,2% w/v) wurde eine Verdünnungsreihe hergestellt und im Anschluss die Neubauer „improved“ Zählkammer mit der stärksten Verdünnung beschickt um die vier Großquadrate der Kammer im Phasenkontrastmikroskop auszuzählen. Aus dem Mittewert N der gezählten Zellen in den Großquadranten (1mm² Fläche, 0,1mm Tiefe ⇒ 0,1µl Volumen) und dem Verdünnungsfaktor V wurde dann die Zellkonzentration c errechnet [311]:

$$c [10^6 \text{Zellen/ml}] = N \times V \div 100$$

4.2. Einfrieren von Lymphozyten

Die aus der Elutriation erhaltene Fraktion IIa, die vor allem Lymphozyten enthält (siehe Kapitel 4.6.), wurde in zwei 50ml Zentrifugenröhren abzentrifugiert, resuspendiert, zusammengeführt und gezählt. Je 20×10^6 Lymphozyten in 1,8ml Einfriermedium wurden in ein Kryoröhrchen gegeben. Die Röhrchen wurden in einer Isopropanol-gefüllten Kryobox für einige Tage bei -80°C gelagert [310]. Diese Box ermöglicht ein langsames, kontinuierliches Abkühlen der Zellen um ca. 1°C/min [312]. Die endgültige Aufbewahrung erfolgte schließlich in flüssigem Stickstoff bei -196°C.

4.3. Auftauen von Lymphozyten

Um die Lymphozyten wieder aufzutauen wurden die Kryoröhrchen bei Raumtemperatur erwärmt. Sofort nach dem Schmelzen wurde die Zellsuspension in warmes AB-Serum-haltiges Medium aufgenommen, anschließend abzentrifugiert, resuspendiert und gezählt [310].

4.4. Leukapherese – Gewinnung mononukleärer Zellen

Alle verwendeten Zellen stammen von gesunden Spendern. In der Abteilung für Transfusionsmedizin des Uniklinikums Regensburg wurden die Spender dafür über ein Zweischlauchsystem an ein Apherese-Gerät angeschlossen. Einer der Schläuche leitete das venöse Vollblut des Spenders ins Gerät, wobei es zur Antikoagulation mit Natriumcitrat versetzt wurde. Im Apherese-Gerät erfolgte durch Zentrifugation die Auftrennung der Blutbestandteile gemäß ihrer Sedimentationsgeschwindigkeit. Entnommen wurden lediglich ein Konzentrat mononukleärer Zellen (MNC-Konzentrat), sowie eine Plasmakonserve. Die anderen Blutbestandteile wurden dem Spender über den zweiten Schlauch intravenös reinfundiert [313].

4.5. Dichtegradientenzentrifugation

Das gewonnene MNC-Konzentrat wurde mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation weiter aufgereinigt. Hierzu wurde das Blutkonzentrat zunächst 1:1 mit PBS verdünnt. Im Anschluss wurden in mehrere 50ml Zentrifugenrörchen je 15ml Leukozyten-Separationslösung (Pancoll, Dichte: 1,077g/l) vorgelegt und mit 25ml der Blutsuspension beschichtet. Durch Zentrifugation (30min, 700g, RT) trennten sich vier Phasen voneinander ab. Am Boden der Zentrifugenrörchen setzte sich die dichteste Phase aus Erythrozyten und Granulozyten ab. Die nächsten drei Schichten bildeten die Pancollphase, die ihr aufgelagerte Interphase, die v.a. MNCs (Lymphozyten und Monozyten) enthielt und der Überstand mit Plasma, Thrombozyten und dem zugegebenen PBS. Die Interschicht wurde vorsichtig abgenommen, zweimal gewaschen, in 200ml PBS resuspendiert und gezählt [314–316].

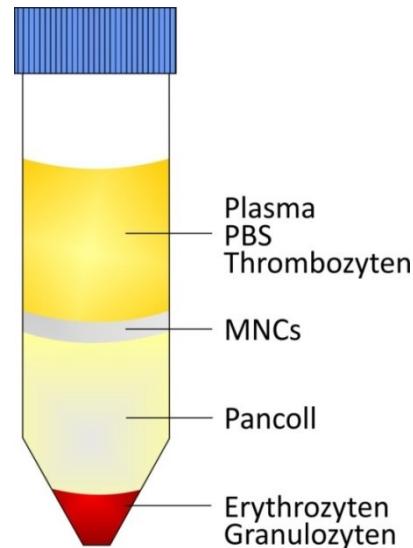


Abbildung 4-1:
Dichtegradientenzentrifugation
Nach Zentrifugation mit Leukozytenseparationslösung (Pancoll) trennen sich das MNC-Konzentrat nach Dichte (Erythrozyten/Granulozyten, Pancoll, MNCs, Plasma/PBS/Thrombozyten). Die Interphase, die die MNCs enthielt (grau) wurde in der Folge weiterverwendet. Abbildung frei nach [314]

4.6. Gegenstrom-Elutriation – Auftrennung der mononukleären Zellen

Zur weiteren Auftrennung der Spenderzellen erfolgte die Gegenstrom-Elutriation (kurz: „Elutriation“). Diese Methode trennt die Zellsuspension durch Zentrifugation und einen zentripetal angelegten Pumpendruck nach Größe, Dichte und Form der Zellen auf [315]. Die Zellsuspension strömt durch ein Schlauchsystem von außen in eine rotierende doppelpyramidenförmige Kammer ein.

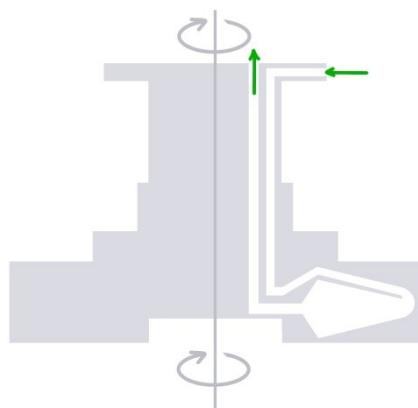


Abbildung 4-2: Elutriation: Rotor

In Form eines schematischen Schnittbilds ist hier der zur Elutriation verwendete Zentrifugeneinsatz (Rotor) dargestellt. In der Mitte ist die Zentrifugationsachse angetragen und mit grauen Pfeilen die Rotationsrichtung markiert. Die Kammer und das angeschlossene Schlauchsystem sind im rechten Bildteil zu erkennen (weiß). Die grünen Pfeile markieren die Richtung des angelegten Pumpendrucks und somit die Flussrichtung. Der im linken Bildteil dargestellte Teil des Rotors stellt lediglich ein Gegengewicht da. Abbildung frei nach [317].

Die nach außen gerichtete Zentrifugalkraft und der angelegte Pumpendruck (Gegenstrom) sorgen für die Verteilung der Zellen in der Kammer, wobei sich ein Gleichgewichtszustand einstellt, in dem die Sedimentationsgeschwindigkeit der Partikel in der Kammer Null ist. Bei Erhöhung des Pumpendrucks strömt die erste Fraktion in die zur Zentrifugationsachse gerichtete Spitze der Kammer und anschließend in den dort befindlichen Abflussschlauch. Unter schrittweiser Erhöhung des Pumpendrucks und somit der Flussrate (Gegenstrom) lassen sich so verschiedene Fraktionen voneinander abtrennen [314].

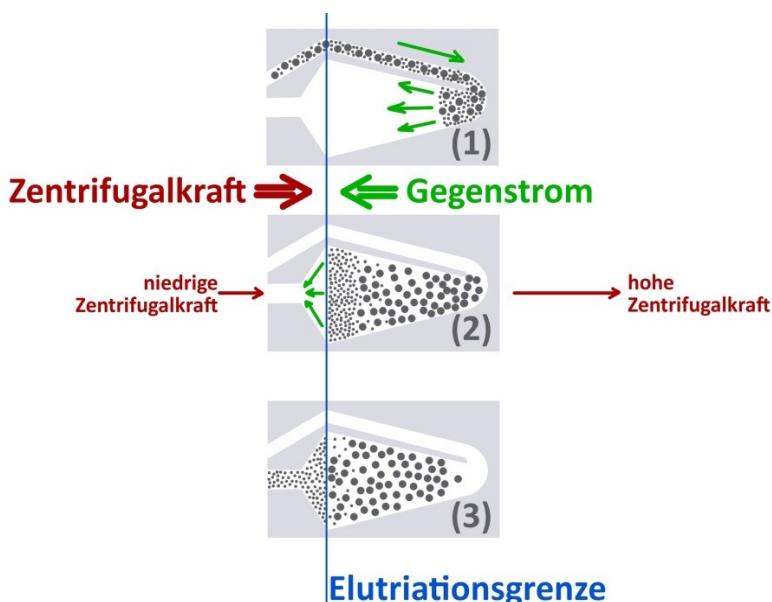


Abbildung 4-3: Prinzip der Elutriation

Hier ist der Ablauf der Elutriation schematisch gezeigt. Zunächst wird die Zellsuspension in die Kammer geleitet (1). In (2) ist ein Gleichgewichtszustand zwischen Zentrifugalkraft (rot) und Gegenstrom (grün) dargestellt. Die Zellen haben sich gemäß ihrer Größe, Dichte und Form in der Kammer verteilt. Wird nun der Gegenstrom schrittweise erhöht werden die Zellfraktionen zur Zentrifugationsachse hin aus der Kammer gedrückt (3). Abbildung frei nach [317].

Methoden

Hierbei wurde wie folgt vorgegangen. Als Vorbereitung erfolgte die Desinfektion des Schlauch-Kammersystems mit H₂O₂-Lösung (6% v/v) mit anschließender PBS-Spülung. Durch Zentrifugation (1400×g, 10min, 18°C) wurde die vom Spender entnommene Plasmakonserve von Zellresten und Thrombozyten gereinigt; je 500ml HANKS-Puffer wurden mit 30ml Plasma versetzt. Mit der erhaltenen Mischung wurde nun das Schlauch-Kammersystem weiter gespült und im Anschluss die Pumpe auf gewisse Flussraten geeicht.

Nun wurde die aus der Dichtegradientenzentrifugation erhaltene MNC-Suspension unter definiertem Pumpendruck in das Schlauch-Kammersystem eingeleitet. Unter ständiger Zentrifugation wurde der Pumpendruck gemäß der Eichkurve schrittweise erhöht und die über den Abflussschlauch ausströmenden Fraktionen aufgefangen und gezählt. Auf diese Weise konnten folgende Fraktionen voneinander abtrennt werden:

Fraktion	Volumen (ml)	Flussrate (ml/min)	Vorherrschender Zelltyp
Ia	1000	52	Thrombozyten
Ib	1000	57	
IIa	1000	64	
IIb	500	74	B- und T- Lymphozyten , natürliche Killerzellen
IIc	400	82	
IId	400	92	
III	800	130	Monozyten

Tabelle 4-1: Elutriation: Fraktionen, Volumen, Flussrate

Die Tabelle gibt die bei der Elutriation separierten Fraktionen (linke Spalte) mit dem jeweiligen Volumen der Fraktion, der verwendeten Flussrate des Gegenstroms und des jeweils vorherrschenden Zelltyps wieder.

Die Fraktion IIa, die vor allem Lymphozyten enthält, wurde im Anschluss kryokonserviert (siehe Kapitel 4.2.) um zu einem anderen Zeitpunkt für die MLR zur Verfügung zu stehen.

Nach zwei Waschschriften wurde die Fraktion III in 45ml Standardmedium resuspendiert und die hierin enthaltenen Monozyten gezählt.

Die Reinheit der MNC und Monozyten, sowie deren Zytokinausschüttung wurden im Rahmen der Laborroutine von Alice Peuker mittels FACS und ELISA getestet.

4.7. Generierung dendritischer Zellen und TGF β -dendritischer Zellen

Um die aus der Elutriation erhaltenen Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen (iDC) zu differenzieren wurden 20×10^6 Monozyten in 30 ml FCS-haltigem Serum mit 144U/ml IL-4 und 244U/ml GM-CSF versetzt und in Zellkulturflaschen sieben bis acht Tage bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte inkubiert [6].

Um TGF β -dendritische Zellen (TGF β -DC) zu erhalten wurden derselben Mischung zusätzlich 10ng/ml TGF β hinzugefügt, die Inkubation erfolgte in gleicher Weise [318].

4.8. MLR (Mixed Leukocyte Reaction)

In einer MLR werden Leukozyten zweier verschiedener Spender *in vitro* zusammengegeben. In dieser Arbeit wurden Lymphozyten eines Spenders mit dendritischen Zellen eines anderen Spenders zusammengebracht. Die Lymphozyten wurden durch die fremden MHC-Komplexe aktiviert und zur Differenzierung und Proliferation angeregt (siehe Abbildung 4-4) [1, 2].

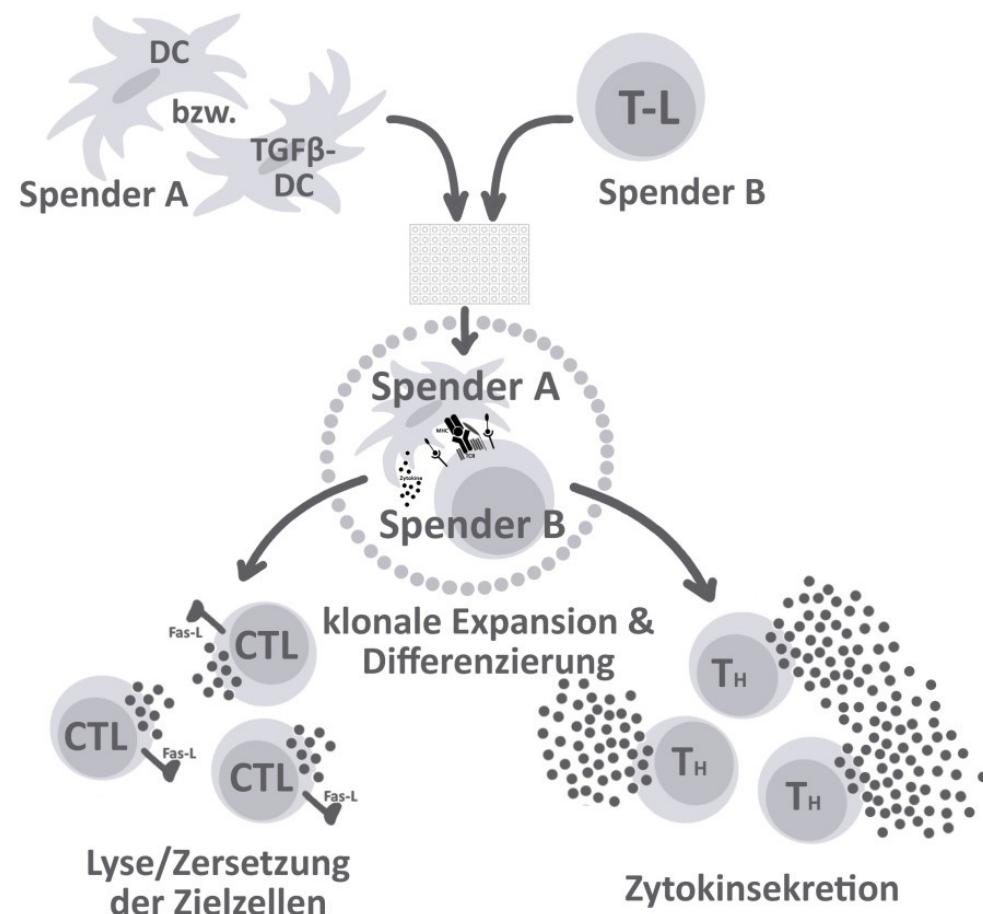


Abbildung 4-4: MLR
Dargestellt sind schematisch die Vorgänge in einer MLR. Lymphozyten (T-L) des Spenders B werden mit DCs oder TGF β -DCs des Spenders A zusammengebracht. Die Lymphozyten werden durch die Erkennung der fremden MHC-Moleküle zur klonalen Expansion und Differenzierung angeregt. Es bilden sich Effektor-T-Lymphozyten. Abbildung frei nach [1]

Methoden

Die hierfür benötigten iDC bzw. TGF β -DC wurden wie oben beschrieben aus Monozyten differenziert und nach sieben bzw. acht Tagen aus den Kulturflaschen entnommen, abzentrifugiert, resuspendiert und gezählt. Die Lymphozyten eines anderen Spenders wurden aufgetaut und ebenfalls gezählt.

Angesetzt wurde die MLR in AB-Serum-haltigem Medium in 96-Well-U-Boden-Mikrotiterplatten. Das Endvolumen betrug jeweils 200 μ l/well. Vor der Verwendung wurde das Medium filtriert. In jede Vertiefung wurden außerdem 100'000 Lymphozyten sowie 10'000 iDC oder 10'000 TGF β -DC gegeben.

Um die Wirkung verschiedener bakterieller Stimuli miteinander zu vergleichen, wurden mehrere MLR Ansätze pipettiert. Einige dieser Ansätze blieben ohne Stimulus, einige wurden mit 10ng/ml LPS versetzt, einige mit 100ng/ml MDP und einige mit LPS und MDP in denselben Konzentrationen.

Des Weiteren wurden vitaminfreie Ansätze verglichen mit solchen, die die Vitaminvorstufen Calcidiol (25VD, 5×10^{-8} mol/l), Retinal (10^{-6} mol/l) bzw. eine Kombination aus beiden Vorstufen in den gleichen Konzentrationen enthielten. Als letzte Vergleichsmöglichkeit wurden Ansätze erstellt, die die biologisch aktiven Vitamine Calcitriol ($1,25$ VD, 5×10^{-9} mol/l), Retinsäure (9cisRA, 10^{-7} mol/l), sowie eine Kombination dieser enthielten. Für die Experimente in denen die Proliferation gemessen wurde, wurden die iDC (bzw. TGF β -DC) zusätzlich in einer Verdünnungsreihe eingesetzt (20000 iDC/Well, 10000 iDC/Well, 5000 iDC/Well, usw.). Nachdem alle Zellen und Zusätze in den jeweiligen Vertiefungen waren wurden die Mikrotiterplatten abzentrifugiert und für vier, sechs bzw. sieben Tage bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte inkubiert. Die Abbildung 4-5 stellt eine Übersicht über die verschiedenen MLR-Ansätze sowie die Folgeexperimente dar.

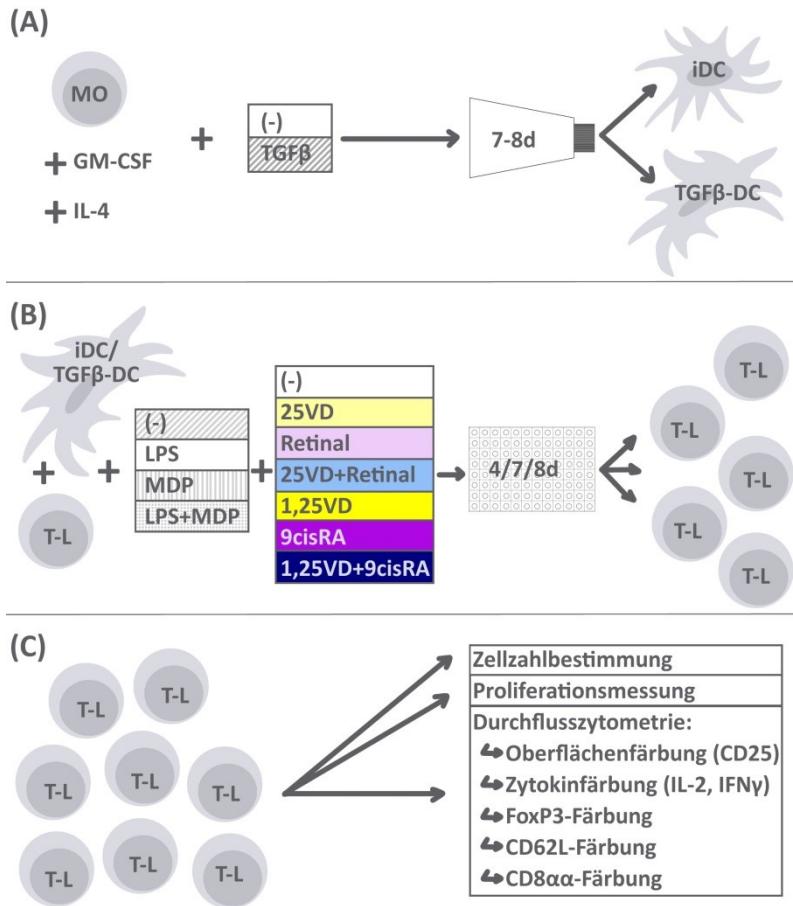


Abbildung 4-5: Übersicht über die MLR-Ansätze und Folgeexperimente
(A) Monozyten (MO) wurden 7-8 Tage mit GM-CSF und IL-4 behandelt und so zu iDC differenziert. Anderen Monozyten wurde zusätzlich 10ng/ml TGF β zugesetzt. Es entstanden TGF β -DCs.

(B) Die so erhaltenen iDC und TGF β -DC wurden nun mit allogenen Lymphozyten (T-L) in einer MLR zusammengebracht. Es kamen je nach Ansatz 10ng/ml LPS, 100ng/ml MDP, beide bakteriellen Stimuli oder zur Kontrolle keiner der Stimuli (-), sowie 5×10^{-8} mol/l 25VD, 10^{-6} mol/l Retinal, eine Kombination aus beiden Vitaminvorstufen oder die biologisch aktiven Vitamine 1,25VD (5×10^{-9} mol/l), Retinsäure (9cisRA, 10^{-7} mol/l), eine Kombination aus beiden aktiven Vitaminen oder kein Vitamin (-) hinzu.
(C) Am vierten bzw. siebten Tag der MLR wurden die T-Zellzahl mithilfe des CASY® Zellzähl- und Analysegerät bestimmt sowie die Zell-Proliferation im [Methyl- 3 H]Thymidin-Proliferationstest gemessen. Am achten Tag der MLR wurden verschiedene Färbungen zur späteren durchflusszytometrischen Analyse durchgeführt.

4.9. Bestimmung der Zellzahl mittels CASY®

Anhand der Bestimmung der Zahl enthaltener vitaler Zellen konnten die verschiedenen MLR-Ansätze an zwei Tagen (Tag vier und Tag sieben der MLR) miteinander verglichen werden. Die Ansätze wurden hierfür mithilfe einer Mehrkanalpipette im jeweiligen Well vermischt und anschließend in 50ml Zentrifugenröhren geerntet. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte zum einen, wie oben beschrieben, mittels Zählung im Phasenkontrastmikroskop, zum anderen wurde die Zellzahl mit Hilfe des CASY® Zellzähl- und Analysegeräts bestimmt. Hierfür wurde eine Verdünnung des Ansatzes in 10ml isotonem Puffer (CASY®ton) erstellt. Im Menü des Geräts wurden die eingesetzte Verdünnung und minimaler sowie maximaler Durchmesser vitaler Zellen sowie die Grundeinstellungen (Messvolumen, Anzahl der Messzyklen, X- und Y-Achse der Ausgabeanzeige) festgelegt. Diese Parameter wurden für alle Folgemessungen beibehalten.

Das dem CASY® Zellzähl- und Analysegerät zugrundeliegende Messprinzip ist die elektrische Pulsfächenanalyse mit einer Million Messungen pro Sekunde. In jedem Messzyklus saugt das Gerät in konstanter Geschwindigkeit ein definiertes Volumen Zellsuspension durch eine

Messspore in eine Kapillare. Die Flüssigkeitssäule durchquert hierbei ein konstantes Spannungsfeld. Der Durchtritt einzelner Zellen bzw. Partikel durch die Messspore bewirkt eine Erhöhung des Widerstands und somit einen messbar vermindernden Stromfluss, der proportional zum Querschnitt des Partikels ist. Durch die hohe Anzahl an Pulsnahmen wird der Querschnitt eines jeden Partikels bei seinem Durchtritt mehrfach vermessen, wodurch eine relativ genaue Aussage über die Größe entsteht. Da die Zellmembran toter Zellen durchlässig für elektrischen Strom ist misst das CASY® Zellzähl- und Analysegerät bei deren Durchtritt durch die Messspore einen geringeren Durchmesser als bei lebendigen Zellen (siehe Abbildung 4-6) [310, 319].

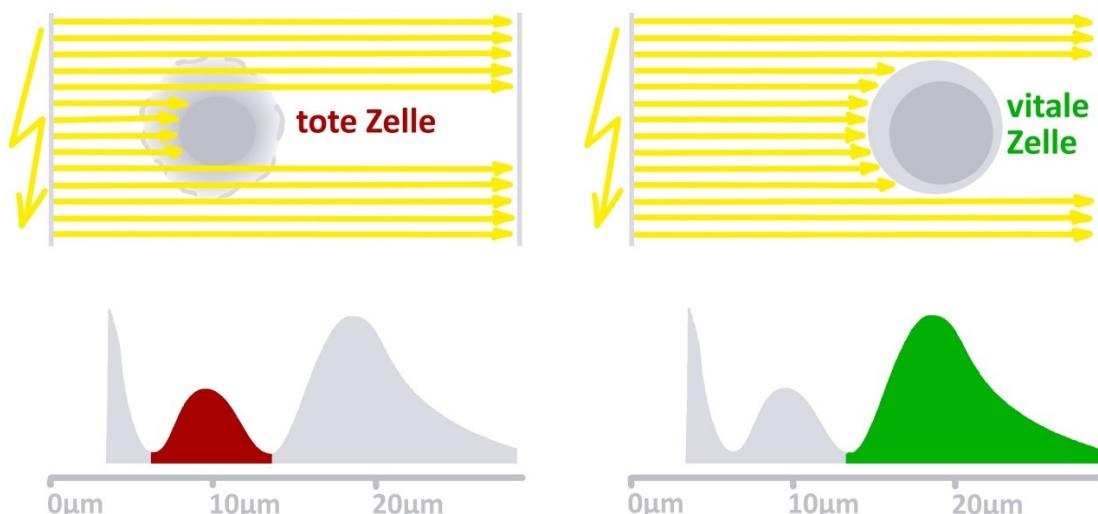


Abbildung 4-6: Messvorgang und Differenzierung vitaler und toter Zellen im CASY® Zellzähl- und Analysegerät

Schematische Darstellung des Messvorgangs im CASY® Zellzähl- und Analysegerät. Der obere Teil der Abbildung zeigt den Durchtritt der Zelle durch die Messspore. Die gelben Pfeile markieren den elektrischen Stromfluss, der durch den Zellwiderstand verändert wird. Links im Bild ist zu sehen, dass der Widerstand beim Durchtritt toter Zellen nur durch die Größe des Zellkerns entscheidend beeinflusst wird, da die Membran toter Zellen stromdurchlässig ist. Rechts wird deutlich, dass bei vitalen Zellen die gesamte Zelle den Widerstand erhöht und die Zelle somit größer vermessen wird. Im unteren Bildabschnitt ist das Größenprofil aus der Messung einer fiktiven Zellsuspension angegeben. Der erste Peak bei weniger als 6µm Durchmesser entspricht den jeweils enthaltenen Zelltrümmern und anderen kleinen Partikeln, der zweite um 10µm erfasst die toten Zellen (links rot markiert) und nur der dritte Peak ab ca. 14µm (rechts grün markiert) enthält die vitalen Zellen. In allen folgenden Auswertungen wird auf die vitalen Zellen eingegangen. Abbildung aus [319] modifiziert.

4.10. Proliferationsmessung

Eine andere Möglichkeit die verschiedenen MLR-Ansätze miteinander zu vergleichen bietet die Proliferationsmessung mit [³H]-Thymidin. Nachdem die MLR, wie oben beschrieben, entweder vier oder sieben Tage inkubiert worden war wurden die Zellen in 96-well Barex Microplates übertragen und das radioaktiv markierte Thymidin zugegeben (0,0185 MBq [³H]Thymidin/Well). Die so behandelten Mikrotiterplatten wurden nochmals 18-20 Stunden inkubiert. In dieser Zeit bauten Zellen [³H]-Thymidin in ihre

neu synthetisierte DNA ein. Nach der letzten Inkubationszeit wurden die Zellen zur Entfernung des nicht eingebauten [Methyl-³H]-Thymidins mittels FilterMate™ Cell Harvester auf UniFilter-96 GF/C übertragen. Anschließend wurde die Radioaktivität mit Hilfe der Szintillationslösung (MicroScint®) sowie dem TopCount®NXT™ Zerfallszähler bestimmt [314]. Alle MLR-Ansätze wurden in Triplikaten gemessen. Diese Proliferationsanalysen wurden freundlicherweise von Frau Alice Peuker durchgeführt.

4.11. Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern

Um verschiedene phänotypische Eigenschaften der aktivierten Lymphozyten in den MLR-Ansätzen durchflusszytometrisch (s.u.) zu erfassen wurden diese mit verschiedenen Farbstoff-konjugierten Antikörpern behandelt. Als Konjugate kamen APC, APC-Cy7, FITC, PE, PE-Cy5, PE-Cy7 und V450 (Pacific Blue) zur Anwendung. Alle Antikörper wurden kurz vor der Verwendung durch Vortexen gut durchmischt.

4.11.1. Oberflächenfärbung

Die verschiedenen MLR-Ansätze wurden hierzu am achten Tag mittels Mehrkanalpipette im jeweiligen Well vermischt, geerntet und gezählt. Je eine Million vitaler Zellen wurde pro Ansatz und Färbepanel in ein FACS-Röhrchen pipettiert. Nach einem Waschschritt mit FACS-Waschpuffer (PBS, 10% FCS) wurden alle zur Oberflächenfärbung benötigten Antikörper in der vom Hersteller angegebenen Menge in die jeweiligen Röhrchen gegeben und durch kurzes Vortexen mit den Zellen gemischt. Die Inkubation erfolgte 10min bei 4°C im Dunkeln.

Zwei weitere Waschschritte entfernen die nicht gebundenen Antikörper. Anschließend wurden die gefärbten Zellen entweder einer Färbung intrazellulärer Zellbestandteile zugeführt oder mittels PFA-Lösung (1% w/v) fixiert und bis zur durchflusszytometrischen Analyse am nächsten Tag bei 4°C in Dunkelheit aufbewahrt [314].

4.11.2. Intrazellularfärbung

Für die Färbung intrazellulärer Zellbestandteile mussten die Zellen zunächst fixiert und die Zellmembran für die Farbstoff-konjugierten Antikörper durchlässig gemacht werden. Hierfür wurde, je nach Färbung, eines von zwei verschiedenen Protokollen angewandt [314].

Methoden

Zur Anfärbung des nukleären Proteins FOXP3 wurde das „FOXP3 / Transcription Factor Staining Buffer Set“ der Firma eBioscience® (Frankfurt) nach Herstellerangaben verwendet. Die bereits oberflächlich gefärbten Zellen wurden hierbei für 18 h bei 4°C in Dunkelheit mit einem Fixations- und Permeabilisierungspuffer inkubiert. Nach zwei Waschschritten mit Permeabilisierungspuffer erfolgte die Inkubation mit dem fluorochrom-konjugierten Antikörper bzw. dessen Isotyp. Nach einem weiteren Waschschritt und der Aufnahme in FACS-Waschpuffer standen die Zellen zur durchflusszytometrischen Analyse zur Verfügung.

Um die intrazellulären Zytokine IL-2 und IFN γ anzufärben wurden die Zellen bereits vor der Oberflächenfärbung fünf Stunden mit PMA (20ng/ml) und Ionomycin (1 μ M) stimuliert (Leukocyte Activation Cocktail, BD™, Heidelberg). Um die Sekretion der Zytokine zu unterdrücken wurde gleichzeitig GolgiPlug™ hinzugegeben. Außerdem wurden Kontrollansätze erstellt, die lediglich mit GolgiPlug™, nicht jedoch mit PMA und Ionomycin behandelt wurden. Nach der fünfstündigen Inkubation wurden die Zellen geerntet und wie oben beschrieben oberflächlich gefärbt. Im Anschluss wurden sie mittels Cytofix/Cytoperm™ Plus Fixation/Permeabilization Kit nach Herstellerangaben (BD™, Heidelberg) fixiert und permeabilisiert. Die Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper erfolgte 30min bei 4°C in Dunkelheit. Nach einem abschließenden Waschschritt wurden die gefärbten Zellen in PFA-Lösung fixiert. Die Lagerung bis zur Durchflusszytometrie am nächsten Tag erfolgte bei 4°C in Dunkelheit.

4.12. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ermöglicht die Erfassung verschiedener phänotypische Eigenschaften mehrerer Tausend einzelner Zellen. Mithilfe einer Trägerflüssigkeit wurden die verschiedenen Zellsuspensionen im Durchflusszytometer (BD™ LSR II Flow Cytometer, BD™, Heidelberg) in einem laminaren Probenstrom an einem optischen System aus Lasern, Linsen, Spiegeln, Filtern und Detektoren vorbeigeleitet. Der Probenstrom war hierbei von so geringem Durchmesser, dass jeweils nur eine einzelne Zelle vom Laserlicht erfasst wurde und somit ausschließlich die Eigenschaften dieser einzelnen Zelle für die Streuung des Laserlichts verantwortlich waren. Dadurch dass im Gerät mehrere Laser verschiedener Wellenlängen verbaut sind, war es hierbei möglich gleichzeitig mehrere zellgebundene Antikörper über ihre Farbstoffkonjugate zu detektieren. Außerdem konnten über die

Vorwärts- und Seitwärtsstreuung des Laserlichtes (FSC, SSC) die Größe und Granularität der Zellen erfasst werden. Da die untersuchten Zellen mit bis zu sieben verschiedenen Farbstoffgekoppelten Antikörpern behandelt worden waren wurden so für jede Zelle bis zu neun verschiedene phänotypische Parameter ermittelt. Um Aussagen über die jeweilige Zellsuspension bzw. die verschiedenen enthaltenen Zellpopulationen treffen zu können wurden pro Ansatz 20'000 Zellen durchflusszytometrisch analysiert. Die durchflusszytometrischen Messungen und notwendige Kompensation mithilfe gefärbter Beads (CompBeads, BD™, Heidelberg) wurden gemeinsam mit Frau Dr. Katrin Peter durchgeführt.

Im Anschluss wurden die gesammelten Daten mit der dafür vorgesehenen Software FlowJo ausgewertet. In Abbildung 4-7 ist exemplarisch die „Gating“-Strategie auf CD4⁺ und CD8⁺T-Lymphozyten dargestellt. Abbildung 4-9 zeigt die „Gating“-Strategie, die beim ALDEFLUOR™ assay zur Anwendung kam.

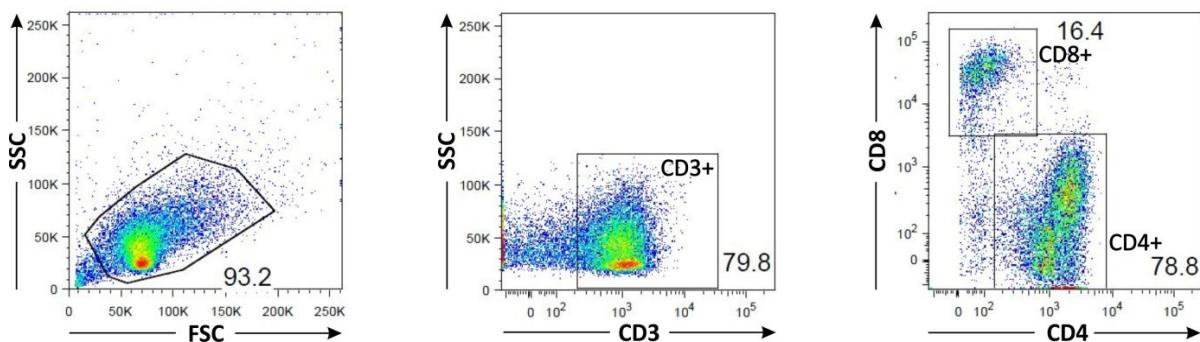


Abbildung 4-7: „Gating“-Strategie auf CD4⁺ und CD8⁺T-Lymphozyten

Kleine Partikel wurden mit Hilfe des ersten Gates (linker Plot) ausgeschlossen. Mithilfe des Markers CD3 (TCR) wurden T-Lymphozyten ausgewählt (mittlerer Plot), die dann weiter in CD4⁺T-Lymphozyten und CD8⁺T-Lymphozyten unterteilt wurden (rechter Plot).

4.13. Bestimmung ALDH-Aktivität Dendritischer Zellen mittels ALDEFLUOR™ assay

Der ALDEFLUOR™ assay (Stemcell™ Technologies SARL, Grenoble, Frankreich) dient der Identifizierung von Zellen mit hoher Aktivität des Enzyms ALDH (Aldehyd-Dehydrogenase). Dieses Enzym setzt unter anderem die inaktive Vorstufe des Vitamin A (Retinal) in die biologisch aktive Form Retinsäure um. Das in den Experimenten verwendete fluoreszierende Substrat BAAA (BODIPY™-Aminoacetaldehyd) diffundiert frei durch die Zellmembran. Es wird durch die ALDH in das Produkt BAA (BODIPY™-Aminoacetat) umgewandelt, das in den Zellen

Methoden

verbleibt. Der aktive Transport aus den Zellen mittels ABC-Transporter wird durch den ALDEFLUOR™ assay Buffer blockiert.

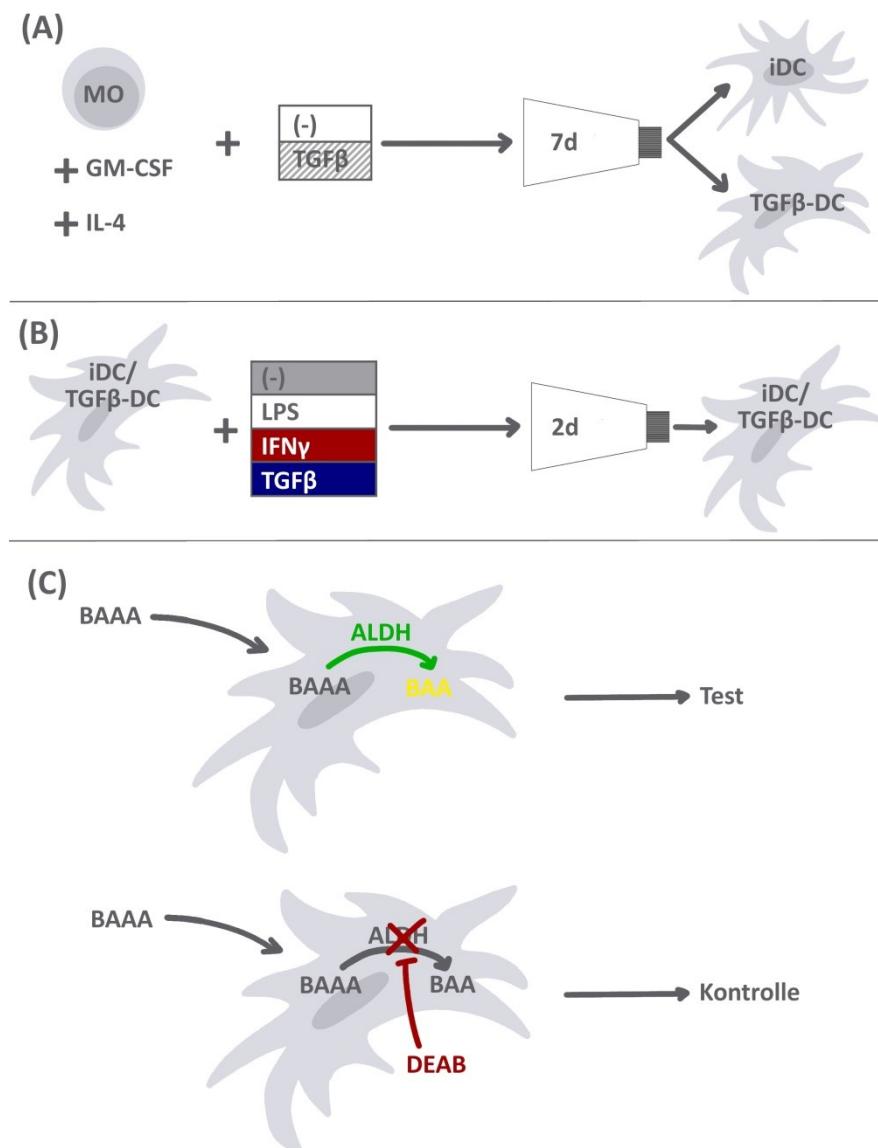


Abbildung 4-8:
Versuchsaufbau der
ALDEFLUOR™ assay
Experimente

(A) Aus Monozyten (MO) wurden mittels GM-CSF und IL-4 innerhalb sieben Tage DCs bzw. unter zusätzlicher Zugabe von TGF β (10ng/ml) TGF β -DCs differenziert.

(B) Die so erhaltenen DCs und TGF β -DCs wurden im Anschluss für zwei weitere Tage mit 10ng/ml LPS, 1000IU/ml IFN γ , 10ng/ml TGF β , oder zur Kontrolle mit keinem weiteren Zusatz versetzt.

(C) Am neunten Tag wurden die so erhaltenen DCs und TGF β -DCs mit dem activated ALDEFLUOR™ substrate (BAAA) versetzt und auf je zwei Röhrchen pro Ansatz aufgeteilt. In eines der beiden Röhrchen kamen zur spezifischen Hemmung der ALDH 5 μ l DEAB hinzu. Die ALDH setzt BAAA in das Produkt BAA um, das in den Zellen verbleibt und durchflusszytometrisch erfasst werden kann. Abbildung frei nach [320].

Die hier eingesetzten DCs und TGF β -DCs wurden wie oben beschrieben aus Monozyten gesunder Spender generiert. Nach sieben Tagen Inkubation wurden 10ng/ml LPS, die Immunmodulatoren IFN γ (1000IU/ml = 50ng/ml) bzw. TGF β (10ng/ml) oder als Kontrolle kein Zusatz für weitere zwei Tage hinzugegeben. Dann wurde die Inkubation für weitere zwei Tage in denselben Zellkulturflaschen weiterhin 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte.

Am neunten Tag wurde der Inhalt der Zellkulturflaschen in 50ml Zentrifugenröhren überführt, abzentrifugiert, resuspendiert und die DCs bzw. TGF β -DCs gezählt. Je Ansatz wurde eine Million Zellen in ein FACS-Röhrchen pipettiert, mit ALDEFLUOR™ Assay Buffer gewaschen und in 1ml Puffer resuspendiert. Nun wurde das activated ALDEFLUOR™

substrate (BAAA) hinzugegeben und jeweils 500 μ l der neu erhaltenen Mischung in zwei FACS-Röhrchen pro Ansatz überführt. Jeweils in eines der beiden Röhrchen (Kontrolle) wurde zur spezifischen Hemmung der ALDH 5 μ l DEAB (Diethylaminobenzaldehyd) gegeben, das andere Röhrchen (Test) blieb ohne Inhibitor. Die Inkubation erfolgte 45min bei 37°C, 5% CO₂ und 95% relativer Luftfeuchte. Nachdem in einem Waschschritt das nicht umgesetzte Substrat entfernt worden war wurden die Zellen in ALDEFLUOR™ Assay Buffer aufgenommen [320]. Kurz vor der durchflusszytometrischen Messung wurde DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol, Endkonzentration 1 μ g/ml) zugegeben. DAPI ist ein UV-Farbstoff, der durch die Zellmembran toter Zellen diffundiert, an deren DNA angelagert wird und sie somit anfärbt. In der späteren Auswertung konnten somit tote und stark geschädigte Zellen ausgeschlossen werden.

Die weitere durchflusszytometrische Analyse und anschließende Auswertung mittels der Software FlowJo erfolgten wie oben beschrieben. Abbildung 4-9 zeigt exemplarisch die hier angewandte „Gating“-Strategie.

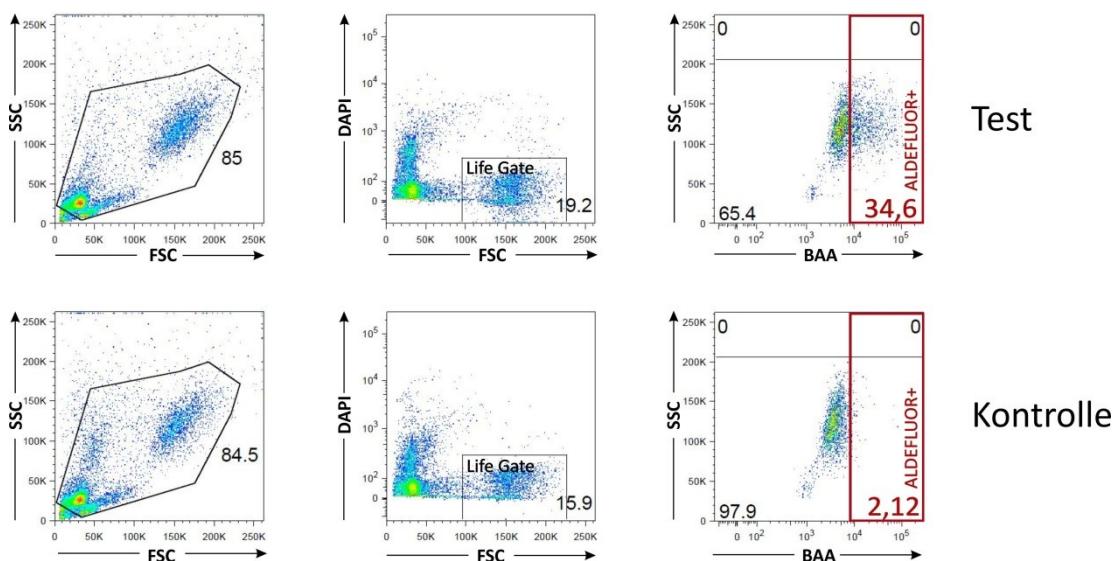


Abbildung 4-9: „Gating“-Strategie in den ALDEFLUOR-Experimenten

Oben abgebildet ist exemplarisch ein Test- und unten ein Kontrollansatz. Im Kontrollansatz wurde wie oben beschrieben das Enzym ALDH durch DEAB gehemmt. Kleine Partikel wurden mit Hilfe des ersten Gates (linke Plots) ausgeschlossen. Die DAPI-negativen Zellen der richtigen Größe wurden im zweiten Gate („Life Gate“; mittlere Plots) ausgewählt. In dieser Population wurde die jeweils Anreicherung mit BAA gemessen (rechte Plots, rot markiertes Gate, „ALDEFLUOR⁺“).

4.14. Statistik

Aus den Messergebnissen mehrerer Einzelexperimente wurden Mittelwerte und die Standardabweichung des Mittelwerts (SEM, standard error of the mean) errechnet. Mit Hilfe der Software GraphPad Prism® 5.02 wurden gepaarte Student's t-Test zur statistischen Signifikanzprüfung durchgeführt. P-Werte <0,05 galten als statistisch signifikant (*) und p-Werte <0,01 als sehr signifikant (**). Ergaben die Tests p-Werte >0,05 wurde dies als statistisch nicht signifikanter (n.s.) Unterschied bezeichnet.

5. Ergebnisse

Die Bedeutung der T-Zell-vermittelten Immunantwort im Rahmen der GvHD wurde in Kapitel 1.6.4. beschrieben. Im Rahmen dieser Arbeit wurde analysiert, inwiefern eine allogene Immunantwort durch bakterielle Stimuli, wie LPS und MDP, durch Vitaminzugaben und durch TGF β , sowie die Kombination dieser verschiedenen Stimuli und Zusätze moduliert wird. Zu diesem Zweck wurden frisch isolierte humane Monozyten gesunder Spender über sechs bis acht Tage mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen dendritischen Zellen differenziert, die hier als „DCs“ bezeichnet werden [6]. Um den immunmodulatorischen Effekt des TGF β auf diesen Differenzierungsprozess zu untersuchen, wurde weiteren, sonst gleich behandelten Monozyten TGF β zugesetzt [318]. Die auf diese Weise differenzierten dendritischen Zellen werden hier „TGF β -DCs“ genannt. Im Anschluss erfolgte in einer gemischten Leukozytenreaktion (MLR) die Untersuchung der Immunantwort allogener T-Lymphozyten, gemessen an deren Proliferation und Differenzierung zu Effektor-T-L-Lymphozyten. Dies geschah unter Zugabe von LPS und LPS zusammen mit MDP sowie von Vorstufen bzw. den biologisch aktiven Vitaminen D und A. Außerdem wurde die Fähigkeit der DCs und TGF β -DCs Vitamin A Vorstufen in die biologisch aktive Retinsäure umzusetzen untersucht.

5.1. Lymphozyten-Zellzahl nach der MLR

Zur Beurteilung der durch verschiedene DCs hervorgerufenen Proliferation allogener Lymphozyten sowie zur Analyse des Einflusses verschiedener Zusätze wurde zunächst die Zahl der Lymphozyten im Anschluss an eine MLR bestimmt.

Wie Abbildung 5-1 zeigt, waren beim Einsatz von DCs (Balken ohne Schraffur) sowohl unter dem Einfluss von 25VD als auch unter dem von Retinal, signifikant weniger Lymphozyten als in der Kontrolle ohne Vitaminzusatz nachzuweisen. Dieser Effekt schien sich tendenziell bei gleichzeitiger Zugabe beider Vitamine noch zu steigern. Wo im vitaminfreien LPS-Ansatz im Mittel 2×10^6 Lymphozyten/ml zu messen waren, wurden im Ansatz mit 25VD und LPS gemittelt 1×10^6 /ml und mit der Vitaminkombination und LPS im Durchschnitt nur noch $0,75 \times 10^6$ /ml gezählt. Zwischen den lediglich mit LPS stimulierten Ansätzen (Abbildung 5-1 A) und denjenigen, die mit LPS und MDP stimuliert wurden (Abbildung 5-1 B) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

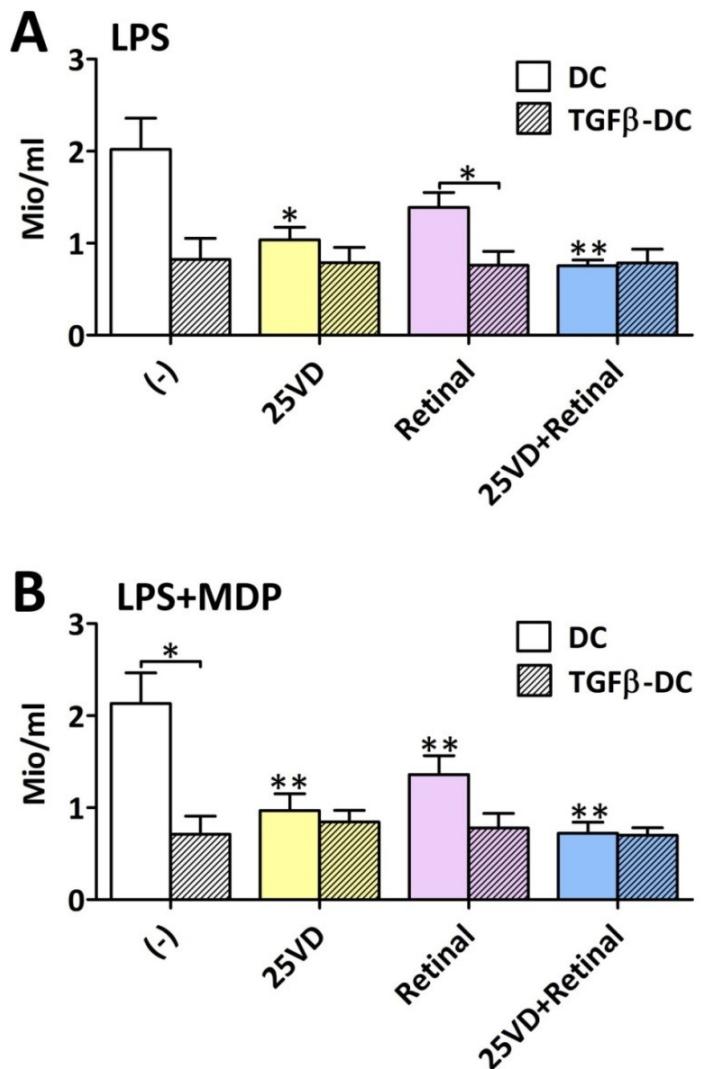


Abbildung 5-1: Verringerung der Zellzahl nach der MLR durch 25VD, Retinal und den Einsatz von TGFβ-DC

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren, wurden diese über sieben Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Zur Generierung der TGFβ-DCs wurden außerdem 10ng/ml TGFβ hinzugegeben. Am siebten Tag wurden die DC bzw. TGFβ-DC geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei jeweils LPS alleine oder in Kombination mit MDP sowie die Vitaminvorstufen 25VD (5×10^{-8} M), Retinal (10^{-6} M), eine Kombination beider Vitaminvorstufen ($25VD 5 \times 10^{-8}$ M, Retinal 10^{-6} M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. **A** zeigt Ansätze in denen DC bzw. TGFβ-DC mit LPS (10ng/ml) und Lymphozyten sowie den angegebenen Vitaminen kultiviert wurden, **B** Ansätze mit DC bzw. TGFβ-DC, Lymphozyten, LPS (10ng/ml), MDP (100ng/ml) und Vitaminen. Die Messung der Zellzahl erfolgte am siebten Tag der MLR mithilfe des CASY® Zellzähl- und Analysegeräts. Dargestellt sind Mittelwerte der Zellzahl in Millionen pro Milliliter (Mio/ml) \pm SEM aus sechs (DC) bzw. drei (TGFβ-DC) unabhängigen Einzelexperimenten. Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe des Student's t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, relativ zur vitaminfreien Kontrolle oder wie mit Balken markiert.

Die in Abbildung 5-1 jeweils schraffiert dargestellten Balken bilden die Zellzahl nach der MLR mit TGFβ-DCs ab. Sowohl bei Inkubation mit LPS als auch in Gegenwart von LPS und MDP lag in der Kontrolle ohne Vitamine eine geringere absolute Lymphozytenzellzahl ($0,71 \times 10^6$ /ml) im Vergleich zur MLR mit DC (2×10^6 /ml) vor. Unter dem Einfluss von TGFβ zeigten sich

außerdem keine reprimierenden Vitamineffekte, die Zellzahl war in allen Ansätzen konstant niedrig: im Mittel $0,77 \times 10^6/\text{ml}$ ($\pm 0,07 \times 10^6/\text{ml}$).

Neben den dargestellten Ergebnissen nach sieben Tagen MLR wurden die Zellzahlen an Tag vier der MLR mit DC bestimmt. Hier kamen die gleichen bakteriellen Stimuli zur Anwendung. An Tag 4 der MLR zeigten sich, wie erwartet, deutlich niedrigere absolute Zellzahlen, die in allen Ansätzen bei etwa $0,38 \times 10^6/\text{ml}$ ($\pm 0,01 \times 10^6/\text{ml}$) lagen. Weder der Zusatz von MDP noch die Vitaminzusätze veränderten die Zellzahl merklich. Die zugehörigen Graphen sind dem Anhang (Abbildung 9-1) zu entnehmen.

5.2. Proliferation der Lymphozyten in der MLR

Außerdem wurde der Einfluss der Vitamine D und A sowie der bakteriellen Stimuli LPS und MDP auf die Proliferation der allogenen Lymphozyten in der MLR gemessen am Einbau von [Methyl- ^3H]-Thymidin bestimmt.

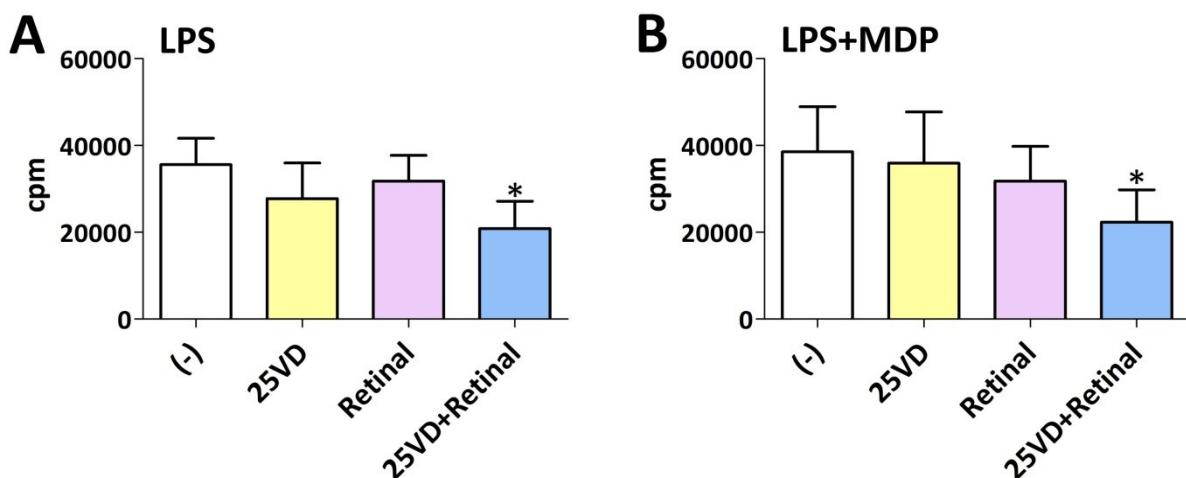


Abbildung 5-2: Hemmung der Proliferation in der MLR durch die Zugabe von 25VD und Retinal

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über sieben Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Am siebten Tag wurden die DC geerntet und zu je $10^4/\text{Well}$ (entsprechend $0,5 \times 10^5/\text{ml}$) mit allogenen Lymphozyten ($10^5/\text{Well}$, $0,5 \times 10^6/\text{ml}$) in einer MLR kokultiviert, wobei jeweils bakterielle Stimuli sowie die Vitaminvorstufen 25VD ($5 \times 10^{-8}\text{M}$), Retinal (10^{-6}M), eine Kombination beider Vitaminvorstufen (25VD $5 \times 10^{-8}\text{M}$, Retinal 10^{-6}M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. A zeigt Ansätze in denen DC mit LPS (10ng/ml) und Lymphozyten sowie den angegebenen Vitaminen kultiviert wurden, B Ansätze mit DC, Lymphozyten, LPS (10ng/ml), MDP (100ng/ml) und Vitaminen. Am siebten Tag der MLR wurden die Lymphozyten 18 bis 20 Stunden mit [Methyl- ^3H]-Thymidin inkubiert und der Einbau des radioaktiv markierten Thymidins in neu synthetisierte DNA mittels Zerfallszähler gemessen, wodurch die Proliferationsrate der Lymphozyten analysiert wurde. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM aus vier unabhängigen Einzelexperimenten. Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe des Student's t-Test: * $p<0,05$, relativ zur vitaminfreien Kontrolle.

In Abbildung 5-2 sind die Ergebnisse dieser Proliferationsmessung dargestellt. Analog zu den Zellzahl-Experimenten war eine signifikante Abnahme des Einbaus von [Methyl- ^3H]-Thymidin

Ergebnisse

und damit der Zellproliferation unter der Vitaminkombination (25VD und Retinal) sowohl im LPS-Ansatz (Abbildung 5-2 A) als auch im Ansatz mit LPS und MDP (Abbildung 5-2 B) zu verzeichnen. Der Effekt von 25VD konnte lediglich tendenziell im LPS-Ansatz beobachtet werden. Zwischen den LPS-Ansätzen und denjenigen mit LPS und MDP waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar. Die scheinbare Diskrepanz zwischen „CASY®“-Zählung und [Methyl-³H]-Thymidin-Einbau erklärt sich dadurch, dass die „CASY®“-Zählung die Gesamtproliferation über sieben Tage analysiert, während beim [Methyl-³H]-Thymidin-Einbau nur ein „Schnappschuss“ der Proliferation von Tag 7 auf Tag 8 gemessen wird.

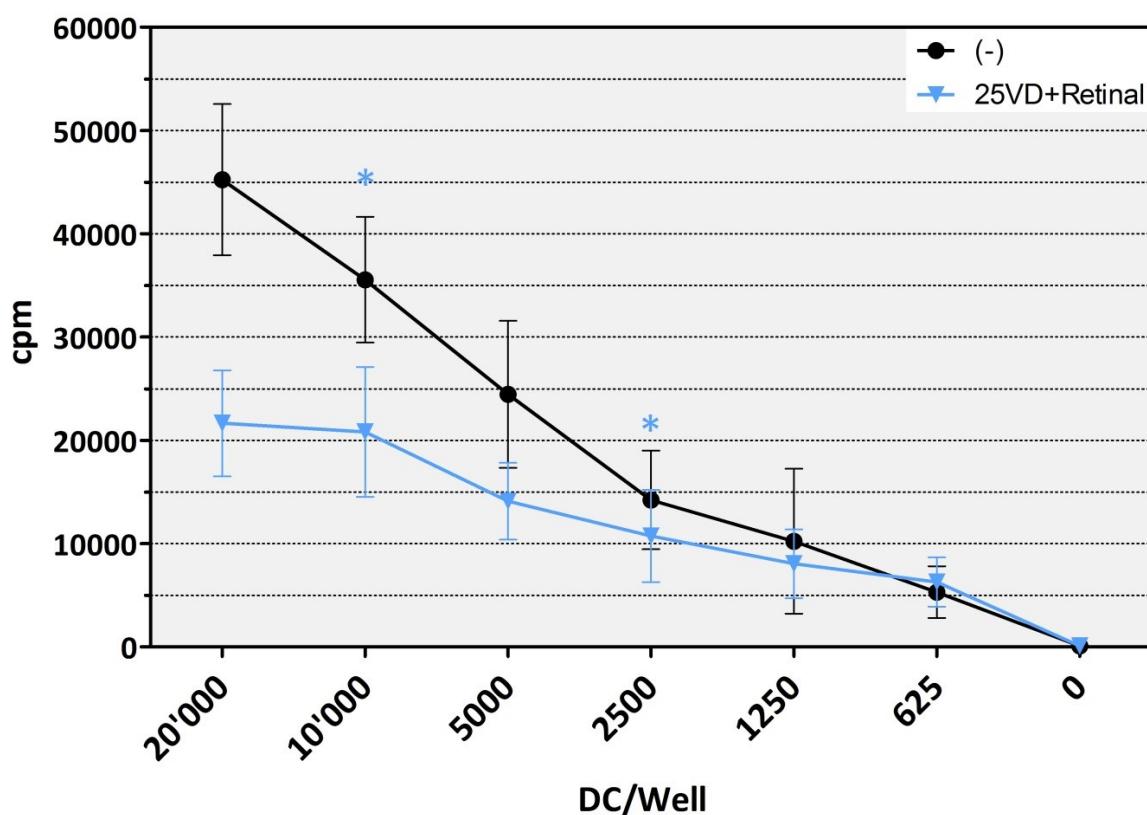


Abbildung 5-3: Von der DC-Zellzahl unabhängige Hemmung der allogenen T-Zell-Proliferation durch die Zugabe von 25VD und Retinal

Um humane Monozyten zu iDCs zu differenzieren wurden diese über sieben Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Am siebten Tag wurden die DCs geerntet und mit allogenen Lymphozyten (10^5 /Well, $0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei der bakterielle Stimulus LPS (10ng/ml) und die Kombination der beiden Vitaminvorstufen 25VD (5×10^{-8} M) und Retinal (10^{-6} M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. Die iDC selbst wurden in einer Verdünnungsreihe (wie im Graph angegeben, beginnend mit 2×10^4 /Well entsprechend 10^5 /ml) eingesetzt. Am siebten Tag der MLR wurden die Lymphozyten 18 bis 20 Stunden mit [Methyl³H]-Thymidin inkubiert und der Einbau des radioaktiv markierten Thymidins in neu synthetisierte DNA mittels Zerfallszähler gemessen, wodurch die Proliferationsrate der Lymphozyten analysiert wurde. Dargestellt sind Mittelwerte aus vier unabhängigen Experimenten \pm SEM. Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe des Student's t-Test: * $p < 0,05$, relativ zur vitaminfreien Kontrolle bei gleicher DC-Zahl/Well.

Zusätzlich zu den beschriebenen Ansätzen wurden die DC, neben der üblichen Anzahl (10'000/Well entsprechend $0,5 \times 10^5/\text{ml}$), in einer Verdünnungsreihe (20'000DC/Well, 10'000DC/Well, 5000DC/Well usw.) eingesetzt, die Lymphozyten dagegen weiterhin in konstanter Zahl (100'000 T-Lymphozyten/Well entsprechend $0,5 \times 10^6/\text{ml}$). Als Kontrollen wurden DC (nicht dargestellt) und T-Lymphozyten jeweils in Monokultur mit den gleichen bakteriellen Stimuli und Vitaminen inkubiert; in diesen Kontrollen fand erwartungsgemäß keine Proliferation statt.

Abbildung 5-3 zeigt, dass der proliferationshemmende Effekt der Kombination der Vitamine 25VD und Retinal unabhängig von der DC-Zellzahl in der MLR auftrat. Signifikant unterschieden sich die Proliferation der Lymphozyten in der Kontrolle ohne Vitamin und der MLR mit beiden Vitaminen bei 2500DC/Well ($1,25 \times 10^4/\text{ml}$) und 10'000DC/Well ($0,5 \times 10^5/\text{ml}$). Ein deutlicher Trend war jedoch ab 2500DC/Well ($1,25 \times 10^4/\text{ml}$) bis hin zur höchsten eingesetzten DC-Zahl (20'000DC/Well, $10^5/\text{ml}$) durchweg zu beobachten. Nicht dargestellt sind die Ergebnisse der Experimente in denen die Vitaminvorstufen 25VD und Retinal jeweils einzeln, anstatt wie gezeigt in Kombination, der MLR zugesetzt wurden. Es wurde, wenn auch schwächer, jeweils ebenfalls ein Trend zur Hemmung der Proliferation, unabhängig von der eingesetzten DC-Zahl, gemessen.

In den ebenfalls nicht dargestellten Experimenten mit LPS und MDP ergaben sich wiederum keine deutlichen Unterschiede zu den gezeigten Experimenten mit LPS.

Um die Wirkung von TGF β aus den Zellzahlexperimenten zu bestätigen, wurden außerdem MLRs mit TGF β -DCs in derselben Verdünnungsreihe erstellt. Die übrigen Zusätze waren dieselben (Lymphozyten, LPS oder LPS und MDP, 25VD, Retinal, deren Kombination oder kein Vitamin). Abbildung 5-4 zeigt die gemessenen Triplikate und Mittelwerte der LPS-TGF β -DC-Ansätze eines Einzelversuchs. Verglichen mit Abbildung 5-3 kommt die deutlich geringere Proliferation in den MLRs mit TGF β -DC zum Ausdruck (im Mittel 6821cpm bei 10'000 TGF β -DC/Well im vitaminfreien LPS-Ansatz im Vergleich zu 18959cpm bei 10'000 DC/Well im sonst gleichen Ansatz desselben Experiments ohne TGF). Darüber hinaus hatte auch hier die Vitaminkombination einen zusätzlichen hemmenden Einfluss auf die Proliferation. Dieser Effekt zeigte sich, wenn auch schwächer, ebenfalls in den Ansätzen mit 25VD. Retinal allein

Ergebnisse

beeinflusste die Proliferation nicht (nicht dargestellt). Der Einsatz der Kombination aus LPS und MDP erbrachte auch hier vergleichbare Ergebnisse wie die alleinige Stimulation mit LPS.

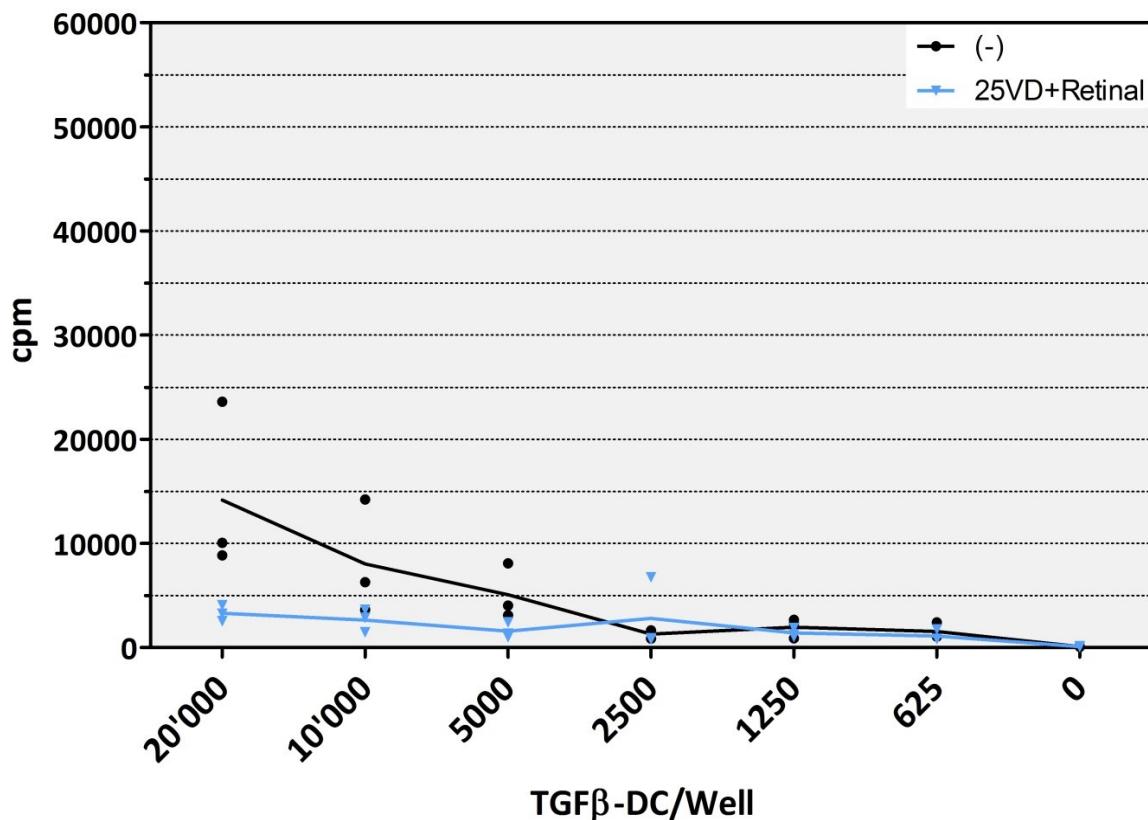


Abbildung 5-4: Verminderte Proliferation in der MLR mit TGFβ-DCs

Um humane Monozyten zu TGFβ-DCs zu differenzieren wurden diese über sieben Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 sowie 10ng/ml TGFβ kultiviert. Am siebten Tag wurden die TGFβ-DCs geerntet und mit allogenen Lymphozyten (10^5 /Well, $0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei der bakterielle Stimulus LPS (10ng/ml) sowie die Kombination der beiden Vitaminvorstufen 25VD (5×10^{-8} M) und Retinal (10^{-6} M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. Die TGFβ-DC selbst wurden in einer Verdünnungsreihe (wie im Graph angegeben, beginnend mit 2×10^4 /Well entsprechend 10^5 /ml) eingesetzt. Am siebten Tag der MLR wurden die Lymphozyten 18 bis 20 Stunden mit [Methyl^3H]-Thymidin inkubiert und der Einbau des radioaktiv markierten Thymidins in neu synthetisierte DNA mittels Zerfallszähler gemessen, wodurch die Proliferationsrate der Lymphozyten analysiert wurde. Dargestellt sind die Triplikate eines Einzelversuchs sowie die Verbindungslien der Mittelwerte.

Zur weiteren Untersuchung des Einflusses der bakteriellen Stimuli wurden zusätzlich zu den beschriebenen LPS-haltigen Ansätzen MLRs erstellt, die keinen bakteriellen Stimulus oder nur MDP enthielten. In diesen Experimenten zeigte sich, dass die Proliferation ohne den Einfluss von LPS schwächer war. Einhergehend mit der niedrigen Proliferationsrate wurden keine signifikanten Effekte von 25VD und Retinal zu beobachtet (siehe Abbildung 9-2).

Außerdem wurde die Proliferation in vergleichbaren MLRs an Tag vier gemessen. Hier traten in allen Ansätzen relativ hohe Proliferationsraten auf aber es ließen sich keine Unterschiede

zwischen den verschiedenen Vitaminansätzen bzw. zwischen den verschiedenen bakteriell stimulierten MLRs nachweisen (Daten nicht gezeigt). Somit scheint sich der Effekt der Vitaminzugabe erst in späteren Phasen der Proliferation auszuwirken.

5.3. Oberflächeneigenschaften der T-Lymphozyten

Um die in den gemischten Leukozytenreaktionen aktivierten, proliferierenden T-Lymphozyten genauer zu untersuchen, wurde die Expression des Aktivierungsmarkers CD25 getestet. CD25 ist die Bezeichnung für die Alpha-Kette des IL-2-Rezeptors, die dessen Bindedomäne darstellt. Der zugehörige Signalweg ist in der Induktion der T-Zell-Proliferation und -Differenzierung beteiligt [1].

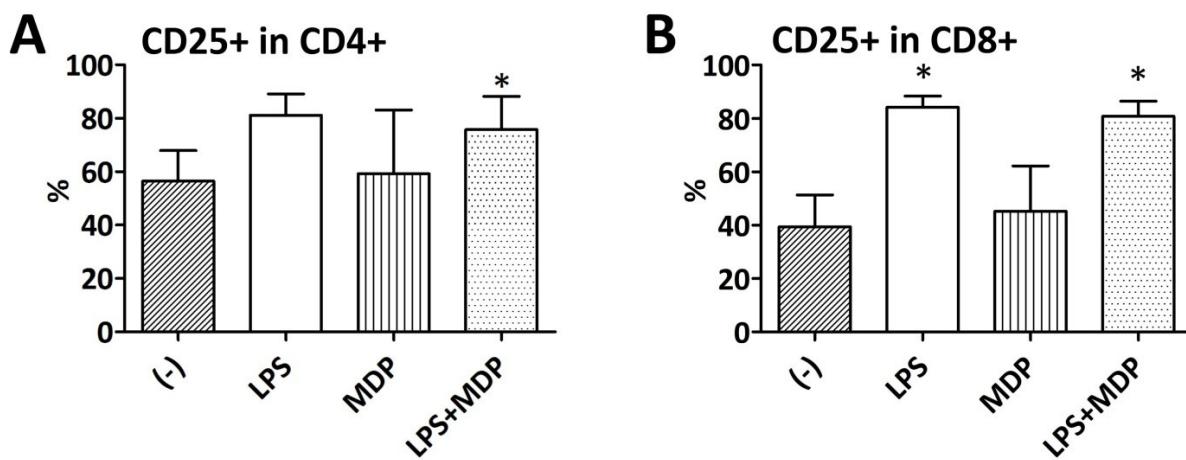


Abbildung 5-5: Einfluss von LPS und MDP auf den Prozentsatz von CD25⁺CD4⁺ oder CD25⁺CD8⁺T-Lymphozyten

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Am achten Tag wurden die iDCs geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei die bakteriellen Stimuli LPS (10ng/ml), MDP (100ng/ml), LPS (100ng/ml) und MDP (100ng/ml) oder zur Kontrolle kein Stimulus zugesetzt wurden. Die FACS-Oberflächenfärbung erfolgte am sechsten Tag der MLR. Im Graph dargestellt ist der Anteil CD25-positiver T-Lymphozyten innerhalb der Population CD4-positiver (A) bzw. CD8-positiver T-Lymphozyten (B), jeweils als Mittelwerte \pm SEM aus drei unabhängigen Einzelexperimenten. Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe des Student's t-Test: * $p < 0,05$, jeweils relativ zur stimulusfreien Kontrolle.

Die verwendeten DC wurden unter dem Einfluss von GM-CSF und IL-4 über acht Tage aus Monozyten gesunder Spender differenziert. Im Anschluss wurden die DCs in einer MLR mit allogenen Lymphozyten in An- und Abwesenheit von LPS, MDP sowie der Kombination aus LPS und MDP inkubiert. Nach sechs Tagen erfolgte die Färbung mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern, die gegen die Merkmale CD3, CD1a, CD4, CD8 und CD25 gerichtet waren. Anschließend wurden in den jeweiligen CD3⁺CD1a⁻Populationen (T-Lymphozyten) die CD4⁺ von den CD8⁺ abgegrenzt und darin jeweils die Expression von CD25 untersucht.

Ergebnisse

Wie in Abbildung 5-5 dargestellt, wurden im LPS+MDP-Ansatz, verglichen mit dem Kontrollansatz ohne bakteriellen Stimulus, sowohl in CD4⁺T-Lymphozyten (A) als auch in CD8⁺T-Lymphozyten (B) signifikant mehr CD25⁺-Zellen detektiert. In der Kultur mit LPS wurde ein signifikant höherer Prozentsatz CD8⁺CD25⁺T-Lymphozyten und ein erhöhter Anteil CD4⁺CD25⁺T-Lymphozyten gefunden.

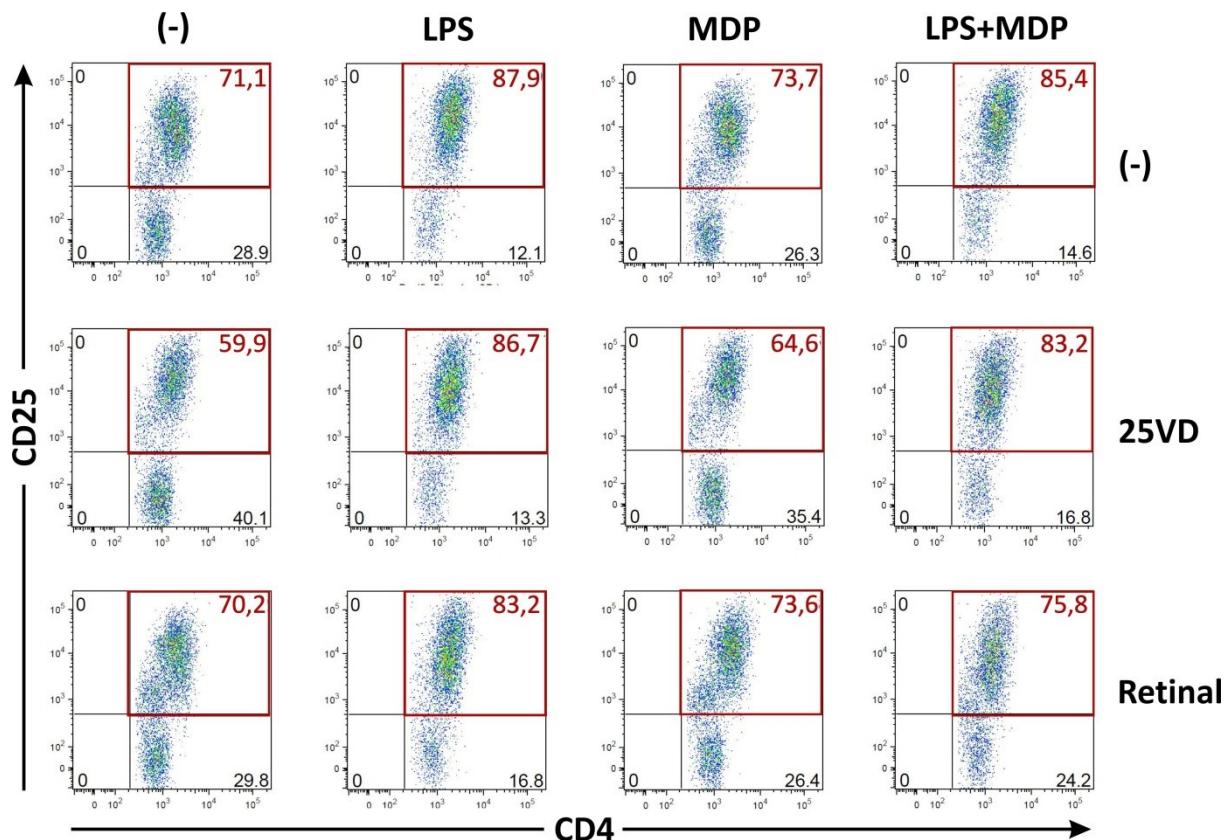


Abbildung 5-6: Einfluss von LPS, MDP, 25VD und Retinal auf die Expression des IL-2 Rezeptors in CD4⁺T-Lymphozyten in der MLR

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Am achten Tag wurden die iDCs geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei die bakteriellen Stimuli LPS (10ng/ml), MDP (100ng/ml), LPS (10ng/ml) und MDP (100ng/ml) oder zur Kontrolle kein Stimulus sowie die beiden Vitaminvorstufen 25VD (5×10^{-8} M) und Retinal (10^{-6} M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. Die FACS-Oberflächenfärbung erfolgte am sechsten Tag der MLR. Dargestellt sind die CD4 gegen CD25 Plots eines repräsentativen Einzelexperiments. IL-2-Rezeptor-positiv (CD25⁺) ist jeweils die rot markierte Population im Plot. Die angegebenen Zahlenwerte entsprechen der „Frequency of Parent“, d.h. dem prozentualen Anteil der jeweiligen Population an der übergeordneten (hier CD4⁺T-L).

Vor dem Hintergrund des proliferationshemmenden Effekts der Vitamine 25VD und Retinal, der in den beiden vorangehenden Kapiteln beschrieben ist, stellt sich die Frage, ob die beiden Vitamine einen Einfluss auf die CD25-Expression in CD4⁺ und CD8⁺T-Lymphozyten ausüben. Deshalb wurden wiederum MLRs mit DC, Lymphozyten, den Vitaminen und bakteriellen Stimuli angesetzt. Abbildung 5-6 zeigt die Ergebnisse eines repräsentativen

Experiments. In den LPS-freien Ansätzen wurde ein negativer Effekt von 25VD auf den Anteil CD25⁺T-Zellen im Vergleich zur vitaminfreien Kontrolle festgestellt. Retinal hatte keinen vergleichbaren Effekt. Auch der hier nicht abgebildete Anteil CD8⁺CD25⁺T-Lymphozyten wurde durch die Vitamine nicht beeinflusst. Diese Ergebnisse wurden in zwei ähnlichen Experimenten reproduziert (Daten nicht gezeigt).

5.4. IL-2- und IFN γ -Gehalt der T-Zellen

Um den Einfluss der unterschiedlichen bakteriellen Stimuli und Vitamine auf die Zytokinproduktion der Zellen zu analysieren, wurden die Lymphozyten durch PMA und Ionomycin stimuliert und die Sekretion der Zytokine durch GolgiPlug inhibiert. Mittels intrazellulärer Antikörperfärbung und Durchflusszytometrie wurde anschließend der intrazelluläre Gehalt an IL-2 und IFN γ in CD4⁺ und CD8⁺T-Lymphozyten untersucht.

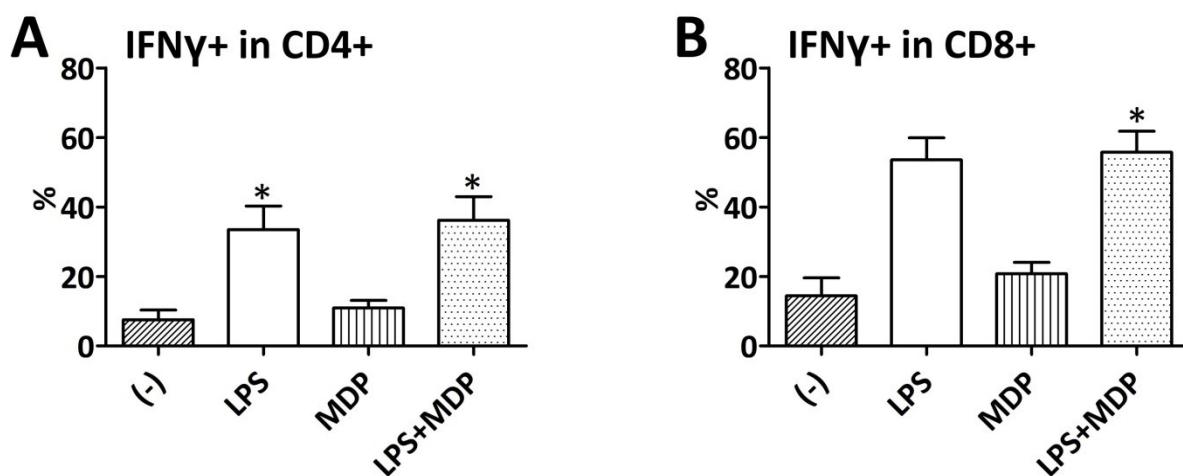


Abbildung 5-7: Der Zusatz von LPS bewirkt eine gesteigerte IFN γ -Produktion durch T-Lymphozyten in der MLR

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Am achten Tag wurden die iDCs geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei die bakteriellen Stimuli LPS (10ng/ml), MDP (100ng/ml), LPS (10ng/ml) und MDP (100ng/ml) oder zur Kontrolle kein Stimulus zugesetzt wurden. Die FACS-Oberflächenfärbung auf CD3, CD4, CD8 sowie die Intrazellulärfärbung auf IL-2 und IFN γ erfolgten am sechsten Tag der MLR nach fünf Stunden Stimulation mit PMA/Ionomycin. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Einzelexperimenten \pm SEM. A gibt den Anteil der IFN γ ⁺Population an den CD4⁺T-Lymphozyten wieder, B den der IFN γ ⁺Population an den CD8⁺T-Lymphozyten. Dieser Anteil ist jeweils in Prozent der übergeordneten Population („Frequency of Parent“, hier CD4⁺ bzw. CD8⁺T-Lymphozyten) angegeben. Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe des Student's t-Test: *p<0,05, relativ zur jeweiligen Kontrolle ohne bakteriellen Stimulus.

Zunächst wurde in vitaminfreien MLRs die Wirkung verschiedener bakterieller Stimuli (LPS, MDP, LPS und MDP) mit einer Kontrolle ohne bakteriellen Stimulus verglichen. Bezuglich der Produktion von IL-2 ließen sich keine deutlichen Unterschiede erkennen (nicht dargestellt). Der Anteil IFN γ ⁺CD4⁺T-Lymphozyten stieg sowohl unter LPS als auch unter LPS und MDP

Ergebnisse

signifikant an (Abbildung 5-7 A). Auch der Prozentsatz IFN γ ⁺CD8⁺T-Lymphozyte wurde durch LPS wie auch durch LPS und MDP gesteigert (Abbildung 5-7 B). Unter LPS bzw. LPS+MDP war außerdem ein leichter Anstieg der IL-2⁺IFN γ ⁺-Population in den CD4⁺T-Lymphozyten zu beobachten (Daten nicht gezeigt). Etwas abgeschwächt zeigte sich dasselbe auch in den CD8⁺T-Lymphozyten (ebenfalls nicht dargestellt).

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der Vitamine 25VD und Retinal auf die Zytokinproduktion untersucht. Dabei ließen sich für die IL-2-Produktion, sowie für die gleichzeitige Produktion von IL-2 und IFN γ keine eindeutigen Unterschiede zwischen den Vitaminansätzen detektieren (Daten nicht gezeigt). Dagegen zeigte sich in MLRs mit LPS (Abbildung 5-8 A) wie auch in denjenigen mit LPS und MDP (Daten nicht gezeigt) in CD4⁺T-Lymphozyten ein Trend zur schwächeren IFN γ -Produktion unter dem Einfluss von 25VD, Retinal und insbesondere unter dem Einfluss der Vitaminkombination. In den CD8⁺T-L wurde die IFN γ -Produktion durch 25VD und die Vitaminkombination gesenkt (Abbildung 5-8 B).

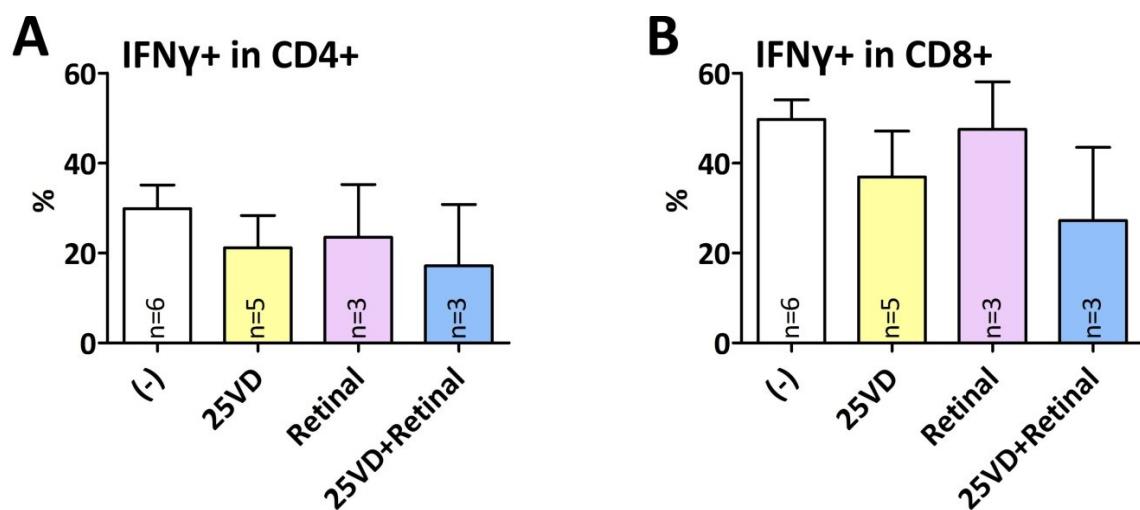


Abbildung 5-8: Verminderte IFN γ -Produktion durch T-Lymphozyten unter dem Einfluss von 25VD und 25VD+Retinal

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Am achten Tag wurden die iDCs geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei der bakterielle Stimulus LPS (10ng/ml), sowie die beiden Vitaminvorstufen Calcidiol (25VD, 5×10^{-8} M) und Retinal (10^{-6} M), eine Kombination der beiden Vitamine (25VD 5×10^{-8} M, Retinal 10^{-6} M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. Die FACS-Oberflächenfärbung auf CD3, CD4, CD8 sowie die Intrazellulärfärbung auf IL-2 und IFN γ erfolgten am sechsten Tag der MLR nach fünf Stunden Stimulation mit PMA/Ionomycin. Gezeigt ist der Mittelwert aus je drei bis sechs unabhängigen Einzelexperimenten \pm SEM des Anteils der IFN γ ⁺Population an den CD4⁺T-Lymphozyten (A) bzw. CD8⁺T-Lymphozyten (B).

5.5. Anteil FOXP3-positiver T-Zellen

Wie in Kapitel 1.3.3. beschrieben, kann regulatorischen T-Zellen eine entscheidende Rolle in der Modulation adaptiver Immunantworten zugeschrieben werden. Gerade vor dem Hintergrund einiger klinischer Studien sowie Experimenten in Mäusen wird klar, dass die Menge und Funktion regulatorischer T-Zellen, das Auftreten und den Verlauf der GvHD entscheidend beeinflussen [84, 321, 322]. Aus diesem Grund sollten der Einfluss von 25VD und Retinal sowie der bakterieller Stimuli auf die Generierung regulatorischer T-Zellen untersucht werden.

Angabe je in % der CD4 ⁺ CD25 ⁺ -Population		(-)	LPS	MDP	LPS+MDP
Experiment 1	Δ FOXP3 ⁺ - Isotyp ⁺	13,86	4,79	19,02	2,08
	FOXP3 ⁺	15,4	7,48	20	4,04
	Isotyp ⁺	1,54	2,69	0,98	1,96
Experiment 2	Δ FOXP3 ⁺ - Isotyp ⁺	18,01	4,27	17,57	0,03
	FOXP3 ⁺	18,5	5,03	18,2	1,06
	Isotyp ⁺	0,49	0,76	0,63	1,03
Experiment 3	Δ FOXP3 ⁺ - Isotyp ⁺	28,81	2,93	23,81	2,1
	FOXP3 ⁺	29,5	3,81	24,4	2,91
	Isotyp ⁺	0,69	0,88	0,59	0,81

Tabelle 5-1: Unter LPS sinkt der Anteil FOXP3⁺ an den CD4⁺CD25⁺T-Lymphozyten in der MLR

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Am achten Tag wurden die iDCs geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei die bakteriellen Stimuli LPS (10ng/ml), MDP (100ng/ml), LPS (10ng/ml) und MDP (100ng/ml) oder zur Kontrolle kein Stimulus zugesetzt wurden. Die FACS-Oberflächenfärbung auf CD3, CD4, CD8 sowie die Intrazellulärfärbung auf FOXP3 bzw. die FOXP3-Isotyp-Färbung erfolgten am sechsten Tag der MLR. Die angegebenen Zahlenwerte entsprechen dem Anteil der FOXP3⁺ bzw. Isotyp⁺Zellen an der gesamten CD4⁺CD25⁺Population (angegeben in %). „Δ FOXP3⁺ - Isotyp⁺“ zeigt die Differenz zwischen FOXP3⁺ und Isotyp⁺Zellen. Die Ergebnisse entstammen drei unabhängigen Experimenten.

Zunächst wurde in vitaminfreien MLRs nach sechs Tagen der Anteil der FOXP3⁺-Zellen in CD4⁺CD25⁺T-Lymphozyten bzw. CD8⁺CD25⁺T-Lymphozyten unter dem Einfluss von LPS, MDP, LPS und MDP und als Kontrolle ohne Stimulus bestimmt. Wie der Tabelle 5-1 zu entnehmen ist, fiel der Anteil FOXP3-positiver-CD4⁺T-Lymphozyten unter LPS in allen drei Experimenten stark ab. Signifikant niedriger wurde dieser Anteil, wenn zusätzlich MDP hinzukam, obwohl MDP alleine nicht zu einem Abfall des Anteils FOXP3-positiver Zellen führte.

In den CD8⁺CD25⁺T-Lymphozyten (Daten nicht gezeigt) zeigte sich kein einheitlicher Effekt der bakteriellen Stimuli auf die FOXP3-Expression. Die FOXP3⁺CD8⁺CD25⁺T-Lymphozyten

Ergebnisse

kamen außerdem in deutlich geringerer Zahl vor ($2,28\% \pm 1,28\%$) als die $\text{FOXP3}^+ \text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ -T-Lymphozyten.

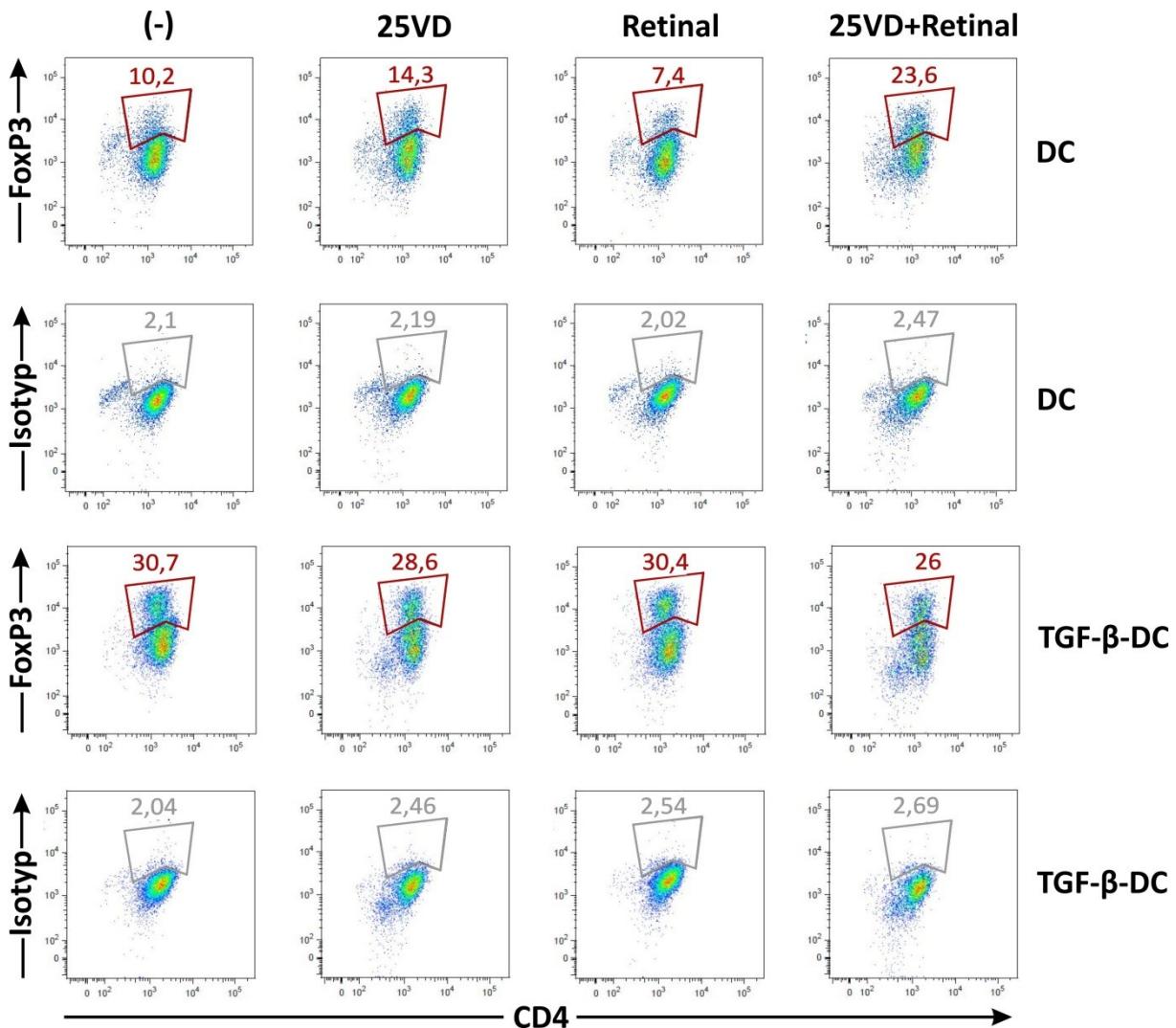


Abbildung 5-9: Einfluss von 25VD, Retinal und TGF β auf den Anteil FOXP3^+ innerhalb $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ -T-Lymphozyten in der MLR

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Zur Generierung der TGF β -DCs wurden außerdem 10ng/ml TGF β hinzugegeben. Am achten Tag wurden die iDCs bzw. TGF β -DCs geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei der bakterielle Stimulus LPS (10ng/ml) sowie die Vitaminvorstufen 25VD (5×10^{-8} M), Retinal (10^{-6} M), eine Kombination beider Vitaminvorstufen ($25VD 5 \times 10^{-8}$ M, Retinal 10^{-6} M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. Die FACS-Oberflächenfärbung auf CD3, CD4, CD8 sowie die Intrazellulärfärbung auf FOXP3 bzw. die FOXP3-Isotyp-Färbung erfolgten am sechsten Tag der MLR. Dargestellt sind jeweils die „CD4 $^+$ gegen FOXP3^+ “ bzw. „CD4 $^+$ gegen FOXP3-Isotyp^+ “-Plots eines repräsentativen Experiments. Die Gates erfassen die FOXP3^+ bzw. FOXP3-Isotyp^+ Zellen innerhalb der $\text{CD4}^+ \text{CD25}^+$ Population (Angabe in %).

Neben dem Einfluss der bakteriellen Stimuli auf den Anteil regulatorischer T-Zellen in der MLR wurde die Wirkung von 25VD und Retinal untersucht. Wie Abbildung 5-9 und Abbildung 5-10 A darstellen, wurde in den MLRs mit LPS weder mit 25VD noch mit Retinal ein

signifikanter Unterschied im Anteil FOXP3⁺Zellen unter den CD4⁺CD25⁺T-Lymphozyten. In MLRs, die mit der Kombination aus 25VD und Retinal inkubiert worden waren, wurden jedoch signifikant mehr FOXP3⁺Zellen in den CD4⁺CD25⁺T-Lymphozyten gefunden. Dasselbe zeigte sich, etwas abgeschwächt, auch in den MLRs mit LPS und MDP (Ergebnisse nicht dargestellt).

Weiterhin wurden MLRs mit TGFβ-DC und Lymphozyten auf den Anteil FOXP3-positiver-T-Lymphozyten innerhalb der CD4⁺CD25⁺T-Lymphozyten hin untersucht. Im Vergleich zu MLRs ohne TGFβ-DCs wurde ein deutlich höherer Anteil regulatorischer T-Zellen in MLRs mit TGFβ-DCs festgestellt (Abbildung 5-9 und Abbildung 5-10 B). Darüber hinaus war ein leichter Trend zu verminderten Anteilen FOXP3⁺Zellen in MLRs mit den Vitaminen zu erkennen. Die nicht dargestellten Ergebnisse aus den MLRs mit LPS und MDP zeigten eine ähnliche Abhängigkeit der Entstehung regulatorischer T-Zellen von der Art der eingesetzten dendritischen Zellen.

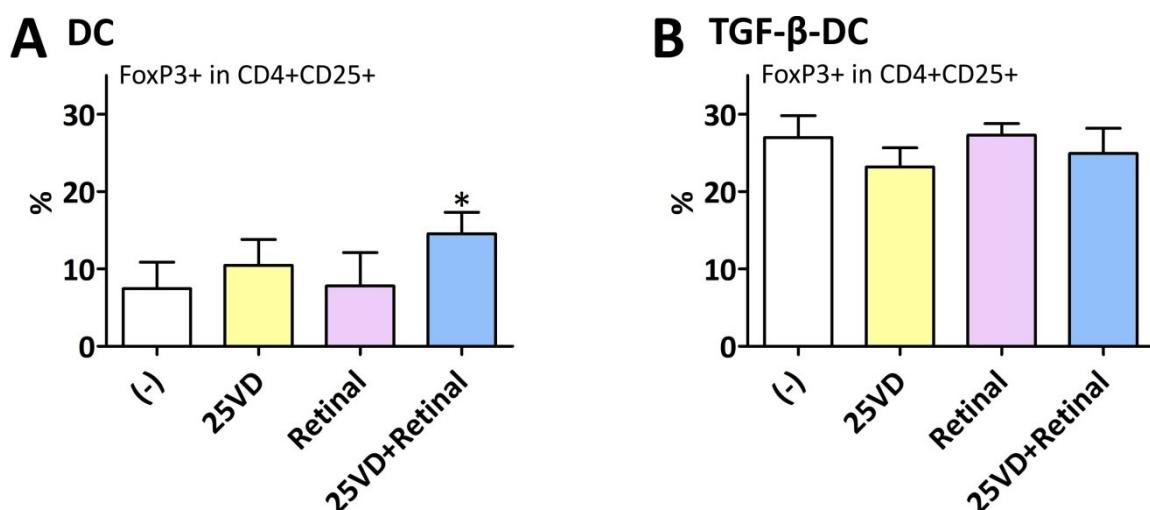


Abbildung 5-10: Einfluss von 25VD, Retinal und TGFβ auf den Anteil FOXP3⁺ an den CD4⁺CD25⁺T-Lymphozyten in der MLR
Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Zur Generierung der TGFβ-DCs wurden außerdem 10ng/ml TGFβ hinzugegeben. Am achten Tag wurden die DC bzw. TGFβ-DC geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei jeweils der bakterielle Stimulus LPS (10ng/ml) sowie die Vitaminvorstufen 25VD (5×10^{-8} M), Retinal (10^{-6} M), eine Kombination beider Vitaminvorstufen ($25VD 5 \times 10^{-8}$ M, Retinal 10^{-6} M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. **A** zeigt Ansätze in denen DC mit LPS und Lymphozyten sowie den angegebenen Vitaminen kultiviert wurden, **B** Ansätze mit TGFβ-DC, Lymphozyten, LPS (10ng/ml) und Vitaminen.
Die FACS-Oberflächenfärbung auf CD3, CD4, CD8 sowie die Intrazellularfärbung auf FOXP3 bzw. die FOXP3-Isotyp-Färbung erfolgten am sechsten Tag der MLR. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM des prozentualen Anteils (Isotyp abgezogen) FOXP3⁺Zellen an der gesamten CD4⁺CD25⁺Population aus fünf (**A**) bzw. drei (**B**) unabhängigen Experimenten. Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe des Student's t-Test: *p<0,05, relativ zur vitaminfreien Kontrolle.

5.6. CD8 $\alpha\alpha$ -positive T-Zellen

Eine Untergruppe regulatorischer CD8 $^+$ T-Zellen stellen die CD8 $\alpha\alpha$ $^+$ TCR $\alpha\beta$ $^+$ T-Lymphozyten dar. Diese kommen in hoher Anzahl unter den intraepithelialen Lymphozyten des Darms sowie in den mesenterialen Lymphknoten vor. In einem deutlich geringeren Anteil (<1% der CD8 $^+$ T-Lymphozyten) sind sie auch in extraintestinalen Lymphknoten und der Milz zu finden. Die Entstehung, das Auftreten und die regulatorische Funktion dieser Zellen sind noch nicht genau erforscht [91]. Da im Darm von VDR-knockout Mäusen weniger CD8 $\alpha\alpha$ $^+$ TCR $\alpha\beta$ $^+$ T-Zellen vorkommen gilt ein Einfluss von Vitamin D auf die Entstehung dieser regulatorischen Zellen als wahrscheinlich [107]. Obwohl von einem sehr geringen Anteil CD8 $\alpha\alpha$ $^+$ TCR $\alpha\beta$ $^+$ -T-Lymphozyten im peripheren Blut ausgegangen werden musste, wurden die MLRs auf den Anteil CD8 $\alpha\alpha$ $^+$ in $\alpha\beta$ TCR $^+$ hin untersucht, vor allem vor dem Hintergrund einer möglichen Hochregulation durch 25VD, Retinal oder deren Kombination bzw. durch den Einsatz von TGF β -DCs.

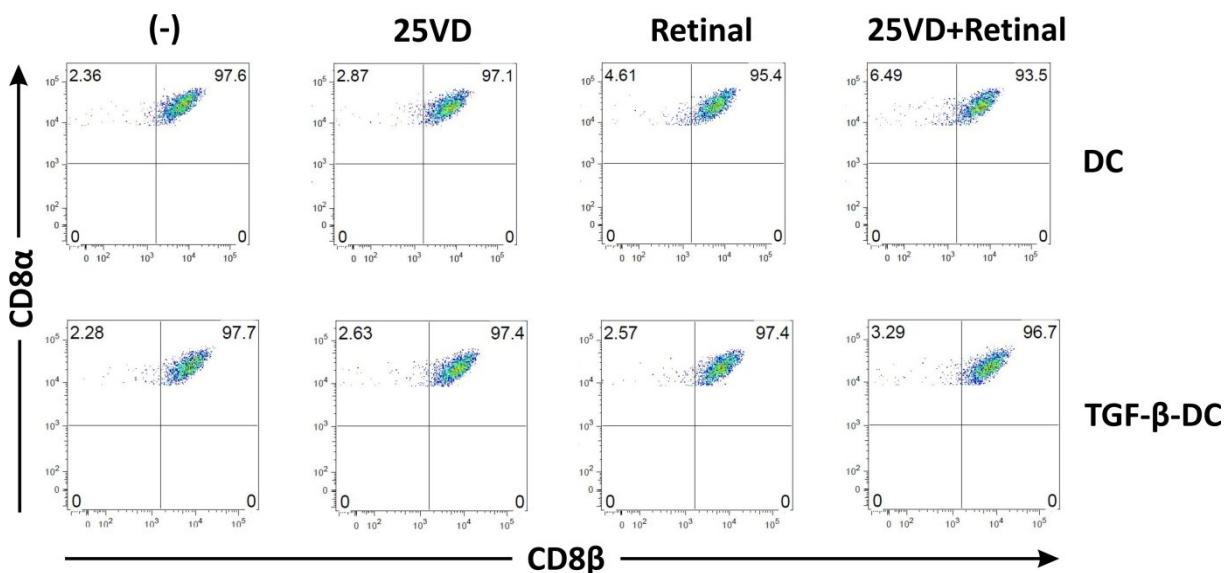


Abbildung 5-11: Anteil CD8 $\alpha\alpha$ $^+$ Zellen in $\alpha\beta$ TCR $^+$ CD8 α $^+$ T-Lymphozyten nach MLRs mit LPS

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Zur Generierung der TGF β -DCs wurden außerdem 10ng/ml TGF β hinzugegeben. Am achten Tag wurden die iDCs bzw. TGF β -DCs geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei die bakteriellen Stimuli LPS (10ng/ml) sowie die beiden Vitaminvorstufen 25VD (5×10^{-8} M), Retinal (10^{-6} M), eine Kombination beider Vitaminvorstufen (25VD 5×10^{-8} M, Retinal 10^{-6} M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. Die FACS-Färbung auf CD3, CD4, $\alpha\beta$ TCR, CD8 α , und CD8 β erfolgten am sechsten Tag der MLR. Dargestellt ist der Prozentsatz CD8 $\alpha\alpha$ $^+$ CD8 β (CD8 $\alpha\alpha$ $^+$) Zellen innerhalb der $\alpha\beta$ TCR $^+$ CD8 α $^+$ aus einem repräsentativen Einzelversuch.

In den mit LPS (\pm MDP) stimulierten MLRs mit DCs und Lymphozyten wurde nur ein sehr geringer Anteil CD8 $\alpha\alpha^+$ Zellen in den $\alpha\beta$ TCR $^+$ T-Lymphozyten gefunden. Weder der Zusatz der Vitamine noch der Einsatz von TGF β -DCs wirkte sich deutlich auf den Anteil der CD8 α^+ CD8 β^- Population aus (Abbildung 5-11 und Abbildung 5-12).

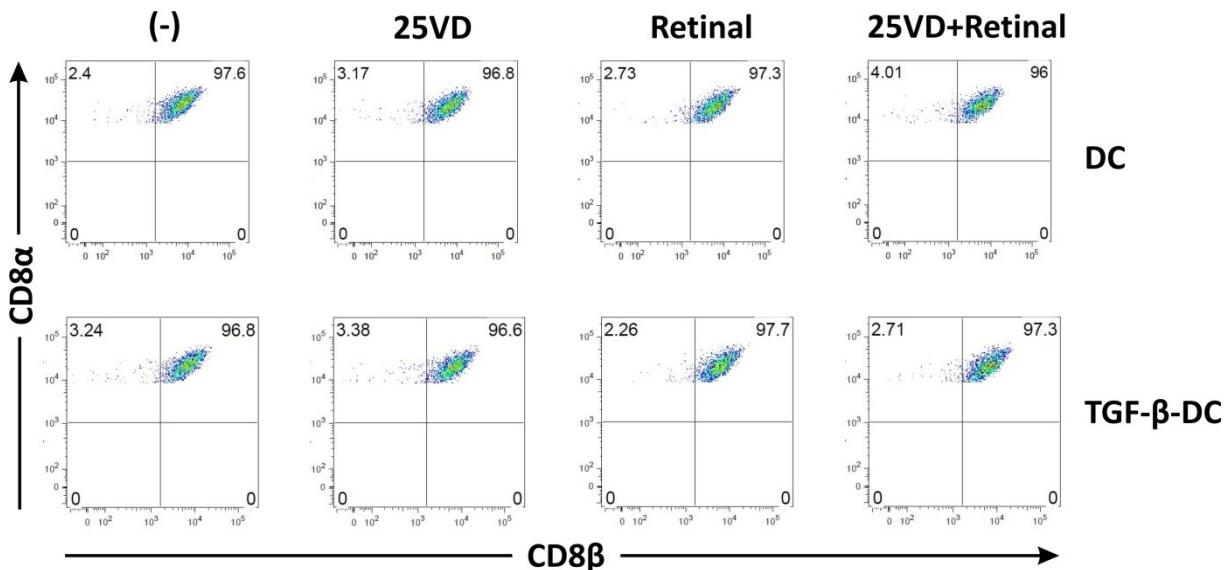


Abbildung 5-12: Anteil CD8 $\alpha\alpha^+$ Zellen in TCR $\alpha\beta^+$ CD8 α^+ T-Lymphozyten nach MLRs mit LPS+MDP

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Zur Generierung der TGF β -DCs wurden außerdem 10ng/ml TGF β hinzugegeben. Am achten Tag wurden die iDCs bzw. TGF β -DCs geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei die bakteriellen Stimuli LPS (10ng/ml) und MDP (100ng/ml) sowie die beiden Vitaminvorstufen 25VD (5×10^{-8} M), Retinal (10^{-6} M), eine Kombination beider Vitaminvorstufen (25VD 5×10^{-8} M, Retinal 10^{-6} M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. Die FACS-Färbung auf CD3, CD4, $\alpha\beta$ TCR, CD8 α , und CD8 β erfolgten am sechsten Tag der MLR. Dargestellt ist der Prozentsatz CD8 α^+ CD8 β^- (CD8 $\alpha\alpha^+$) Zellen innerhalb der $\alpha\beta$ TCR $^+$ CD8 α^+ aus einem repräsentativen Einzelversuch.

Außerdem wurden die T-Lymphozyten in den verschiedenen MLRs auf das Auftreten von PD-1, sowie von TCR $\gamma\delta^+$ T-Lymphozyten untersucht. Auch hier zeigten sich keine Unterschiede (Daten nicht gezeigt).

5.7. CD62L-negative T-Zellen

Das auf naiven T-Zellen exprimierte L-Selektin (CD62L) tritt mit P- und E-Selektin auf dem Gefäßendothel hochendothelialer Venolen peripherer lymphatischer Gewebe in Kontakt und bewirkt das „Rolling“ der Zellen an den Gefäßwänden. Dies stellt den ersten Schritt der Leukodiapedese in sekundär lymphatische Gewebe da, durch die die naiven T-Lymphozyten rezirkulieren. Aktivierte T-Lymphozyten und Memory-T-Lymphozyten weisen ein anderes Repertoire an Zelloberflächenmolekülen auf als naive T-Lymphozyten. Unter anderem verlieren Effektor-T-Lymphozyten und T_{EM} das beschriebene L-Selektin und exprimieren

Ergebnisse

vermehrt Adhäsionsmoleküle mithilfe derer sie in Entzündungsherde einwandern können [2].

Da CD62L⁺T-Lymphozyten als potente Auslöser der GvHD gelten und die CD62L⁻ CD45RO⁺Effektor Memory T-Lymphozyten (T_{EM}) im Gegensatz dazu bei erhaltener GvL Wirkung keine GvHD auslösen [286–289, 323], wurde der Einfluss der Vitamine und bakteriellen Stimuli auf die Expression von CD62L in Lymphozyten aus verschiedenen MLRs durchflusszytometrisch untersucht.

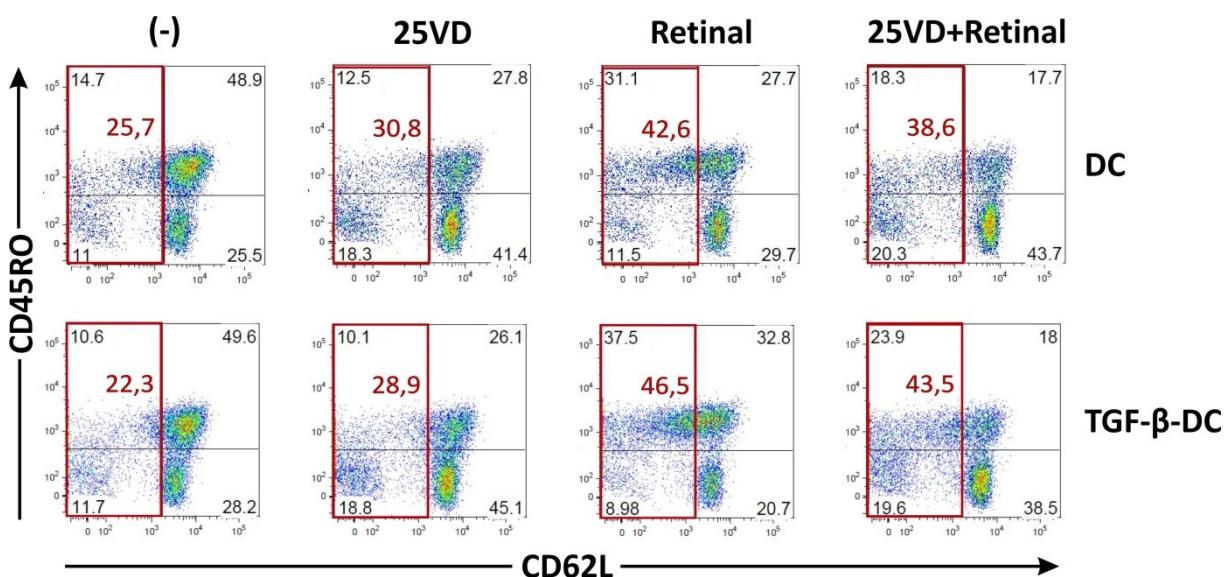


Abbildung 5-13: Retinal bewirkt die verminderte Expression von CD62L auf CD4⁺T-Lymphozyten in der MLR

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Zur Generierung der TGF β -DCs wurden außerdem 10ng/ml TGF β hinzugegeben. Am achten Tag wurden die iDCs bzw. TGF β -DCs geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei der bakteriellen Stimulus LPS (10ng/ml) sowie die beiden Vitaminvorstufen 25VD (5×10^{-8} M), Retinal (10^{-6} M), eine Kombination beider Vitaminvorstufen (25VD 5×10^{-8} M, Retinal 10^{-6} M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. Die FACS-Oberflächenfärbung auf CD3, CD4, CD8, CD62L und CD45RO erfolgten am sechsten Tag der MLR. Dargestellt sind CD62L⁻ und CD45RO⁺ Zellen innerhalb der CD4⁺T-Lymphozyten aus einem repräsentativen Einzelversuch. Rot markiert ist jeweils das Gate um die CD62L⁻Population (Angaben in Prozent der CD4⁺T-Lymphozyten).

Die Zugabe von Retinal zur MLR ließ den Anteil CD62L⁻Zellen sowohl in den CD4⁺T-Lymphozyten (Abbildung 5-13) als auch in den CD8⁺T-Lymphozyten (Abbildung 5-14) auf ungefähr das Doppelte ansteigen. 25VD schien keinen Effekt auf die Expression von CD62L auszuüben. Die Kombination von 25VD und Retinal zeigte nicht mehr Effekt, als Retinal allein. Die gleichen Ergebnisse lieferten MLRs mit LPS und MDP (nicht dargestellt).

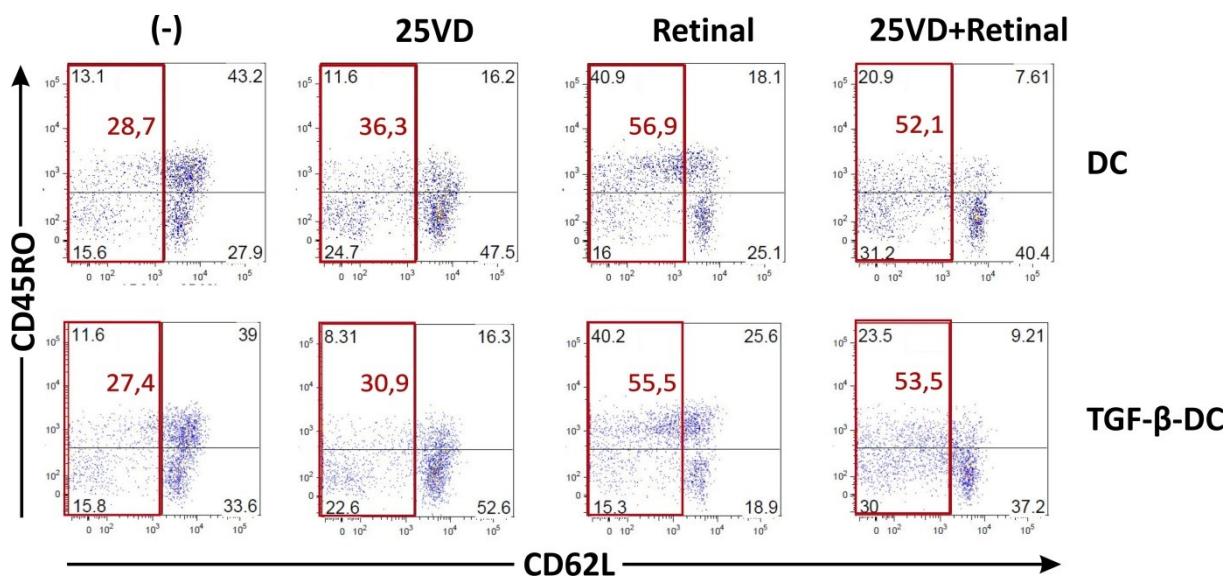


Abbildung 5-14: Retinal bewirkt die verminderte Expression von CD62L auf CD8⁺T-Lymphozyten in der MLR

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Zur Generierung der TGF β -DCs wurden außerdem 10ng/ml TGF β hinzugegeben. Am achten Tag wurden die iDCs bzw. TGF β -DCs geerntet und je 0,5x10⁵/ml mit allogenen Lymphozyten (0,5x10⁶/ml) in einer MLR kokultiviert, wobei der bakterielle Stimulus LPS (10ng/ml) sowie die beiden Vitaminvorstufen 25VD (5x10⁻⁸M), Retinal (10⁻⁶M), eine Kombination beider Vitaminvorstufen (25VD 5x10⁻⁸M, Retinal 10⁻⁶M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. Die FACS-Oberflächenfärbung auf CD3, CD4, CD8, CD62L und CD45RO erfolgten am sechsten Tag der MLR. Dargestellt sind CD62L⁻ und CD45RO⁺ Zellen innerhalb der CD8⁺T-Lymphozyten aus einem repräsentativen Einzelversuch. Rot markiert ist jeweils das Gate um die CD62L⁻Population (Angaben in Prozent der CD8⁺T-Lymphozyten).

Auch in MLRs mit TGF β -DC anstatt DC wurde eine deutliche Steigerung des Anteils CD62L⁻ Zellen an den CD4⁺T-Lymphozyten und CD8⁺T-Lymphozyten durch Retinal detektiert. Dies galt ebenfalls sowohl für MLRs mit LPS (Abbildung 5-13 und Abbildung 5-14), als auch für diejenigen mit LPS und MDP (Daten nicht gezeigt). Auch der Anteil der CD45RO⁺CD62L⁻T-Lymphozyten, die als T_{EM} betrachtet werden können [289], stieg unter dem Einfluss von Retinal deutlich an.

Der negative Effekt von Retinal auf die Expression von CD62L auf Lymphozyten in der MLR wurde in mehreren unabhängigen Versuchen reproduziert (siehe Abbildung 5-15). Interessanterweise zeigte sich unter alleinigem Einfluss von Retinal dabei ein deutlicher Anstieg als beim Zusammenwirken von Retinal und 25VD. Unter 25VD und Retinal kam es zwar wie beschrieben auch zu einem deutlichen Anstieg der CD62L⁻T-Lymphozyten, jedoch zeigte sich hier eine deutlich größere CD45RO⁺CD62L⁻Population als unter alleiniger Wirkung von Retinal. Der Einsatz von TGF β -DCs anstatt DCs zeigte keinen Einfluss auf die CD45RO⁺CD62L⁻T-Lymphozyten und damit die T_{EM}-Polarisation.

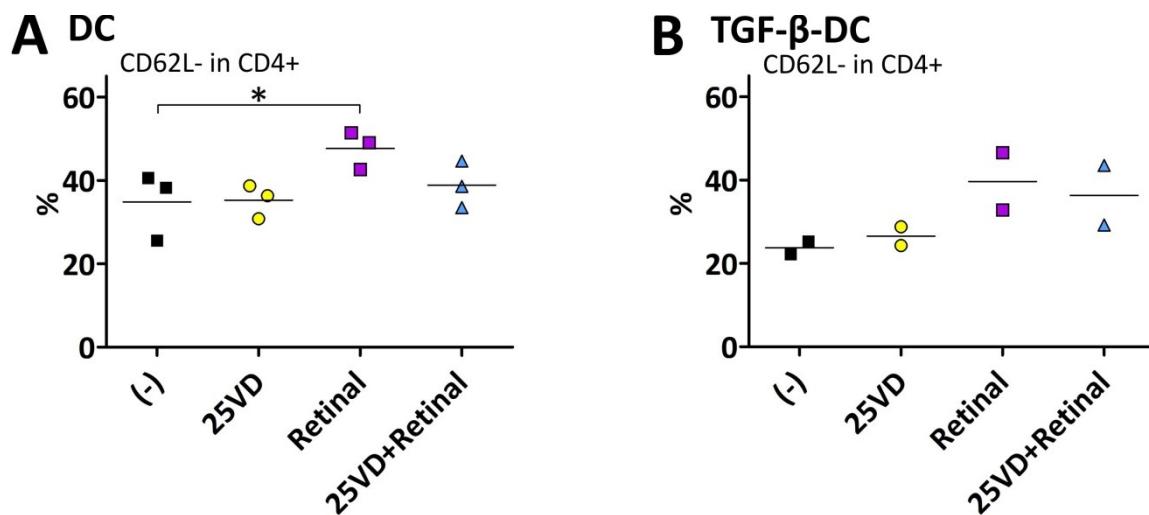


Abbildung 5-15: Retinal bewirkt die verminderte Expression von CD62L auf CD4⁺T-Lymphozyten in der MLR

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Zur Generierung der TGF β -DCs wurden außerdem 10ng/ml TGF β hinzugegeben. Am achten Tag wurden die DCs bzw. TGF β -DCs geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei jeweils bakterielle Stimuli sowie die Vitaminvorstufen 25VD (5×10^{-8} M), Retinal (10^{-6} M), eine Kombination beider Vitaminvorstufen ($25VD 5 \times 10^{-8}$ M, Retinal 10^{-6} M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. **A** zeigt Ansätze in denen DC mit LPS (10ng/ml) und Lymphozyten sowie den angegebenen Vitaminen kultiviert wurden und **B** Ansätze mit TGF β -DC, Lymphozyten, LPS (10ng/m) und Vitaminen.

Die FACS-Oberflächenfärbung auf CD3, CD4, CD8, CD62L und CD45RO erfolgten am sechsten Tag der MLR. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei (A) bzw. zwei (B) unabhängigen Einzelexperimenten des prozentualen Anteils der jeweiligen Population an CD4⁺T-Lymphozyten. Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe des Student's t-Test: *p<0,05, relativ zur vitaminfreien Kontrolle.

Erstaunlicherweise bewirkte der Zusatz der biologisch aktiven Retinsäure (9cisRA) anstatt der inaktiven Vorstufe Retinal in einem Einzelversuch keine weitere Erhöhung der CD62L⁻ Zellen an CD4⁺T-Lymphozyten oder CD8⁺T-Lymphozyten in den MLRs, sondern zeigte geringere Effekte, was für die Wichtigkeit einer lokale Umsetzung von Retinal zum biologisch aktiven Vitamin spricht. Auch ergab sich kein Unterschied zwischen 25VD und 1,25VD (Abbildung 9-4 und Abbildung 9-5 im Anhang).

Da die Anwesenheit von Retinal in MLRs unabhängig von sonstigen Veränderungen (TGF β -DCs vs. DCs, LPS vs. LPS+MDP, mit/ohne zusätzliches Vitamin D) die Expression von CD62L hemmte, sollte in weiteren Experimenten die Frage geklärt werden, ob dendritische Zellen in der Lage sind die zugegebene Vitaminvorstufe Retinal in die aktive Retinsäure umzusetzen.

5.8. Aktivität der ALDH in Dendritischen Zellen

Die Expression und Aktivität der Retinaldehyd-Dehydrogenase (RALDH/ALDH) ist für verschiedene murine DCs, insbesondere im Darm, jedoch auch in der Haut und Lunge bzw. den assoziierten lymphatischen Geweben beschrieben [110, 178, 180, 181]. Durch die Aktivität dieses Enzyms entsteht die biologisch aktive Retinsäure (RA) aus der inaktiven Vorstufe Retinal [164].

Die Quantifizierung der RALDH/ALDH-Aktivität geschah mit Hilfe des ALDEFLUOR™ Assays, bei dem ein Substrat durch die ALDH in ein fluoreszierendes Produkt umgesetzt wird, dessen Anwesenheit durchflusszytometrisch erfasst werden kann. Als Negativkontrolle fungierten sonst gleich behandelte Ansätze, denen der ALDH-Inhibitor DEAB zugesetzt wurde.

Monozyten aus dem venösen Blut gesunder Spender wurden mit GM-CSF und IL-4 in sieben Tagen zu iDC differenziert. Schon die als Kontrolle zwei weitere Tage ohne weiteren Zusatz inkubierten iDC zeigten eine deutliche Aktivität der ALDH auf (siehe Abbildung 5-16 A) Etwa ein Viertel der iDC war in der Lage das Substrat umzusetzen. In DCs, die zwei Tage mit IFN γ oder TGF β inkubiert worden waren stieg der Anteil ALDH-positiver DCs sogar auf fast 40% an (siehe Abbildung 5-16 A).

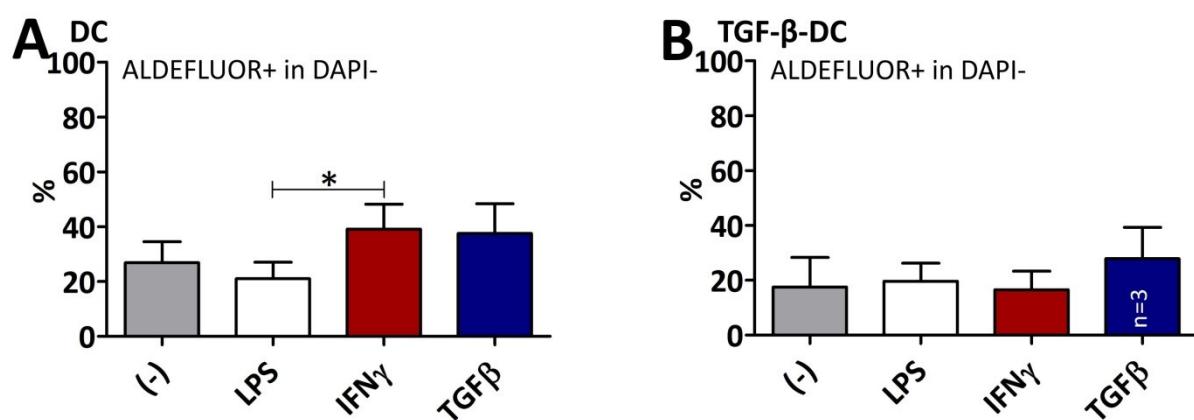


Abbildung 5-16: ALDEFLUOR-positive DC und TGF β -DC nach zwei Tagen Stimulation mit LPS, IFN γ oder TGF β

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren, wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Zur Generierung der TGF β -DCs wurden außerdem 10ng/ml TGF β hinzugegeben. Am siebten Tag wurden der bakterielle Stimulus LPS (10ng/ml) oder die rekombinanten humanen Zytokine IFN γ (1000IU/ml = 50ng/ml) oder TGF β (10ng/ml), oder als Kontrolle kein Stimulus oder Zytokin in derselben Zellkulturflasche zugesetzt. Die Färbung der Zellen mittels ALDEFLUOR™ Kit erfolgte am neunten Tag. Kurz vor der durchflusszytometrischen Messung wurde der Farbstoff DAPI hinzugegeben. Dargestellt sind Mittelwerte aus fünf (bzw. wo n=3 gekennzeichnet drei) unabhängigen Experimenten. A zeigt Ansätze mit DCs und B Ansätze mit TGF β -DCs. Die angegebenen Zahlenwerte entsprechen dem Mittelwert \pm SEM des prozentualen Anteils der ALDEFLUOR $^+$ Zellen an der DAPI Population. Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe des Student's t-Test: *p<0,05, verglichene Werte mit Balken markiert.

Ergebnisse

Außerdem wurden TGF β -DCs auf ihre ALDH-Aktivität hin untersucht. Wie in Abbildung 5-16 B zu sehen ist, fiel hier ein im Vergleich zu den ohne TGF β generierten DCs ein etwas geringerer Anteil ALDH-positiver Zellen auf, der durch die Zugabe von IFN γ nicht gesteigert wurde. Nur bei erneuter Zugabe von TGF β (d0 und d7) zeichnete sich ein leichter Trend zur gesteigerten ALDH-Aktivität im Vergleich zur lediglich an d0 mit TGF β versetzten Kontrolle ab. Die Zugabe von LPS hatte weder in den DC noch in den TGF β -DC Einfluss auf die ALDH-Aktivität.

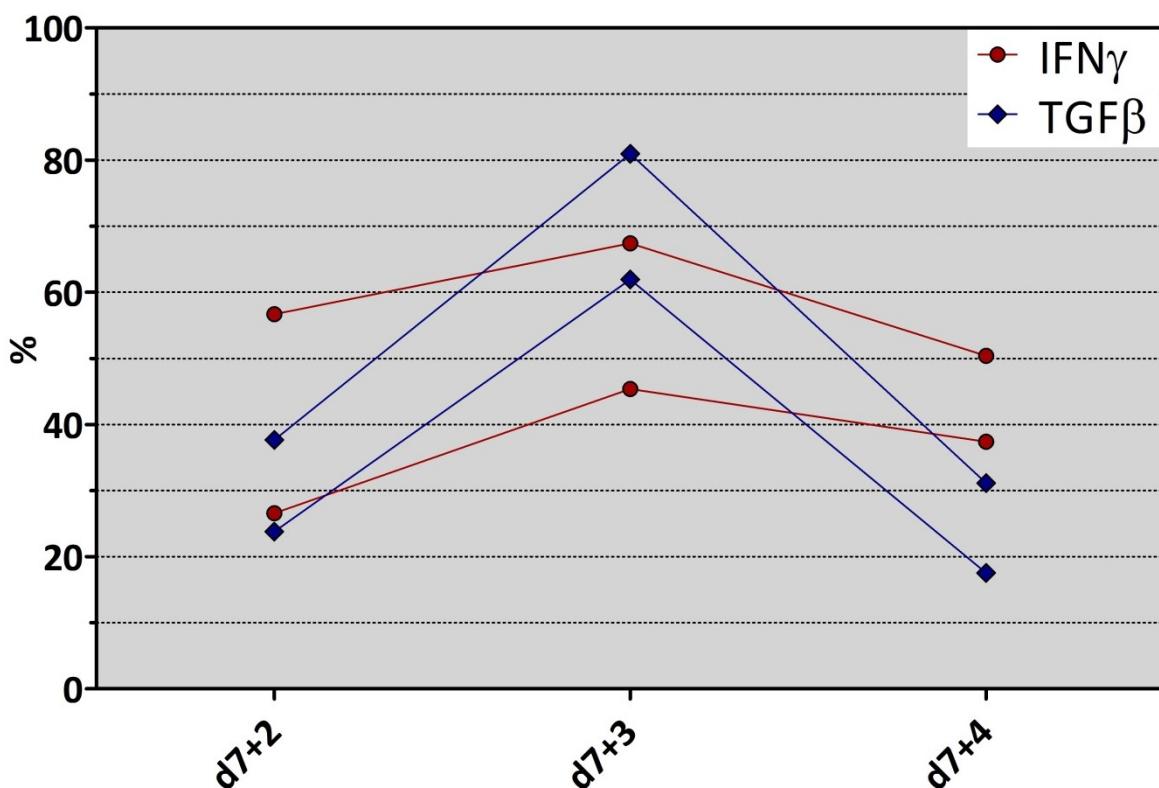


Abbildung 5-17: ALDEFLUOR-positive DC nach zwei, drei und vier Tagen Stimulation mit IFN γ oder TGF β

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Zur Generierung der TGF β -DCs wurden außerdem 10ng/ml TGF β hinzugegeben. Am siebten Tag wurden die rekombinanten humanen Zytokine IFN γ (1000IU/ml = 50ng/ml) oder TGF β (10ng/ml) in derselben Zellkulturflasche zugesetzt. Die Färbung der Zellen mittels ALDEFLUOR™ kit erfolgte am neunten, zehnten bzw. elften Tag. Kurz vor der durchfluszytometrischen Messung wurde der Farbstoff DAPI hinzugegeben. Dargestellt sind Messergebnisse zweier unabhängiger Einzelexperimente. Die angegebenen Zahlenwerte entsprechen dem prozentualen Anteil der ALDEFLUOR⁺ Zellen an der DAPI Population.

Des Weiteren wurde die ALDH-Aktivität in iDC nach zwei, drei und vier Tagen Inkubation mit den Zytokinen IFNy und TGF β ermittelt. In zwei unabhängigen Versuchen zeigte sich, wie in Abbildung 5-17 dargestellt, gleichermaßen ein Maximum der ALDH-Aktivität am dritten Tag der Stimulation. Abgeschwächt war diese Steigerung auch bei IFNy zu verzeichnen. Ähnlich zeigte sich dieser Effekt auch in den TGF β -DC (Daten nicht gezeigt). Weder bei iDC noch bei den mit LPS stimulierten DC bzw. TGF β -DC war ein entsprechender Anstieg der ALDEFLUOR $^+$ Zellen erkennbar.

6. Diskussion

Die GvHD schränkt die Therapieerfolge durch hämatopoetische Stammzelltransplantationen ein [1, 213, 214]. Wie der häufig erwünschte Graft-versus-Tumor Effekt wird auch die GvHD selbst durch T-Zellen vermittelt [219–221]. Eine angepasste Modulation der T-Lymphozyten-Funktion stellt deshalb einen wichtigen Ansatzpunkt für die Therapie der GvHD da [279]. Dafür ist ein möglichst genaues Verständnis der zellulären und molekularen Einflussfaktoren nötig [279]. T-Lymphozyten werden durch dendritische Zellen aktiviert, die unter dem Einfluss des umgebenden Mikromilieus entweder stimulierende oder tolerogene Eigenschaften annehmen [33, 43]. Zielorgane der GvHD sind vor allem Grenzen zur Umwelt an denen zahlreiche Pathogene vorkommen. Diese lösen eine Aktivierung der DCs und in der Folge der T-Lymphozyten aus [219]. Demgegenüber stehen immunmodulatorische Umgebungsfaktoren wie TGF β oder Vitamin D und A, für die in Experimenten eine lindernde Wirkung auf die GvHD nachgewiesen werden konnte [268, 300, 309]. Um das Verständnis für T-Zell-vermittelte Immunantworten weiter zu verbessern wurde in dieser Arbeit der Einfluss bakterieller Stimuli (LPS, MDP), toleranzvermittelnder Zytokine (TGF β) sowie der von Vitamin D und A auf humane DCs und deren Fähigkeit allogene T-Lymphozyten zu aktivieren untersucht.

6.1. Einfluss der bakteriellen Stimuli LPS und MDP auf dendritische Zellen und die T-Zell-vermittelte Immunantwort

Dendritische Zellen sind durch ihre PRR in der Lage Pathogene und Gefahrensignale zu erkennen. LPS aus gramnegativen Bakterien bindet an den TLR-4 der DCs (siehe Kapitel 1.2.2). Die LPS-abhängige Aktivierung der DCs gilt als einer der bedeutendsten Pathomechanismen der GvHD [242], was sich in einem Rückgang der klinischen Symptomatik bei TLR4-Mutationen [324], TLR4-knock-out Mäusen [325] oder im Rahmen einer LPS-Antagonisierung [241] zeigt.

LPS induziert in DCs die Reifung zu professionellen APCs, das heißt die DCs exprimieren mehr costimulatorische Moleküle und MCH-Komplexe auf ihrer Oberfläche, zudem sezernieren sie vermehrt inflammatorische Zytokine [21, 326–328]. Die Wirkung LPS-stimulierter DCs (LPS-DCs) auf allogene T-Lymphozyten wurde hier anhand von MLRs genauer untersucht. Unsere Gruppe konnte bereits in früheren Experimenten eine gesteigerte Proliferation allogener T-

Lymphozyten beim Kontakt mit LPS-DCs im Vergleich zu nicht stimulierten DCs nachweisen. In dieser Arbeit wurden bakterielle Stimuli später als in den vorangegangenen Arbeiten und zwar erst zu Beginn der MLR zusammen mit den allogenen T-Lymphozyten zugegeben. Modellhaft entspricht dies einer Exposition eines frisch transplantierten allo-Stammzellempfängers gegenüber bakteriellen Bestandteilen. Auch unter diesen veränderten Bedingungen konnte eine deutlich gesteigerte Proliferation der allo-T-Lymphozyten in denjenigen MLRs beobachtet werden die LPS als Zusatz enthielten (vergleiche hierzu die Proliferationsmessungen in Ansätzen mit LPS in Abbildung 5-3 mit denjenigen ohne LPS in Abbildung 9-2). Diese Ergebnisse legen nahe, dass durch LPS auch hier ein reiferer DC-Phänotyp entsteht und dadurch eine potente allo-T-Lymphozyten-Aktivierung stattfindet als in MLRs ohne LPS.

Wie Abbildung 5-5 zeigt konnte zudem nachgewiesen werden, dass sowohl CD4⁺ als auch CD8⁺T-Lymphozyten nach Kontakt mit LPS-DCs, verglichen mit nicht bakteriell stimulierten MLRs, vermehrt CD25 auf ihrer Oberfläche exprimieren. Als Teil des IL-2-Rezeptors ist CD25 in T-Lymphozyten direkt an der Vermittlung von Überlebens- und Proliferationssignalen beteiligt [1, 329, 330], weshalb die CD25-Hochregulation eine der Ursachen der verstärkten Proliferation der allo-T-Lymphozyten in MLRs mit LPS-DCs sein könnte. Andererseits wird CD25 in T-Lymphozyten im Sinne eines positiven Feedbacks durch IL-2 hochreguliert [1, 330], sodass letztlich unklar bleibt ob es sich bei der Beobachtung um eine der Ursachen oder um eine Folge der T-Zell-Aktivierung durch LPS-DCs handelt. Der IL-2-CD25-Signalweg ist aber auch für das Überleben und die Funktion regulatorischer T-Zellen wichtig, wobei eine höhere T_{reg}-Aktivität die T-Lymphozyten-Proliferation hemmen sollte [1, 73, 81]. Dieser Effekt kommt vermutlich aufgrund der niedrigen T_{reg}-Zahlen in den MLRs mit LPS-DCs (siehe Tabelle 5-1) nicht zu tragen.

Unterschiede in der IL-2-Produktion konnten in der vorliegenden und in vorangegangenen Arbeiten unseres Labors nicht detektiert werden. Da die CD25-Expression, wie bereits erwähnt, im Sinne eines positiven Feedbacks mit der IL-2-Produktion verknüpft ist [1, 330] könnte aber die hier beobachtete erhöhte CD25-Expression der T-Lymphozyten in LPS-stimulierten MLRs ein indirektes Zeichen für eine zumindest zeitweise erhöhte IL-2-Produktion sein. Hierfür würde auch die gesteigerte T-Lymphozyten-Proliferation sprechen, die von IL-2 abhängig ist [1]. Die hier durchgeföhrte durchflusszytometrische Bestimmung

des intrazellulären IL-2 stellt zudem nur eine Momentaufnahme da. Möglicherweise wäre eine stärkere IL-2-Produktion unter dem Einfluss von LPS zu einem früheren Messzeitpunkt feststellbar. Für diese Vermutung spricht, dass der Höhepunkt der IL-2-Produktion acht bis zwölf Stunden nach Aktivierung der T-Lymphozyten erreicht sein und die Produktion nach 24 Stunden wieder abfallen soll [1].

Im Einklang mit früheren Arbeiten unserer Gruppe und der Literatur [326, 331, 332] lösten LPS-DCs in weiteren MLRs eine verstärkte T_{H1} -Polarisation, im Sinne einer vermehrten IFNy-Produktion (Abbildung 5-7) aus. Der ebenfalls beobachtete leichte Anstieg der $IL-2^+IFNy^+$ T-Lymphozyten lässt sich am ehesten durch eine anteilmäßige Zunahme der doppelt positiven Zellen bei starkem Anstieg der IFNy-Produktion erklären. T_{H1} sind für zellvermittelte Immunantworten von Bedeutung und schützen den Organismus einerseits vor Pathogenen [1, 3, 51], andererseits aktivieren sie im Rahmen der GvHD auch Effektorzellen, die Gewebeschäden verursachen. Jedoch werden hohe IFNy Konzentrationen auch mit dem erwünschten GvL-Effekt in Verbindung gebracht [55, 219, 229, 230]. Eine angepasste Modulation der T-Zell-Polarisation könnte gute Therapieerfolge in der GvHD bringen, weshalb in der Folge außerdem der Einfluss weiterer Umgebungs faktoren (TGF β , Vitamin D und A, s.u.) auf die T-Lymphozyten-Subgruppen getestet wurde. Regulatorische T-Zellen gelten als protektiv gegenüber der GvHD [280, 297]. Unter dem Einfluss von LPS wurde erwartungsgemäß eine verminderte T_{reg} -Polarisation beobachtet (Abbildung 9-3).

Insgesamt stehen die Ergebnisse der MLRs mit LPS (vermehrte T-Lymphozyten-Proliferation, erhöhte CD25-Expression, vermehrte T_{H1} - und verminderte T_{reg} -Polarisation, siehe Tabelle 6-1 und Abbildung 6-1) im Einklang mit dem Pathogenese-Modell der GvHD in dem die Translokation bakterieller Bestandteile, wie LPS, über geschädigte epitheliale Barrieren die Erkrankung induziert [55, 219, 229]. Auch korrespondieren sie mit Versuchen an Mäusen, die zeigten, dass genetische TLR-4 Defekte von Spender- und/oder Empfängerzellen eine verminderte DC- und T-Lymphozyten-Aktivierung sowie milder verlaufende GvHD bewirken [238, 325]. Genetische Studien, die sich mit SNPs an humanen TLR-4 und deren Auswirkung auf die GvHD beschäftigten brachten jedoch unterschiedliche Ergebnisse [242, 256, 333]. Einer Antagonisierung des LPS-TLR-4-Signalwegs als potente Therapiemöglichkeit für die GvHD stehen ein gesteigertes Infektionsrisiko bei vermindertem Ansprechen auf LPS und die Gefahr einer Sepsis durch gramnegative Erreger gegenüber [334, 335].

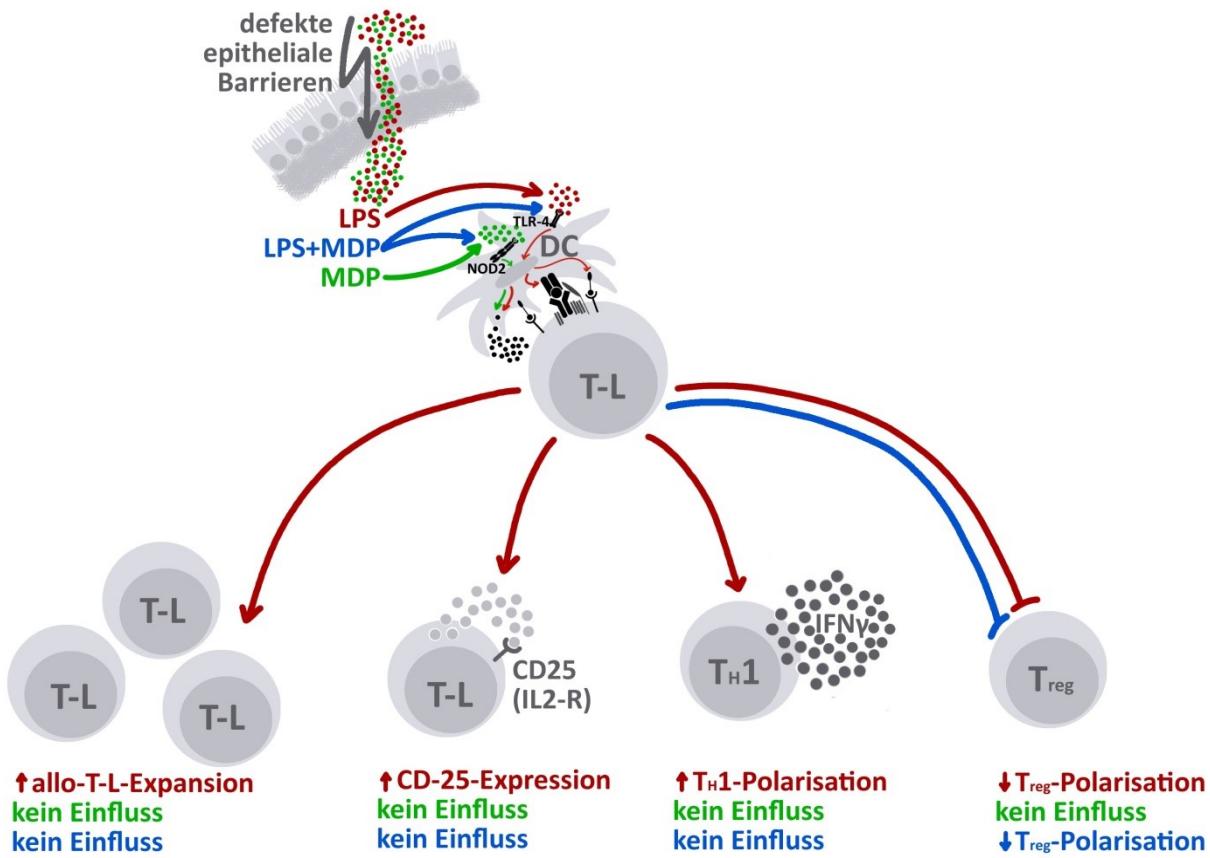


Abbildung 6-1: Einfluss der bakteriellen Stimuli LPS und MDP auf DCs und die T-Zell-vermittelte Immunantwort

Die Translokation bakterieller Bestandteile über epitheliale Barrieren gilt als einer der Auslöser der GvHD. In dieser Arbeit konnten passend zu dieser Annahme eine durch LPS verstärkte allo-T-Lymphozyten-Expansion, eine verstärkte CD25-Expression, eine vermehrte IFNy-Produktion im Sinne stärkerer T_H1-Polarisation und eine verminderte T_{reg}-Polarisation unter dem Einfluss von LPS nachgewiesen werden (rot markiert). Eine der Ursachen hierfür ist sicherlich die durch LPS gestärkte APC-Funktion der DCs (vermehrte Expression costimulatorischer Moleküle und MHC-Komplexe, vermehrte Zytokinsekretion). MDP nahm keinen entscheidenden Einfluss (grün markiert). Die Kombination aus LPS und MDP schien verglichen mit dem alleinigen Einsatz von LPS lediglich die T_{reg}-Polarisation noch weiter einzuschränken (blau markiert). Eigene zusammenfassende Abbildung der im Text erwähnten Effekte.

MDP ist ein Bestandteil der Zellwand grampositiver und gramnegativer Bakterien. DCs sind durch NOD2 in der Lage auf MDP zu reagieren [23, 30]. Die erhöhte Anfälligkeit für die GvHD bei Vorliegen von Mutationen im NOD2-Gen deutet auf eine immunmodulatorische Rolle des MDP-NOD2-Signalwegs hin [237, 242, 255–257, 336]. In Versuchen unserer Arbeitsgruppe konnte, entsprechend mehrerer Angaben in der Literatur, kein wesentlicher Einfluss von MDP auf die Expression costimulatorischer Moleküle und MHC-Komplexe in DCs nachgewiesen werden, was auf die Erhaltung eines unreiferen, tolerogenen DC-Phänotyps unter MDP-Einfluss hinweist [327, 337, 338]. MDP soll jedoch Einfluss auf die Sekretion mancher Zytokine durch DCs und damit auf die T-Lymphozyten-Polarisation nehmen [327, 338]. In dieser Arbeit konnte kein eindeutiger Einfluss von MDP auf die T-Lymphozyten-Proliferation (Abbildung 9-2), CD25-Expression (Abbildung 5-5 und Abbildung 5-6), IL-2-Produktion, T_H1-(Abbildung 5-7) oder T_{reg}-Polarisation (Abbildung 9-3) verglichen mit den

jeweiligen Kontrollen ohne bakterielle Stimuli nachgewiesen werden (Übersicht in Tabelle 6-1 und Abbildung 6-1). Dies ist mit der oben genannten Annahme, dass DCs, die in Kontakt mit MDP kommen in einem unreiferen, tolerogenen Zustand bleiben vereinbar, beweist jedoch keinen Effekt und erklärt auch nicht die vermutete immunregulatorische Rolle des MDP-NOD2-Signalwegs.

Da sich TLR- und NLR-Signalwege teilweise überschneiden [31, 259, 262] und das Immunsystem *in vivo* in der Regel mit mehreren bakteriellen Stimuli gleichzeitig konfrontiert ist lag es nahe auch Auswirkungen des gemeinsamen Einflusses von LPS und MDP zu untersuchen. Einige Autoren fanden teils synergistische Effekte der beiden bakteriellen Stimuli im Hinblick auf die DC-Reifung und Produktion proinflammatorischer Zytokine, was einer tolerogenen Rolle des MDP-NOD2-Signalwegs widerspräche [327, 332, 339]. Jedoch könnte ein Zusammenwirken der bakteriellen Stimuli auch die Produktion antiinflammatorischer Zytokine vermehren [327, 338] oder die TLR-vermittelte Produktion proinflammatorischer Zytokine vermindern [259, 262]. Deshalb war in dieser Arbeit von Interesse wie stabil der vermutete tolerogene Effekt des MDP unter Zugabe von LPS ist. Beim Vergleich von MLRs mit LPS und MLRs mit LPS und MDP konnten keine klaren Unterschiede in der Proliferation allogener T-Lymphozyten (gemessen anhand der Zellzahlen nach sieben Tagen, siehe Abbildung 5-1, sowie mittels [$\text{Methyl-}^3\text{H}$]-Thymidin-Proliferationsmessung, siehe Abbildung 5-2) und ebenfalls keine Unterschiede in der CD25-Expression (Abbildung 5-5) oder der Polarisation zu $T_{\text{H}}1$ (Abbildung 5-7) nachgewiesen werden. Dagegen schien der Anteil $\text{FOXP3}^+T_{\text{reg}}$ durch die Kombination von LPS und MDP noch geringer zu werden als unter alleinigem LPS-Einfluss (Abbildung 9-3, Tabelle 5-1), was gegen das vermutete tolerogene Potential des MDP und stattdessen für eine starke, wenn nicht gar verstärkte allogene T-Zell-vermittelte Immunantwort unter dem gemeinsamen Einfluss von LPS und MDP spricht. Nach den vorliegenden Daten ist ein vernachlässigbarer Effekt des MDP beim Zusammenwirken mit LPS wahrscheinlich. Die von anderen Autoren (s.o.) beschriebenen synergistischen Effekte der beiden Signalwege sind in Anbetracht der leicht verminderten T_{reg} -Polarisation ebenfalls denkbar.

Die schlechtere Prognose die bei GvHD-Patienten mit NOD2-Mutationen beschrieben ist [237, 242, 251, 255–258] scheint demnach von anderen, hier bislang nicht mitbetragteten Faktoren abhängig zu sein. Ein möglicher Einflussfaktor sind veränderte

Migrationseigenschaften der DCs und/oder T-Lymphozyten, die *in vivo* die resultierende Immunantwort entscheidend beeinflussen, *in vitro* jedoch nur schwer nachzuvollziehen sind. In der Literatur werden passend dazu verminderte CD4⁺Zahlen in der Haut und Darmschleimhaut von GvHD-Patienten mit NOD2-SNPs beschrieben, wobei vor allem CD4⁺FOXP3⁺T_{reg} vermindert waren [242, 336]. Um *in vitro* Aussagen über die Migrationseigenschaften der T-Lymphozyten treffen zu können wurde in dieser Arbeit die Expression des L-Selektins (CD62L) untersucht, das eine Migration naiver T-Lymphozyten in peripher lymphatische Gewebe vermittelt. Eine Herabregulation von CD62L ermöglicht es Effektor-T-Lymphozyten die lymphatischen Gewebe zu verlassen und ihre Wirkung am Entzündungsherd zu entfalten [1, 2, 33]. Es konnte jedoch kein Unterschied in der CD62L-Expression auf T-Lymphozyten aus MLRs mit LPS und MLRs mit LPS und MDP nachgewiesen werden. Um einen möglichen Effekt der MDP-NOD2-Achse auf die Migrationseigenschaften der Immunzellen zu detektieren sind weitere Untersuchungen anderer Homingrezeptoren sowohl der DCs als auch der T-Lymphozyten oder auch Untersuchungen an Gewebeproben sinnvoll. Weitere hier methodisch bedingt nicht mitbetrachtete Faktoren, die ursächlich für die protektive Rolle des NOD2 sein könnten, sind ein möglicherweise von der PRR-Ausstattung und -Funktion abhängiges Mikrobiom [259, 340, 341] sowie NOD2-abhängig verstärkte epitheliale Barrieren [342].

	(-)	LPS	MDP	LPS+MDP
[Methyl-³H]-Thymidin-Proliferationsmessung	Vergleichsgröße	↑↑	↔	↑↑
T-Lymphozyten Zellzahl	n.u.	Vergleichsgröße	n.u.	↔
CD25-Expression	Vergleichsgröße	(↑)	↔	↑
IL-2-Produktion	Vergleichsgröße	↔	↔	↔
IFNγ-Produktion (T_H1)	Vergleichsgröße	↑↑	↔	↑↑
Anteil CD25⁺FOXP3⁺T_{reg}	Vergleichsgröße	↓	↔	↓(↓)
Anteil CD62L-T-Zellen	n.u.	Vergleichsgröße	n.u.	↔

Tabelle 6-1: Zusammenfassung der Effekte von LPS und MDP auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit beobachteten und im Text erwähnten Effekte der bakteriellen Stimuli LPS, MDP sowie deren Kombination (LPS+MDP) im Vergleich zum nicht Stimulierten Ansatz (bzw. im Vergleich zum LPS-Ansatz, jeweils markiert mit „Vergleichsgröße“) auf die Ergebnisse der MLRs mit iDC und allo-T-Lymphozyten. Die linke Spalte benennt die jeweiligen Beobachtungsgrößen, die rechten vier Spalten die Zusätze. Abkürzung: n.u. nicht untersucht. Symbole: (-) kein bakterieller Stimulus, ↑↑ starke Zunahme, ↑ Zunahme, (↑) trendmäßige Zunahme, ↔ kein Effekt, ↓ Verminderung, ↓(↓) Verminderung bis starke Verminderung.

Wang et al beschrieben eine verstärkte NOD2-mRNA-Transkription unter dem Einfluss von 1,25VD [151], weshalb vermutet werden kann, dass sich die NOD2-vermittelte Immunmodulation erst unter dem Einfluss tolerogener Substanzen wie Vitamin D bemerkbar macht. Deshalb wurden in weiteren Versuchen andere mögliche Einflussfaktoren wie TGF β und die Vitamine A und D mit einbezogen. Deren Einsatz sollte klären ob eine oder die Kombination mehrerer Substanzen (womöglich auch im Zusammenwirken mit MDP) die LPS-DC-vermittelte starke allo-T-Lymphozyten-Proliferation sowie T_H1-Polarisation vermindert und stattdessen die T_{reg}-Polarisation verstärkt oder die Migrationseigenschaften der T-Lymphozyten beeinflusst.

6.2. TGF β -DCs und die T-Zell-vermittelte Immunantwort

Die Wichtigkeit des immunmodulatorischen Zytokins TGF β wird vor dem Hintergrund der schweren Autoimmunkrankheiten deutlich, die sich bei TGF β - oder TGF β -R-Defekten in Mäusen ausbilden. Die Krankheitsbilder ähneln denen, die bei FOXP3-/T_{reg}-Defekten auftreten, was eine T_{reg}-vermittelte immunmodulatorische Wirkung des TGF β nahe legt [100–103]. Auch auf die GvHD scheint TGF β Einfluss zu nehmen, was sich in einem Abfall des Serum-TGF β -Spiegels beim Auftreten der Erkrankung zeigt [268, 277, 278]. Zudem erhöhen TGF β - und TGF β -Rezeptormutationen das Erkrankungsrisiko an akuter GvHD [273–275]. In Mäusen wird die aGvHD durch Antagonisierung von TGF β agraviert [272]. Nach Angaben in der Literatur soll TGF β die Entstehung tolerogener dendritischer Zellen induzieren, demzufolge die Fähigkeit der DCs als APC zu fungieren abschwächen, die Entstehung und Aktivität von Effektor-T-Zellen (T_H1, T_H2, CTL) hemmen und zusammen mit Retinsäure die Entstehung von T_{reg} vorantreiben. Jedoch soll es zusammen mit IL-1, IL-6 und/oder IL-23 die Entstehung von T_H17 und deren assoziierte Zytokine (siehe Kapitel 1.3.3.) induzieren [1, 51, 64, 95, 96]. Aufgrund der beschriebenen lindernden Wirkungen von TGF β auf die akute GvHD (in Mäusen) sowie der Berichte über tolerogene Eigenschaften von TGF β -behandelten DCs wurden in dieser Arbeit die Auswirkungen von TGF β auf die Funktion humarer dendritischer Zellen und deren Effekte auf allogene-T-Lymphozyten in MLRs untersucht.

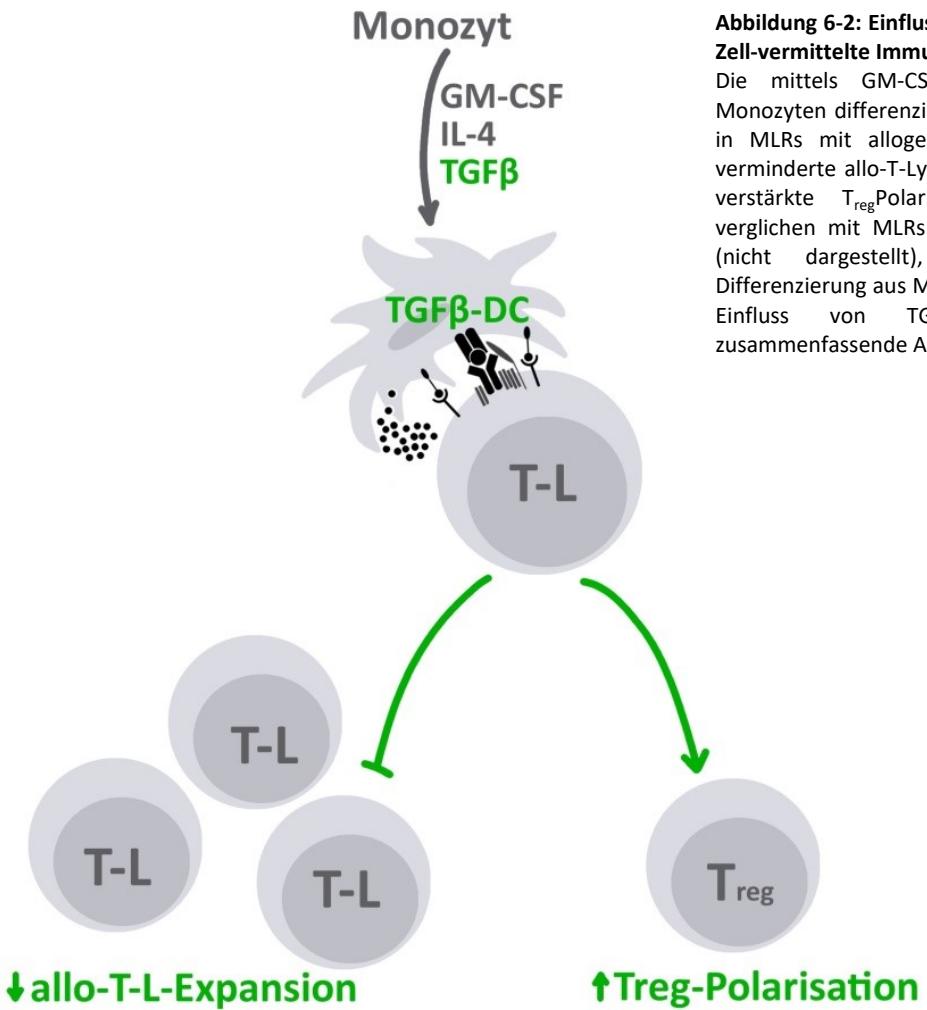


Abbildung 6-2: Einfluss von TGF β -DCs auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort

Die mittels GM-CSF, IL4 und TGF β aus Monozyten differenzierten TGF β -DCs bewirkten in MLRs mit allogenen T-Lymphozyten eine verminderte allo-T-Lymphozyten-Expansion und verstärkte T_{reg}Polarisation (grün markiert) verglichen mit MLRs mit konventionellen DCs (nicht dargestellt), die während ihrer Differenzierung aus Monozyten nicht unter dem Einfluss von TGF β standen. Eigene zusammenfassende Abbildung.

Monozyten differenzieren unter dem Einfluss von GM-CSF, IL-4 und TGF β zu Zellen, die morphologisch und funktionell den Langerhans-Zellen der Haut, einer DC-Subpopulation, ähneln [17, 318, 343]. Wie verschiedene Autoren berichten und auch in unserem Labor festgestellt werden konnte, exprimieren TGF β -DCs, auf Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen hin weniger Reifungsmerkmale, wie costimulatorische Proteine, MHC-Komplexe und inflammatorische Zytokine [16, 17, 344, 345]. Deshalb sollten sie weniger potente APCs sein als DCs die bei ihrer Differenzierung nicht unter dem Einfluss von TGF β standen. Passend zu dieser Annahme konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass TGF β -DCs in MLRs eine deutlich geringere allogene T-Lymphozyten-Proliferation auslösen als DCs, die ohne den Einfluss von TGF β entstanden sind. Passend hierzu beschreiben auch Yang et al eine verminderte allo-T-Lymphozyten-Proliferation unter dem Einfluss von TGF β auf murine DCs [271]. Einerseits zeigte sich die verminderte allo-T-Lymphozyten-Expansion in der [$\text{Methyl-}^3\text{H}$]-Proliferationsmessung, die eine Momentaufnahme der Proliferation über 24 Stunden darstellt (vergleiche hierzu Abbildung 5-4 mit Abbildung 5-3), andererseits waren

unter dem Einfluss von TGF β -DCs verglichen mit DCs auch nach sieben Tagen MLR deutlich geringere absolute Anzahlen allogener T-Lymphozyten nachzuweisen (Abbildung 5-1). Hierdurch wird deutlich, dass TGF β -DCs die allogene T-Lymphozyten-Expansion nicht nur zu einem bestimmten Zeitpunkt ([Methyl- 3 H]Thymidin-Proliferationsmessung) sondern zumindest über einen gewissen Zeitraum hinweg so nachhaltig supprimieren, dass die resultierende T-Lymphozyten-vermittelte Immunantwort durch eine absolut verminderte klonale Expansion (Zellzahlbestimmung) deutlich abgeschwächt wird.

Weitere Versuche unserer Gruppe zeigten, dass TGF β -DCs in MLRs eine verminderte T H 1-Polarisation bedingen. Stattdessen bewirkten TGF β -DCs in dieser Arbeit deutlich gesteigerte allo-T $_{reg}$ Anteile (Abbildung 5-9 und Abbildung 5-10). Da TGF β nicht nur in DCs einen tolerogenen Phänotyp induzieren [16, 17, 344, 345], sondern auch direkt auf die T-Zell-Polarisation Einfluss nehmen soll [74, 75, 79, 95] und weil TGF β als eines der Effektorzytokine der T $_{reg}$ gilt [81] kann ein positiver Feedbackmechanismus vermutet werden. Ähnlich zu den Ergebnissen dieser Arbeit konnten auch van der Aar et al. feststellen, dass bei der Polarisation autologer T-Lymphozyten durch humane Langerhans-Zellen (ähnlich den TGF β -DCs) im Vergleich zu DCs höhere T $_{reg}$ Anteile entstehen [346]. Einige Bakterien und Viren sollen mittels Steigerung der TGF β -Produktion eine Vermehrung tolerogener DCs sowie FOXP3 $^+$ T $_{reg}$ bewirken und so spezifische Immunantworten supprimieren und stattdessen tolerogene Bedingungen für ihr Überleben induzieren [347, 348]. Auch Tumoren sollen durch ein TGF β -reiches Mikromilieu tumor-spezifische T $_{reg}$ induzieren und so der Abtötung durch das Immunsystem entgehen [349–352]. Die in dieser Arbeit nachgewiesene verminderte allogene T-Lymphozyten-Expansion und verstärkte Induktion regulatorischer T-Lymphozyten durch TGF β -behandelte DCs (siehe Abbildung 6-2 und Tabelle 6-2) sprechen für eine mögliche Modulation der GvHD durch TGF β -DCs, wobei in Anbetracht der Auswirkungen von TGF β auf die Tumorgenese und die Abwehr von Pathogenen die Gefahr besteht, dass unter dem Einfluss von TGF β -DCs auch der erwünschte GvL-Effekt abgeschwächt und Infektionen begünstigt werden.

Durch MDP-Zugabe konnte der immunmodulatorische Effekt des TGF β nicht weiter verstärkt werden. Die immunsuppressiven Effekte der TGF β - und MDP-NOD2-Signalwege scheinen einander daher nicht gegenseitig zu verstärken.

Zudem konnten keine Unterschiede in der CD62L-Expression auf allogenen T-Lymphozyten aus MLRs mit DCs verglichen mit denjenigen aus MLRs mit TGF β -DCs nachgewiesen werden und damit kein Anhalt für veränderte Migrationseigenschaften [1, 2, 33] unter dem Einfluss von TGF β gefunden werden.

	DC	TGF β -DC
[Methyl- 3 H]-Thymidin-Proliferationsmessung	Vergleichsgröße	↓↓
T-Lymphozyten-Zellzahl	Vergleichsgröße	↓↓
Anteil CD25 $^{+}$ FOXP3 $^{+}$ T _{reg}	Vergleichsgröße	↑↑
Anteil CD62L $^{-}$ T-Lymphozyten	Vergleichsgröße	↔

Tabelle 6-2: Zusammenfassung der Effekte von TGF β -DCs auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit beobachteten und im Text erwähnten Effekte der TGF β -DCs im Vergleich zu DCs auf die Ergebnisse der jeweiligen MLRs mit allo-T-Lymphozyten. Die linke Spalte benennt die jeweiligen Beobachtungsgrößen, die rechte Spalte gibt die Ergebnisse der MLRs mit TGF β -DCs im Vergleich zu DCs (mittlere Spalte, „Vergleichsgröße“) an. Symbole: ↓ stark vermindert, ↔ kein Effekt, ↑ starke Zunahme.

6.3. Einfluss der Vitamine D und A auf dendritische Zellen und die T-Zell-vermittelte Immunantwort

Der Abfall der 25VD-Serumspiegel beim Auftreten der GvHD [129, 304, 305] und die protektive Wirkung einer prophylaktischen UVB-Bestrahlung [305] oder Vitamin-D-Supplementierung [300] deuten an, dass Vitamin D entscheidenden Einfluss auf die GvHD nimmt (siehe auch Kapitel 1.6.5.). Ein noch genaueres Verständnis der Wirkung von Vitamin D auf Immunzellen, gerade auch im Rahmen eines Zusammenwirkens mit anderen Substanzen ist nötig um den therapeutischen Nutzen umfassend zu erklären und gegebenenfalls durch neue Kombinationspartner sogar noch zu steigern.

Vitamin A werden verschiedene, teils gegensätzliche Wirkungen auf Immunzellen zugeschrieben [163, 164, 169], was sich beispielsweise in der Beteiligung von Vitamin A an der Homöostase im Darm [164], teilweise nachgewiesener Abnahme der akuten GvHD durch RA [309] und im Gegensatz dazu verminderter intestinaler aGvHD unter Vitamin-A-armen Kost [308] oder einer stärkeren aGvHD unter dem Einfluss von Vitamin A [306, 307] zeigt. Deshalb ist es wichtig genauer zu klären wie sich dendritische Zellen im Kontakt mit allogenen T-Lymphozyten unter Vitamin-A-Einfluss verhalten. Die unterschiedlichen Vitamin A Wirkungen unter inflammatorischen und „steady-state“-Bedingungen [163] weisen auf eine Verknüpfung zwischen PRR- und Vitamin-A-Signalwegen sowie auf einen möglichen

Einfluss weiterer immunmodulatorischer Substanzen wie TGF β und Vitamin D hin, weshalb ein möglicher Einfluss des Zusammenwirkens dieser Substanzen überprüft wurde. Veränderte Effekte beim Zusammenwirken von Vitamin D und A sind zudem denkbar, da die Rezeptoren der beiden Vitamine interagieren [110, 143, 353].

Abbildung 6-3 gibt vorab eine schematische Übersicht über die in dieser Arbeit beobachteten Effekte der Vitamine D und A.

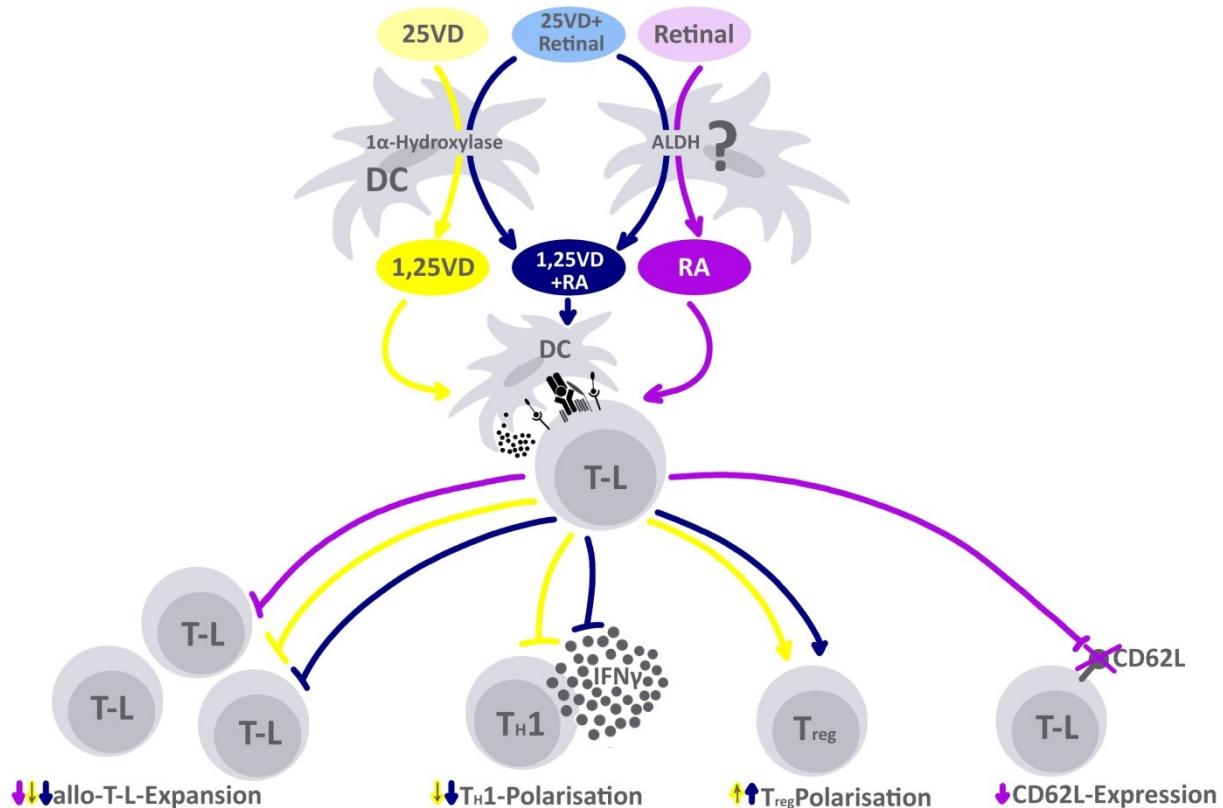


Abbildung 6-3: Einfluss der Vitamine D und A auf DCs und die T-zell-vermittelte Immunantwort

Schematische Übersicht über die in dieser Arbeit beobachteten Effekte der Vitamine D und A auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort. Dendritische Zellen setzen den inaktiven Metaboliten 25VD in das biologisch aktive 1,25VD um. Da Retinal genauso wie 25VD in deutlich höheren Konzentrationen im Serum vorhanden ist als die biologisch aktive Retinsäure kann vermutet werden, dass Vitamin A *in vivo* nur dann entscheidende Effekte auf DCs und T-Lymphozyten ausübt wenn analog zum Vitamin D Metabolismus die inaktiven Vorstufen lokal beispielsweise durch DCs aktiviert werden (mit Fragezeichen markiert). Durch Zusatz von 25VD (gelb markiert) konnten eine verminderte allo-T-Lymphozyten-Expansion, eine geringere T_H1-Polarisation und eine stärkere T_{reg}-Polarisation nachgewiesen werden. Diese Effekte waren unter Einsatz der Kombination aus 25VD und Retinal (blau markiert) noch ausgeprägter. Retinal supprimierte deutlich die Expression des Oberflächenmarkers CD62L und in geringerem Ausmaß die allo-T-Lymphozyten-Expansion (violett markiert). Eigene zusammenfassende Abbildung.

TGF β wird wie oben beschrieben ebenfalls eine wichtige immunregulatorische Rolle zugeschrieben. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen, die unter dem Einfluss von TGF β differenziert wurden (TGF β -DCs) eine geringere klonale Expansion allogener T-Lymphozyten und eine gesteigerte T_{reg}-Polarisation bewirken (siehe Kapitel 6.2., sowie Abbildung 5-1, Abbildung 5-4 und Abbildung 5-10). Es gibt zudem Hinweise darauf,

dass unter dem Einfluss von TGF β der Abbau von Retinsäure supprimiert wird, was zu einer Wirkverstärkung führen soll [164, 186]. Unter der gemeinsamen Wirkung von TGF β und Retinsäure sollen außerdem mehr regulatorische T-Zellen entstehen [186, 201, 203, 204]. Daneben gilt TGF β als eines der Effektorzytokine regulatorischer T-Zellen [1, 65], wobei T_{reg} wiederum unter dem Einfluss von Vitamin D vermehrt entstehen sollen [110, 154]. Diese Punkte legen eine Verknüpfung der Vitamin- und TGF β -Wirkungen nahe, weshalb in dieser Arbeit auch der Einfluss der Vitamine D und A auf MLRs mit TGF β -DCs untersucht wurde.

6.3.1. 25VD und Retinal hemmen die klonale Expansion der T-Lymphozyten im Rahmen allogener Immunantworten

Mehrere Autoren beschreiben eine verminderte Proliferation allogener T-Lymphozyten unter dem Einfluss von Vitamin D [154, 354–356]

In dieser Arbeit zeigte sich unter dem Einfluss von 25VD eine geringere allogene T-Zell Expansion. Hierzu wurden zwei Nachweismethoden herangezogen, die Zellzahl nach sieben Tagen MLR einerseits und die [$\text{Methyl-}^3\text{H}$]-Thymidin-Proliferationsmessung andererseits. Bei der zweiten Methode zeigte sich ein deutlicher Trend zur verminderten allo-T-Lymphozyten-Proliferation unter dem Einfluss von 25VD (siehe Abbildung 5-2 und Abbildung 9-2). Einer der Gründe dafür ist vermutlich, dass DC durch 1,25VD einen tolerogenen Phänotyp mit schwächerer APC-Funktion ausbilden [149, 152–154, 356]. Manche Autoren konnten eine deutlich stärkere Hemmung der allo-T-Lymphozyten-Proliferation unter dem Einfluss von Vitamin D nachweisen. Mögliche Ursachen hierfür sind Unterschiede in der Nachweismethode [355] oder im Zeitpunkt der Messung [154], sowie der Einsatz des aktiven 1,25VD [153, 154, 355], in zum Teil deutlich höheren (unphysiologischen) Konzentrationen [356].

Die Zählung zeigte eine signifikant niedrigere klonale Expansion der allogenen T-Lymphozyten unter dem Einsatz von 25VD verglichen mit der vitaminfreien Kontrolle (siehe Abbildung 5-1). Die Zellzahlen unter dem Einfluss von 25VD waren dabei bemerkenswerterweise ähnlich niedrig wie in MLRs mit TGF β -DCs, was vermuten lässt, dass TGF β und Vitamin D in DCs einen ähnlich stark tolerogenen Phänotyp induzieren und ein Zusammenwirken nur noch kleine oder keine weiteren Effekte mehr hat.

Obwohl 1,25VD die Expression von NOD2 erhöhen soll [151] und damit verstärkte MDP-vermittelte Effekte denkbar wären, waren unter dem Zusatz von MDP und 25VD keine eindeutigen Auswirkungen auf die [³H]-Thymidin-Proliferationsmessung oder Zellzahlen zu erkennen. Auch ohne den Einfluss von LPS zeigte sich kein eindeutiger Effekt. In Zusammenschau mit den Ergebnissen der vitaminfreien MLRs (siehe Kapitel 6.1. und Tabelle 6-1) ist davon auszugehen, dass der MDP-NOD-Signalweg keinen entscheidenden Einfluss auf die allo-T-Lymphozyten-Proliferation nimmt.

In früheren Arbeiten unserer Gruppe wurden die Vitamine in physiologischen Konzentrationen den reifen dendritischen Zellen (d.h. nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen) zugesetzt und die Auswirkung in MLRs mit allo-T-Lymphozyten untersucht. Hier erfolgte der Zusatz der Vitamine zu unreifen DC oder TGF β -DCs ebenfalls in physiologischen Konzentrationen jedoch gleichzeitig mit bakteriellen Stimuli und allo-T-Lymphozyten um modellhaft die Therapie eines frisch transplantierten allo-Stammzellempfängers mit Vitaminmetaboliten nachzuahmen. Da unreife dendritische Zellen und Effektor-T-Lymphozyten, wie in Kapitel 1.4.2. beschrieben eine starke VDR-Expression aufweisen [134] hätte dieser spätere Zusatz von 25VD die Effekte im Vergleich zu früheren Arbeiten verstärken können, jedoch zeigte sich kein merklicher Unterschied. Ein möglicher Grund dafür ist die Tatsache, dass vor allem reife dendritische Zellen Enzyme exprimieren die 25VD, den inaktiven Vitamin D Metaboliten mit der höchsten Serumkonzentration, in das biologisch aktive 1,25VD umsetzen [110, 112, 133, 135, 137]. So wird die Expression dieser Enzyme beispielweise unter dem Einfluss bakterieller Stimuli wie LPS hochreguliert [133, 134, 138]. Somit haben die hier eingesetzten iDC möglicherweise weniger vom angebotenen 25VD in das biologisch aktive 1,25VD umgesetzt, weshalb trotz der hohen VDR-Rezeptor-Expression in iDCs keine stärkeren Vitamineffekte zu verzeichnen waren (siehe Tabelle 1-2).

Analog zu Vitamin D sind im Serum die Konzentrationen inaktiver Vitamin A Metabolite deutlich höher als die der aktiven Retinsäure [173]. Deshalb scheint die Annahme sinnvoll, dass *in vivo* ein Einfluss von Vitamin A auf die Immunantwort nur dann von größerer Bedeutung ist, wenn die beteiligten oder umliegende Zellen zur Umsetzung der inaktiven Metabolite in der Lage sind und damit im Mikromilieu hinreichend hohe Konzentrationen der aktiven Retinsäure erzeugen [110, 163]. Unter dieser Annahme wurden in der vorliegenden Arbeit mögliche Auswirkungen des Retinal auf die allogene-T-Zell-Antwort in

MLRs untersucht. Wie Abbildung 5-2 zeigt konnte in der [Methyl-³H]-Proliferationsmessung analog zu früheren Arbeiten kein eindeutig hemmender Effekt des Retinals nachgewiesen werden. Unter dem gemeinsamen Einwirken von Retinal und MDP (zusammen mit LPS) lässt sich ein solcher Effekt erahnen. Da es sich bei der [Methyl-³H]-Thymidin-Proliferationsmessung um eine Momentaufnahme handelt, ist davon auszugehen, dass Retinal die allogene T-Zell-Expansion nicht während des hier gewählten Beobachtungszeitraums (Inkubationszeit mit dem radioaktiv markierten Thymidin) hemmt sondern seine Effekte zu einem anderen Zeitpunkt vermittelt. In der Zellzählung nach sieben Tagen MLR zeigten sich signifikant weniger allogene T-Lymphozyten unter dem Einfluss von Retinal (Abbildung 5-1), weshalb insgesamt von einer Hemmung der allo-T-Zell-Expansion durch Retinal auszugehen ist. In der Literatur wird einerseits angegeben, dass der Vitamin-A-Signalweg notwendig ist um adäquate T-Zell-vermittelte Immunantworten zu induzieren [169, 209], andererseits scheint Vitamin A das Ausmaß dieser der T-Lymphozyten-Expansion jedoch auch eindämmen zu können [309, 357, 358]. Im Einklang mit der vorliegenden Arbeit zeigen die Versuche von Yang et al. an Mäusen, dass Retinsäure die allo-T-Lymphozyten-Expansion hemmt [309]. Retinsäure soll die APC-Funktion von DCs hemmen und so deren allo-stimulatorische Aktivität abschwächen [16, 357]. Diese Ergebnisse widersprechen jedoch den Angaben in der Literatur nach denen Vitamin A in einer inflammatorischen Umgebung (hier: LPS, allogene Zellen) proinflammatorische Eigenschaften haben soll [163, 197]. Insgesamt bleibt anhand der widersprüchlichen Angaben festzuhalten, dass die Wirkung von Vitamin A auf die allogene T-Lymphozyten-Expansion in MLRs noch nicht umfassend geklärt ist. Diese Arbeit weist jedoch auf eine hemmende Rolle des Retinals hin. Interessanter Weise war dieser Vitamin-A-vermittelte Effekt schwächer als diejenigen von 25VD und TGFβ-DCs (siehe Abbildung 5-1). Unter Zusammenwirken von Retinal und TGFβ-DCs zeigte sich kein stärkerer Effekt als unter alleinigem Einsatz der TGFβ-DCs. Die Ursache hierfür könnte wiederum ein durch die Behandlung mit TGFβ ausgeschöpftes tolerogenes Potential sein. Ein synergistischer Effekt, der für TGFβ und Vitamin A beispielsweise bei der T_{reg}-Induktion beschrieben wurde [201–203, 359] konnte damit bezüglich der T-Lymphozyten-Expansion hier nicht gefunden werden. Da eine der Ursachen eines solchen Synergismus eine TGFβ-vermittelte Hemmung des Retinsäurekatabolismus sein soll [186, 187] könnte der Effekt hier jedoch auch deshalb nicht zu tragen kommen, weil der TGFβ-

Zusatz während der DC-Reifung und nicht während der MLR erfolgte und so nur noch indirekt über die TGF β -DCs wirkt. Weitere Versuche könnten zeigen ob ein (erneuter) TGF β -Zusatz zu Beginn der MLR die Vitamin A Wirkung verstärkt.

Die Kombination von 25VD und Retinal zeigte sowohl in den Proliferationsmessungen als auch in den Zellzahlexperimenten eine (tendenziell) noch niedrigere T-Zell-Expansion (siehe Abbildung 5-2, Abbildung 5-3 und Abbildung 5-1), was dafür spricht, dass die Vitamine synergistisch oder zumindest additiv wirken. Die von einigen Autoren vermutete gegenseitige Antagonisierung der jeweiligen Effekte aufgrund geteilter Rezeptorbestandteile [110, 143] bestätigt sich dadurch nicht. Gerade vor dem Hintergrund, dass Vitamin A eine stärkere tolerogene Wirkung im „steady state“ nachgesagt wird [163] scheint eine mögliche Wirkverstärkung des Retinals unter Einfluss des immunmodulatorischen Vitamin D plausibel.

Zudem schien die Kombination von 25VD und Retinal in MLRs mit TGF β -DCs in der [3 H]-Thymidin-Proliferationsmessung eine noch geringere allo-T-Zell-Proliferation zu bewirken als der alleinige Einfluss von TGF β -DCs (siehe Abbildung 5-4), was darauf hindeutet, dass die drei Immunmodulatoren zumindest teilweise additiv wirken und selbst in MLRs mit TGF β -DCs noch diskrete tolerogene Effekte erzielt werden können. Bei den Zellzahlexperimenten zeigte sich dieser additive Effekt jedoch nicht. Vermutlich hat der gemeinsame Einfluss der Immunmodulatoren nur für einen gewissen Zeitraum (Momentaufnahme Proliferationsmessung) eine größere tolerogene Wirkung, hemmt die T-Lymphozyten-Expansion in der MLR jedoch nicht nachhaltiger als der alleinige Einfluss von TGF β -DCs oder der alleinige Einfluss der Vitaminkombination (Endpunktmeßung Zellzahlen). Die Literatur gibt über ein Zusammenwirken der drei Immunmodulatoren oder die maximal zu erzielenden tolerogenen Effekte wenig Aufschluss, zumal traditionell die Vitamin A vermittelte Immunmodulation eher dem Darm und die Vitamin D vermittelte eher der Haut zugeordnet wird [110, 360, 361]. Da in dieser Arbeit biologisch inaktive Vitamine in ihren physiologischen Serumkonzentrationen eingesetzt wurden, die ubiquitär im Körper vorkommen [116, 173] und TGF β von vielen Zellen im Körper produziert werden kann [79, 96, 98], ist davon auszugehen, dass *in vivo* alle Immunmodulatoren aufeinander treffen und eine therapeutische Anhebung der Serumspiegel auf hochnormale Werte aufgrund der hier beobachteten verminderten allo-T-Lymphozyten-Expansion (zusammenfassend dargestellt in Tabelle 6-3) lindernden Einfluss auf die GvHD einen haben könnte.

	LPS				LPS+MDP			
	(-)	25VD	Retinal	25VD+ Retinal	(-)	25VD	Retinal	25VD+ Retinal
[Methyl- ³ H]-Thymidin-Proliferationsmessung in MLR mit DC	Vergl.	(↓)	↔	↓	↔	↔	(↓)	↓
[Methyl- ³ H]-Thymidin-Proliferationsmessung in MLR mit TGFβ-DC	↓↓	↓↓(↓)	↓↓	↓↓(↓)	↓↓	↓↓(↓)	↓↓	↓↓(↓)
T-Lymphozyten-Zellzahl nach MLR mit DC	Vergl.	↓↓	(↓)	↓↓	↔	↓↓	↓	↓↓
T-Lymphozyten-Zellzahl nach MLR mit TGFβ-DC	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓

Tabelle 6-3: 25VD, Retinal und der Einsatz von TGFβ-DCs hemmen die klonale T-Lymphozyten-Expansion in MLRs

Die Tabelle gibt schematisch die in dieser Arbeit beobachteten Einflüsse von 25VD, Retinal, deren Kombination dem Zusatz von MDP und des Einsatzes von TGFβ-DCs anstatt DCs auf die allogene-T-Lymphozyten-Expansion in LPS-stimulierten MLRs wieder. Als Beobachtungsgrößen dienten die [Methyl-³H]-Thymidin-Proliferationsmessung und die Zellzahlen nach sieben Tagen MLR. Jeweils schraffiert dargestellt sind die Ergebnisse beim Einsatz von TGFβ-DCs, die im Vergleich zu MLRs mit DCs (ohne Schraffur) eine deutlich verminderte allo-T-Lymphozyten-Expansion bewirkten. Etwas ausgeprägter schien dieser Effekt in der Proliferationsmessung unter Einfluss von 25VD oder der Vitaminkombination zu sein. Die Kombination aus 25VD und Retinal (blaue Spalten) zeigte ebenfalls bei beiden Beobachtungsgrößen einen hemmenden Einfluss auf die T-Lymphozyten-Expansion. 25VD allein (gelbe Spalten) senkte die Zellzahlen deutlich, Retinal allein (violette Spalten) etwas weniger ausgeprägt. Der Zusatz von MDP (rechte vier Spalten) hatte keine klaren Auswirkungen. Abkürzung: Vergl. Vergleichsgröße. Symbole (-) kein Vitaminzusatz, ↔ kein Effekt, (↓) fragliche Abnahme, ↓ Abnahme, ↓↓ stärkere Abnahme, ↓↓(↓) vermutlich noch stärkere Abnahme.

6.3.2. 25VD und Retinal beeinflussen die T-Lymphozyten-Polarisation im Rahmen allogener Immunantworten

IL-2 wirkt CD25-vermittelt als „T-Zell-Wachstumsfaktor“ und verstärkt so die Expansion naiver T-Lymphozyten. Dagegen können inhibitorische Signale (z.B. via PD-1) und regulatorische T-Zellpopulationen im Unterschied zu Effektor-T-Lymphozyten immunmodulatorisch wirken [1]. Daher sind mögliche Ursachen der hier beobachteten verminderten allo-T-Lymphozyten-Expansion unter dem Einfluss der Vitamine D und A eine verminderte IL-2-Produktion, CD25-Expression, oder T_H1-Polarisation sowie eine gesteigerte PD-1-Expression oder Bildung regulatorischer T-Zellpopulationen (FOXP3⁺T_{reg}, CD8αα⁺T-Lymphozyten, γδTCR⁺T-Lymphozyten) [1, 110].

Kein Einfluss der Vitamine D und A auf die IL-2-Produktion und CD25-Expression

Wie in Abbildung 5-6 und Tabelle 6-4 dargestellt zeigte sich jedoch in dieser Arbeit kein eindeutiger Einfluss der Vitamine D und A auf die IL-2-Produktion und CD25-Expression durch allo-T-Lymphozyten in LPS-stimulierten MLRs.

In Versuchen an (murinen) T-Lymphozyten konnten manche Autoren eine Suppression der IL-2-Produktion durch Vitamin D nachweisen [362–365], die sich hier nicht nachvollziehen lässt. Andere Autoren beschreiben jedoch analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit unter Vitamin D eine unveränderte IL-2-Sekretion [366]. Im Gegensatz zu Vitamin D soll Vitamin A nach Angaben in der Literatur die IL-2-Produktion durch T-Lymphozyten eher steigern [367–369], was sich in dieser Arbeit ebenfalls nicht zeigte. Effekte der Vitamine auf die IL-2-Produktion könnten jedoch analog zu denen des LPS (diskutiert in Kapitel 6.1.) möglicherweise an einem früheren Messzeitpunkt feststellbar sein. Insgesamt ist daher nicht auszuschließen, dass die verminderte T-Lymphozyten-Expansion unter Vitamin D oder A mit einer (vorübergehend) reduzierten IL-2-Sekretion zusammenhängt.

Bezüglich der CD25-Expression konnte, wie bereits in Kapitel 6.1. beschrieben eine Steigerung durch LPS nachgewiesen werden, die weder durch die Zugabe von 25VD noch durch die von Retinal eindeutig beeinflusst wurde. Ähnliche Ergebnisse sind auch der Literatur zu entnehmen [366, 370], jedoch fanden manche Autoren auch eine 1,25VD-vermittelt supprimierte [154] oder gesteigerte CD25-Expression [162]. Bemerkenswert ist, dass die geringere CD25-Expression in LPS-freien MLRs unter Einfluss von 25VD in dieser Arbeit noch niedriger wurde. Da der Effekt unter dem Einfluss von LPS verschwand, scheint 25VD nur dann die CD25-Expression zu hemmen, wenn keine inflammatorischen Umgebungsbedingungen vorliegen. Interessant ist dies vor allem vor dem Hintergrund, dass 25VD so CD25-vermittelt immunmodulatorisch wirken könnte ohne gleichzeitig die Infektanfälligkeit durch gramnegative Erreger zu erhöhen [334, 335]. Retinal schien in Zusammenwirken mit MDP in zusätzlich LPS-stimulierten MLRs eine geringfügig verminderte CD25-Expression auf allo-T-Lymphozyten zu bewirken (Abbildung 5-6), was die fraglich verminderte allo-T-L-Proliferation in gleich behandelten MLRs erklären könnte. Da es sich wenn überhaupt um einen schwachen Effekt handelt wären weitere Untersuchungen nötig um die Ergebnisse statistisch zu verifizieren.

Zusammengefasst konnten keine klaren vitaminvermittelte Effekte auf den IL-2-CD25-Signalweg festgestellt werden, die die verminderte allo-T-Lymphozyten-Expansion in gleich behandelten MLRs erklären würden (siehe Tabelle 6-4). Einschränkend ist jedoch zu bemerken, dass regulatorische T-Zellen, die die Expansion einschränken, eine starke CD25-Expression aufweisen [1]. Eine vitaminvermittelt verminderte CD25-Expression auf

konventionellen Effektor-T-Lymphozyten könnte in den Experimenten auch deshalb nicht aufgefallen sein, da möglicherweise gleichzeitig mehr CD25⁺T_{reg} entstanden sind.

Keine Induktion von CD8 $\alpha\alpha^+$ T-L, PD-1 oder Vermehrung von $\gamma\delta$ TCR $^+$ T-L durch Vitamin D, A oder den Einsatz von TGF β -DCs

CD8 $\alpha\alpha^+$ T-Lymphozyten kommen als intraepitheliale Lymphozyten (IEL) im Darm vor und werden dort für die Immunhomöostase mitverantwortlich gemacht [104, 105, 371]. Ihre Entstehung soll von TGF β abhängig sein [106, 349]. Da CD8 $\alpha\alpha^+$ T-Lymphozyten neben CD4 $^+$ FOXP3 $^+$ T_{reg} als regulatorische T-Zell-Population diskutiert werden [91, 105, 372] wäre eine Induktion von CD8 $\alpha\alpha$ durch TGF β -DCs oder die Vitamine eine weitere mögliche Erklärung für die geringere allo-T-Lymphozyten-Expansion in den MLRs mit 25VD, Retinal oder TGF β -DCs. In dieser Arbeit konnte jedoch weder in den MLRs mit DCs noch in den MLRs mit TGF β -DCs eine relevante CD8 $\alpha\alpha^+$ allo-T-Lymphozyten-Population nachgewiesen werden. Auch eine Zugabe von MDP, 25VD, Retinal oder Kombinationen der Zusätze änderten diese Ergebnisse nicht. Die von Nambu et al. beschriebene CD8 $\alpha\alpha$ Bildung in murinen T-Lymphozyten unter dem Einfluss von TGF β und Retinsäure [372] konnte demzufolge hier an humanen Zellen nicht nachvollzogen werden. Auch der von Bruce et al. beschriebene Einfluss des Vitamin-D-Signalwegs zeigte sich in dieser Arbeit nicht [107]. Unsere Ergebnisse deuten eher darauf hin, dass es in MLRs mit humanen DC und allo-T-Lymphozyten zu keiner relevanten Bildung „single-positiver“CD8 $\alpha\alpha$ T-Lymphozyten kommt. Eine transiente Hochregulation von CD8 $\alpha\alpha$ [105] ist als Mitursache der verminderten Proliferation und Zellzahlen nicht auszuschließen. Wahrscheinlich ist jedoch, dass CD8 $\alpha\alpha^+$ T-Lymphozyten, wie in der Literatur beschrieben, vor allem im Darm als IEL eine Rolle spielen [104–106, 371, 373] und die hier beobachteten Effekte nicht begründen.

Auch T-Lymphozyten die $\gamma\delta$ -T-Zellrezeptoren tragen sollen bei der Darmhomöostase eine Rolle spielen und Immunantworten gegen häufige Pathogene auslösen. Über $\gamma\delta$ TCR $^+$ T-Lymphozyten ist insgesamt weniger bekannt als über konventionelle T-Lymphozyten [1, 374], jedoch werden $\gamma\delta$ TCR $^+$ T-Lymphozyten als mögliche zellbasierte GvHD-Therapie diskutiert [375, 376] und erhöhte $\gamma\delta$ TCR $^+$ T-Lymphozyten-Zahlen mit geringeren Abstoßungsreaktionen bei Organtransplantationen wie auch geringeren aGvHD-Inzidenzen in Verbindung gebracht [377, 378]. In dieser Arbeit konnte in LPS-stimulierten MLRs mit DCs oder TGF β -DCs und allogenen T-Lymphozyten keine relevanten $\gamma\delta$ TCR $^+$ T-Lymphozyten-

Populationen nachgewiesen werden. Auch nach Zusatz von MDP, der Vitamine D, A oder beider Vitamine zeigten sich keine $\gamma\delta$ TCR⁺T-Lymphozyten. Da der Anteil $\gamma\delta$ TCR-positiver T-Lymphozyten im peripheren Blut nur bei ca. 1-10% aller T-Lymphozyten liegen soll [378–380] ist eine mögliche Erklärung, dass die verwendeten Spender-Lymphozyten keine hinreichend großen $\gamma\delta$ TCR⁺T-Lymphozyten-Anteile enthielten und somit keine messbare Expansion dieser Zellgruppe stattfand.

Neben einer antigenspezifischen Aktivierung über MHCs und den TCR (Signal 1) sind die costimulatorischen Signale (Signal 2) und Zytokine (Signal 3) der DCs nötig um naive T-Lymphozyten zu Aktivieren und zur Proliferation und Differenzierung anzuregen (siehe Abbildung 1-4) [1, 33]. Neben den costimulatorischen Signalwegen existieren jedoch auch coinhibitorische, die die T-Lymphozyten-Aktivierung hemmen. T-Lymphozyten exprimieren zu diesem Zweck u.a. den inhibitorischen Rezeptor PD-1 [1, 33, 381, 382]. Eine mögliche Erklärung der in dieser Arbeit beobachteten immunmodulatorischen Effekte von TGF β , Vitamin D oder A wäre daher eine Hochregulation von PD-1, weshalb die Expression auf T-Lymphozyten aus MLRs mit verschiedenen Zusätzen untersucht wurde. Hier konnte jedoch keine gesteigerte PD-1-Expression unter dem Einsatz von TGF β -DCs, MDP oder Vitaminen detektiert werden, sodass wahrscheinlich ist, dass die hier beobachtete verminderte T-Lymphozyten-Expansion (siehe Kapitel 6.2 und 6.3.1) nicht durch diesen coinhibitorischen Signalweg zustande kommen. Einschränkend muss jedoch bemerkt werden, dass eine möglicherweise veränderte Expression von PD-L auf DCs und TGF β -DCs Einfluss nehmen könnte [356, 361, 381, 382], weshalb weitere Versuche, die die PD-L-Ausstattung der DCs in Abhängigkeit der verschiedenen Zusätze überprüfen, sinnvoll wären.

25VD und die Kombination aus 25VD und Retinal hemmen die T_H1-Polarisation

Analog zu den Angaben in der Literatur konnte in dieser Arbeit eine verstärkte T_H1-Polarisation unter dem Einfluss von LPS nachgewiesen werden (diskutiert in Kapitel 6.1.) Wie Abbildung 5-8 und Tabelle 6-4 zeigen verminderte 25VD tendenziell diese T_H1-Polarisation. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit früheren Untersuchungen unserer Gruppe und den Feststellungen anderer Autoren, bei denen die Vitaminzugaben jedoch jeweils während der DC-Reifung und nicht wie hier zu Beginn der MLR erfolgten [154]. Weitere Autoren stellten auch in stimulierten T-Zellkulturen eine Hemmung der T_H1-Polarisation durch Vitamin D fest

[77, 148, 158, 383]. In Zusammenschau der Ergebnisse dieser Arbeit mit den Angaben der Literatur ist anzunehmen, dass Vitamin D sowohl durch eine direkte Wirkung auf T-Lymphozyten als auch DC-vermittelt die T_{H1} -Polarisation hemmt [299] und zwar sowohl im Vorfeld als auch zum Zeitpunkt der (allo-)Immunreaktion. Dass in dieser Arbeit die Effekte etwas geringer ausfielen als in der Literatur unter hohen Konzentrationen 1,25VD beschrieben [77, 158, 383] kann durch den Einsatz physiologischer Konzentrationen des biologisch inaktiven Vorläufers 25VD erklärt werden, der und dessen lokale Umsetzung zum aktiven Vitamin *in vivo* vermutlich die meisten Vitamin D Effekte bewirken [112].

Die Kombination von 25VD und Retinal schien die T_{H1} -Polarisation noch stärker zu vermindern als 25VD, wohingegen Retinal allein keinen eindeutigen Einfluss hatte. Im Gegensatz dazu gibt die Literatur teilweise Hinweise auf eine verminderte T_{H1} -Polarisation unter Retinsäure [206]. Neben dem Einsatz muriner Zellen könnte auch der des aktiven Metaboliten die Unterschiede erklären. Andere Untersuchungen ergaben, dass T_{H1} -Effektorfunktionen unter inflammatorischen Bedingungen Retinsäure-abhängig verstärkt werden [169, 199], sodass angenommen wird, dass RA nur im „steady-state“ immunmodulatorisch wirkt [163]. Unter den in dieser Arbeit in LPS-stimulierten MLRs vorliegenden inflammatorischen Bedingungen konnte zwar kein Einfluss von Retinal auf die T_{H1} -Polarisation beobachtet werden, jedoch zeigte sich unter der gemeinsamen Wirkung von 25VD und Retinal eine abgeschwächte T_{H1} -Polarisation, weshalb vermutet werden kann, dass 25VD die nötigen „steady-state“-Bedingungen schafft um Retinal eine immunmodulatorische Wirkung zu ermöglichen. Wie in Kapitel 6.3.1. diskutiert könnte so auch in der allo-T-Lymphozyten-Expansion beobachtete Effekt erklärt werden.

[TGF \$\beta\$ -DCs, 25VD und die Kombination aus 25VD und Retinal induzieren \$T_{reg}\$](#)

Statt T_{H1} entstanden unter dem Einfluss von 25VD vermehrt FOXP3 $^{+}T_{reg}$ (siehe Abbildung 5-9 und Abbildung 5-10). Eine verstärkte T_{reg} -Polarisation unter 1,25VD wurde in der Literatur bereits beschrieben [77, 81, 110, 162, 366, 384]. Passend zu diesen Ergebnissen gibt es Hinweise darauf, dass Vitamin D auch *in vivo* wichtig für die T_{reg} Induktion ist. Beispielsweise korrelieren höhere 25VD-Serumspiegel und eine UVB-Bestrahlung mit größeren T_{reg} Anteilen [162, 305, 385–387] und scheinen dadurch protektiv gegenüber der GvHD zu wirken [305].

Obwohl an mehreren Stellen für Retinsäure eine T_{reg} -induzierende Wirkung beschrieben wurde [76, 99, 201, 309] hatte in dieser Arbeit Retinal alleine analog zu den Ergebnissen der TH1-Polarisation keinen Effekt auf die T_{reg} Induktion, wohingegen die Vitaminkombination eine deutliche T_{reg} Induktion bewirkte. Dies spricht erneut für eine 25VD-vermittelt ermöglichte immunmodulatorische Retinalwirkung. Interessanterweise waren die FOXP3⁺ T_{reg} Anteile selbst unter der Vitaminkombination beachtlich geringer als diejenigen, die unter dem Einsatz von TGFβ-DCs entstanden (siehe Abbildung 5-10). Der zusätzliche Einsatz der Vitamine in MLRs mit TGFβ-DCs zeigte keine weitere Steigerung der T_{reg} Anteile sondern schien sie eher zu vermindern. Dies steht im Kontrast zu den Angaben in der Literatur nach denen die gemeinsame Wirkung von Retinsäure und TGFβ die T_{reg} Entstehung vorantreibt [76, 99, 201, 202, 388, 389]. Womöglich ist dies dadurch zu erklären dass TGFβ in dieser Arbeit nur noch indirekt wirkt, da der Zusatz bereits bei der Reifung der TGFβ-DCs erfolgte. Da auch eine direkte, DC-unabhängige Hochregulation von FOXP3 durch TGFβ beschrieben ist [75, 79] könnten weitere Experimente mit einem (erneuten) Zusatz von TGFβ zum Zeitpunkt der MLR diesbezüglich Aufschluss bringen. Möglicherweise sind jedoch die Untersuchungen mit Retinsäure, die an murinen Zellen oder in Mäusen durchgeführt wurden [76, 99, 201, 202] nicht gänzlich auf humane Zellen übertragbar beziehungsweise Experimente in antikörperaktivierten humanen T-Lymphozyten-Kulturen [388, 389] nicht vollständig auf allo-Immunreaktionen. Da auch unter gemeinsamer Wirkung von TGFβ-DCs mit 25VD keine erhöhten T_{reg} Anteile gefunden wurden bestehen zudem Unterschiede zu den Ergebnissen von Chambers et al. die unter gemeinsamen Einfluss von TGFβ und 1,25VD eine Vermehrung der T_{reg} feststellen konnten. Allerdings handelte es sich auch hier um antikörperstimulierte T-Lymphozyten-Kulturen, denen TGFβ und das aktive Vitamin direkt zugefügt wurden [366].

Da T_{reg} zellkontaktabhängig oder durch Zytokinsekretion andere Immunzellen hemmen [1, 65, 81, 83, 84], könnte die T_{reg} Induktion unter dem Einsatz von TGFβ-DCs die in dieser Arbeit beobachtete verminderte allo-T-Lymphozyten-Expansion in MLRs mit TGFβ-DCs teilweise erklären. Die ebenfalls geringere allo-T-Lymphozyten-Expansion unter dem Einfluss von 25VD und der Kombination von 25VD und Retinal lässt sich einerseits auch durch die Induktion von T_{reg} erklären, andererseits scheinen hier jedoch auch andere Mechanismen eine Rolle zu spielen, da die T_{reg} Anteile deutlich geringer waren als unter Einsatz von TGFβ-

DCs (siehe Abbildung 5-10) die allo-T-Lymphozyten-Expansion aber ähnlich stark verhindert war (siehe Abbildung 5-1). Ein Mechanismus könnte die hier beobachtete vitaminvermittelt verminderte T_{H1} -Polarisation sein. Dagegen scheinen die Induktion von CD8 $\alpha\alpha^+$ oder $\gamma\delta$ TCR $^+$ T-Lymphozyten ähnlich wie der coinhibitorische Oberflächenrezeptor PD-1 keine Rolle zu spielen. Auch unter Zugabe von MDP veränderten sich die hier beschriebenen Effekte der Vitamine und TGF β -DCs nicht. Eine Übersicht über die in diesem Kapitel diskutierten Ergebnisse gibt Tabelle 6-4.

	LPS				LPS+MDP			
	(-)	25VD	Retinal	25VD +Retinal	(-)	25VD	Retinal	25VD +Retinal
CD25-Expression nach MLR mit DC	Vergl.	↔ ¹¹	↔	n.u.	↔	↔	(↓)	n.u.
IL-2-Produktion nach MLR mit DC	Vergl.	↔	↔	↔	↔	↔	↔	↔
Anteil CD8$\alpha\alpha^+$T-Zellen, PD-1$^+$T-Zellen oder TCR$\gamma\delta^+$T-Zellen nach MLR mit DC	Vergl.	Keine Population bzw. ↔						
Anteil CD8$\alpha\alpha^+$T-Zellen, PD-1$^+$T-Zellen oder TCR$\gamma\delta^+$T-Zellen nach MLR mit TGFβ-DC	Keine Population bzw. ↔							
IFNγ-Produktion (T_{H1}) nach MLR mit DC	Vergl.	(↓)	↔	(↓↓)	↔	(↓)	↔	(↓↓)
Anteil CD25$^+$FOXP3$^+$T_{reg} nach MLR mit DC	Vergl.	(↑)	↔	↑	↔	(↑)	↔	↑
Anteil CD25$^+$FOXP3$^+$T_{reg} nach MLR mit TGFβ-DC	↑↑	↑(↑)	↑↑	↑(↑)	↑↑	↑(↑)	↑↑	↑(↑)

Tabelle 6-4: 25VD und Retinal beeinflussen die T-Lymphozyten-Polarisation

Die Tabelle gibt schematisch die in dieser Arbeit beobachteten Einflüsse von 25VD (gelbe Spalten), Retinal (violette Spalten), deren Kombination (blaue Spalten), dem Zusatz von MDP (rechte vier Spalten) und des Einsatzes von TGF β -DCs (schraffiert) anstatt DCs (ohne Schraffur) auf die verschiedenen T-Zellpopulationen in MLRs. Keiner der genannten Einflussfaktoren wirkte sich eindeutig auf die CD25-Expression, IL-2-Produktion oder auf die CD8 $\alpha\alpha^+$, PD-1 $^+$ oder TCR $\gamma\delta^+$ T-Zell-Populationen aus. 25VD und stärker noch die Kombination aus 25VD und Retinal schienen die T_{H1} -Polarisation gemessen an der IFN γ -Produktion zu hemmen, Retinal allein oder der Zusatz von MDP hatten keinen Einfluss. Der Anteil FOXP3 $^+$ T_{reg} stieg unter Zugabe von 25VD und Retinal signifikant, unter alleiniger Zugabe von 25VD nur trendmäßig an. Der Einsatz von TGF β -DCs vermehrte ebenfalls den Anteil FOXP3 $^+$ T_{reg} wobei die Vitamin- und MDP-Zugaben keine eindeutige Änderung mehr bewirkten. Abkürzung: Vergl. Vergleichsgröße. Symbole: (-) kein Vitaminzusatz, ↔ kein Effekt, (↓) tendenzielle Abnahme, (↓↓) tendenziell stärkere Abnahme, ↑ Zunahme, ↑(↑) vermutlich stärkere Zunahme, ↑↑ stärkere Zunahme.

¹¹ 25VD schien die CD25-Expression nur in Ansätzen ohne LPS zu supprimieren (siehe Abbildung 5-6)

6.3.3. Retinal vermindert die CD62L-Expression von CD4⁺ und CD8⁺T-Lymphozyten

Neben Anzahl und Effektorfunktionen der T-Lymphozyten nehmen auch deren Migrationseigenschaften bedeutenden Einfluss auf die resultierende Immunantwort. CD62L ist an der Leukodiapedese in sekundär lymphatische Gewebe beteiligt. Dort treffen T-Lymphozyten auf DCs, die Antigene präsentieren, wodurch die T-Lymphozyten aktiviert werden. Die Aktivierung bewirkt eine Herabregulation von CD62L, was die T-Lymphozyten dazu befähigt in peripherie Gewebe zu gelangen und so am Entzündungsherd ihre Effektorfunktionen auszuüben [1]. Naive T-Lymphozyten, die CD62L exprimieren, gelten als potente Auslöser der GvHD [285, 289, 323]. Wie Versuche an Mäusen zeigten scheint dagegen die Übertragung CD62L-negativer allo-T-Lymphozyten keine GvHD auszulösen [286]. Eine klinische Studie konnte eine reduzierte cGvHD durch T_N-depleteierte Transplantate nachweisen [323]. Umgekehrt scheint eine Vitamin-A-arme Ernährung in Mäusen die GvHD in einzelnen Organen zu verschlimmern [308], weshalb anzunehmen ist, dass neben einer Depletion der T_N [323] möglicherweise auch eine medikamentöse Beeinflussung der T-Zell-Migration durch Vitamin A [309] die GvHD lindert. In dieser Arbeit konnte sowohl in CD4⁺ als auch in CD8⁺T-Lymphozyten eine Steigerung des Anteils CD62L-negativer T-Lymphozyten durch Retinal nachgewiesen werden. Diese Vermehrung der CD62L⁻T-Lymphozyten zeigte sich in allen retinalhaltigen MLRs unabhängig vom Zusatz von MDP, Vitamin D oder dem Einsatz von TGFβ-DCs anstatt DCs, was vermuten lässt, dass es sich um einen sehr stabilen Effekt handelt (siehe Tabelle 6-5 sowie Abbildung 5-13, Abbildung 5-14 und Abbildung 5-15). Unter Retinsäure statt Retinal waren die CD62L⁻T-Lymphozyten zwar ebenfalls erhöht, jedoch deutlich schwächer als unter Retinal (siehe Abbildung 9-4 und Abbildung 9-5), was auf die Wichtigkeit der lokalen Umsetzung von Retinal durch DCs hindeutet. Analog zu dieser Arbeit konnten auch andere Autoren eine verminderte CD62L-Expression unter dem Einfluss von Retinsäure nachweisen [201, 390]. Da Retinal die CD62L-Expression hemmt, könnte es über eine Veränderung der Migrationseigenschaften der allo-T-Lymphozyten die GvHD lindern und so einen therapeutischen Nutzen bringen. Allerdings korreliert eine verminderte CD62L-Expression beispielsweise bei HIV-Patienten mit einer höheren Viruslast, weshalb durch die Retinal-vermittelt reduzierte CD62L-Expression auch nachteilige Effekte, wie eine erhöhte Infektanfälligkeit, entstehen könnten [391]. Zudem zeigten der Einsatz von

Retinsäure und eine Vitamin-A-arme Ernährung in Versuchen an Mäusen verschiedene Auswirkungen auf die GvHD [306–309]. Weitere Untersuchungen, insbesondere mit dem biologisch inaktiven Metaboliten Retinal *in vivo* wären nötig um die Effekte auf die T-Lymphozyten-Migration, die Auswirkungen auf die GvHD und die Sicherheit einer solchen Therapie auch im Hinblick auf Nebenwirkungen wie ein erhöhtes Infektionsrisiko zu klären.

	LPS				LPS+MDP			
	(-)	25VD	Retinal	25VD + Retinal	(-)	25VD	Retinal	25VD + Retinal
Anteil CD62LT-Lymphozyten nach MLR mit DC	Vergl.	↔	↑↑	↑↑	↔	↔	↑↑	↑↑
Anteil CD62LT-Lymphozyten nach MLR mit TGFβ-DC	↔	↔	↑↑	↑↑	↔	↔	↑↑	↑↑

Tabelle 6-5: Retinal vermehrt den Anteil CD62LT-Lymphozyten

Die Tabelle gibt schematisch die in dieser Arbeit beobachteten Effekte von Retinal (violette Spalten), 25VD (gelbe Spalten), deren Kombination (blaue Spalten), MDP (rechte vier Spalten) sowie des Einsatzes von TGFβ-DCs (schraffiert) anstatt DCs (ohne Schraffur) auf die CD62L-Expression in LPS-stimulierten MLRs wieder. Unabhängig von weiteren Zusätzen zeigte sich eine bedeutende Steigerung der CD62L-negativen T-Lymphozyten unter dem Einsatz von Retinal. Abkürzung: Vergl. Vergleichsgröße. Symbole: (-) kein Vitaminzusatz, ↔ keine Veränderung, ↑↑ deutliche Zunahme.

Einige Autoren berichten, dass nicht nur CD45RA⁺T_N, sondern auch CD45RO⁺CD62L⁺T_{CM} (zentrale Gedächtniszellen) potente GvHD-Auslöser sind [288, 289, 323]. Dagegen sollen CD45RO⁺CD62L⁻T_{EM} (Effektor-Gedächtniszellen) bei erhaltener GvL-Funktion keine GvHD auslösen [288, 289, 323]. In dieser Arbeit war unter dem Einfluss von Retinal auch die CD62L⁻CD45RO⁺T-Lymphozyten-Population (T_{EM}) größer. Hier zeigte der alleinige Einsatz von Retinal ohne zusätzliches Vitamin D eine deutlichere Steigerung als die gemeinsame Wirkung der Vitamine. Stattdessen entstanden unter gemeinsamen Einfluss von 25VD und Retinal vermehrt CD62L⁻CD45RO⁺T-Lymphozyten, was daraus resultieren könnte, dass 25VD die Aktivierung naiver T-Lymphozyten zu Effektor- und Memory-T-Lymphozyten hemmt, Retinal jedoch auch in diesen naiven CD45RO⁺T-Lymphozyten die Migrationseigenschaften verändert. Die verminderte Aktivierung naiver T-Lymphozyten durch 25VD steht im Einklang mit den übrigen Ergebnissen, die hier für 25VD festgestellt wurden: geringere T-Lymphozyten-Expansion und T_H1-Polarisation, vermehrte T_{reg}-Entstehung. Für Retinal konnten solche Effekte nur in schwächerem Ausmaß oder nur im Zusammenwirken mit 25VD beobachtet werden. Umso interessanter ist daher, dass Retinal durch erhöhte Anteile CD62-negativer T-Lymphozyten die protektiven Effekte des 25VD gegenüber der GvHD ergänzen könnte.

6.4. Dendritische Zellen setzen Retinal in Retinsäure um

Aufgrund der verminderten Zellzahlen unter dem Einsatz von Retinal sowie des stark supprimierenden Effekts des Retinals auf die CD62L-Expression der T-Lymphozyten lag die Annahme nahe, dass humane DCs Retinal in den aktiven Metaboliten Retinsäure umsetzen. Der Literatur ist zu entnehmen, dass murine DCs im Darm und vermutlich auch in der Lunge und Haut die hierfür notwendigen Enzyme exprimieren. Ob alle dendritischen Zellen die notwendigen Enzyme zur Aktivierung biologisch inaktiver Vitamin A Metabolite besitzen ist jedoch nicht genau bekannt [110, 163, 178, 180, 181, 392]

6.4.1. iDC produzieren RA, IFNy erhöht die Produktion

Umso überraschender waren die Ergebnisse der *ALDEFLUOR™ assay*-Experimente, die zeigten, dass etwa ein Viertel der aus humanen Monozyten differenzierten dendritischen Zellen in der Lage sind Retinal in Retinsäure umzusetzen (siehe Abbildung 5-16). Dies weist darauf hin, dass dendritische Zellen nicht nur durch ihren lokalen Vitamin D Metabolismus sondern auch durch Retinsäurebildung entscheidenden Einfluss auf das Mikromilieu nehmen, welches Art und Ausmaß der T-Zell-vermittelter Immunantworten mitbestimmt. Einzelne Autoren konnten in humanen Monozyten-stämmigen DCs analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit ebenfalls die Fähigkeit zur RA-Produktion nachweisen [194, 393]. Für murine DCs wurde eine ALDH-Aktivität bereits von verschiedenen Autoren beschrieben [76, 163, 178, 182, 183, 194]. Diese soll durch verschiedene Faktoren verstärkt werden. Hierzu zählen hohe lokale Konzentrationen an RA, bakteriellen Stimuli, GM-CSF und IL-4 [18, 182, 183, 194, 392], was insgesamt für eine gesteigerte RA-Bildung unter inflammatorischen Bedingungen spräche [163, 182, 183]. Die hier verwendeten DCs wurden während ihrer Reifung aus Monozyten nach einem gängigen Protokoll mit GM-CSF und IL-4 inkubiert [6], sodass es wahrscheinlich ist, dass diese beiden Zytokine die ALDH-Aktivität über die Differenzierung mitinduziert haben [183].

Die Stimulation der iDCs mit LPS und damit deren Reifung zu mDCs zeigte keinen Einfluss auf die ALDH-Aktivität. Im Gegensatz dazu wird in der Literatur von einer verstärkten ALDH-Aktivität und ALDH-mRNA-Induktion durch bakterielle Stimuli berichtet, allerdings wurden hier murine DCs und/oder andere TLR-Stimuli verwendet [18, 183, 194]. Andere Autoren

beschreiben analog zu den Ergebnissen dieser Arbeit eine Unabhängigkeit der RA-Produktion von TLR-Signalen [394].

Eine deutliche Steigerung der ALDH-Aktivität der DCs war hingegen unter Zugabe von IFN γ zu verzeichnen (siehe Abbildung 5-16 und Abbildung 5-17, sowie Tabelle 6-6). Über den Einfluss von IFN γ auf den Vitamin-A-Metabolismus dendritischer Zellen ist in der Literatur bislang wenig bekannt. Jedoch wird eine IFN γ -abhängige Induktion der Retinsäurebildung beispielsweise für Sternzellen der Leber beschrieben [395–397], die eine T_{reg} Expansion und verminderte allo-Immunreaktionen zur Folge haben soll [397–400]. IFN γ gilt als klassisches inflammatorisches Zytokin, das T_H1-Antworten vorantreibt, welche unter anderem die akute GvHD vermitteln [1], jedoch wird zunehmend auch eine wichtige Rolle des IFN γ in der Induktion immunologischer Toleranz diskutiert [396, 401–403]. Da RA mit einer vermehrten Bildung regulatorischer T-Lymphozyten und verminderten Immunreaktionen in Verbindung gebracht wird [99, 203, 309, 399] könnte der in dieser Arbeit beobachtete hemmende Einfluss des Retinols auf die allo-T-Lymphozyten-Expansion durch eine IFN γ -vermittelte Induktion der Retinsäurebildung in DCs ermöglicht worden sein. Gerade vor dem Hintergrund, dass RA im Widerspruch zu dieser Annahme unter inflammatorischen Bedingungen insbesondere proinflammatorische Wirkungen zugeschrieben werden [163, 198] wäre in weiteren Versuchen zu klären ob das Zusammenwirken von IFN γ und Vitamin A allo-Immunantworten nachhaltig eindämmen kann.

Festzuhalten bleibt, dass humane dendritische Zellen in der Lage sind Vitamin A Vorstufen in die biologisch aktive Retinsäure umzusetzen. In Zusammenschau mit den Auswirkungen des Retinols auf die Ergebnisse der MLRs scheint dieser lokale Vitamin A Metabolismus in DCs nicht nur den in der Literatur beschriebenen Effekt der Induktion von Darm-Homing-Rezeptoren auf T-Lymphozyten [1, 178, 399] zu haben, sondern scheint auch das Ausmaß von allo-T-Lymphozyten-Antworten zu beeinflussen und in T-Lymphozyten einen Verlust von CD62L zu bewirken. Auf diese Weise könnten DCs durch lokale Bildung von RA die GvHD lindern [285, 286, 289, 309, 323].

6.4.2. TGF β steigert die Fähigkeit der DCs RA zu produzieren

Neben DCs war auch ein Teil der TGF β -DCs, die während ihrer Reifung aus Monozyten unter dem Einfluss von TGF β standen, in der Lage Retinal in RA umzusetzen. Interessanterweise ergab die durchflusszytometrische Messung ähnliche prozentuale Anteile wie bei den DCs (siehe Abbildung 5-16, sowie Tabelle 6-6). Da Retinal in MLRs mit TGF β -DCs keine weitere Minderung der allo-T-Lymphozyten-Zahlen bewirkte (siehe Tabelle 6-3) und die ALDH-Aktivität der TGF β -DCs nicht größer war als die der DCs scheint die lokale RA-Bildung keine wesentliche Rolle in der allo-T-Lymphozyten-Expansion zu spielen. Dagegen spricht die unter Retinal deutlich verminderten CD62L-Expression (siehe Tabelle 6-5) zusammengenommen mit dem Vorhandensein der ALDH-Aktivität in TGF β -DCs dafür, dass der lokale Vitamin-A-Metabolismus sowohl in DCs als auch in TGF β -DCs insbesondere auf die Migrationseigenschaften der T-Lymphozyten entscheidende Auswirkungen haben könnte. Da gerade die CD62L $^+$ T-Lymphozyten als potente Auslöser der GvHD gelten [285, 286, 289, 309, 323] und die CD62L-Expression hier retinalabhängig supprimiert war könnte eine Stärkung der ALDH-Aktivität in DCs und TGF β -DCs möglicherweise eine neue therapeutische Optionen für die GvHD darstellen.

Im Gegensatz zu DCs war in TGF β -DCs keine Steigerung der ALDH-Aktivität unter dem Einfluss von IFN γ nachzuweisen. Vor dem Hintergrund, dass IFN γ tolerogene Eigenschaften vor allem gegenüber aktivierte Zellen zugeschrieben werden [401–403] könnte vermutet werden, dass IFN γ auf TGF β -DCs aufgrund ihrer tolerogenen Eigenschaften keinen Einfluss nimmt.

Dagegen ergab sich eine Steigerung der ALDH-Aktivität sowohl in DCs als auch in TGF β -DCs durch den (erneuten) Zusatz von TGF β (siehe Abbildung 5-16, sowie Tabelle 6-6). Die größte Aktivität war jeweils drei Tage nach der TGF β -Zugabe zu verzeichnen (siehe Abbildung 5-17). In Anbetracht dieser Ergebnisse wäre es interessant in weiteren Untersuchungen die Frage zu klären ob eine Zugabe von TGF β direkt zu den MLRs mit DCs, allo-T-Lymphozyten und den Vitaminen A und D, modellhaft für die Therapie eines frisch transplantierten allo-Stammzellempfängers mit einer Kombination aus Vitaminen und TGF β , die in dieser Arbeit beobachteten Vitamineffekte verstärkt. Zu vermuten wären eine weitere Einschränkung der allo-T-Lymphozyten-Expansion, eine verstärkte T_{reg} Polarisation gegenüber der T_H1 -Polarisation und insbesondere auch ein Einfluss auf die Migrationseigenschaften der T-

Lymphozyten durch kurzzeitigen TGF β -Zusatz. Für einen solchen Effekt sprechen die deutliche Steigerung der ALDH-Aktivität durch kurzzeitige Inkubation mit TGF β (siehe Tabelle 6-6) und Angaben in der Literatur nach denen der Vitamin A Katabolismus durch TGF β reduziert werden [186, 187] und ein Zusammenwirken von TGF β und RA die T_{reg} Bildung verstärken soll [76, 99, 201, 203, 388, 389].

Wie in Kapitel 6.2. diskutiert sind passend zu diesen Annahmen für TGF β auch *in vivo* lindernde Effekte auf die GvHD beschrieben [268, 270–272], jedoch bestehen beim therapeutischen Einsatz von TGF β Einschränkungen durch eine vermutlich erhöhte Infektfälligkeit [268], möglicherweise verminderte GvL-Effekte [404], sowie höheren Inzidenzen der cGvHD [268, 272, 276].

Sato et al. beobachteten in ihren Versuchen eine verstärkte Retinsäureproduktion unter dem Einfluss von 1,25VD in Darm-DCs [360] und Quinn et al. konnten in Makrophagen eine gesteigerte Ausstattung mit Vitamin-D-metabolisierenden Enzymen durch RA nachweisen [405], weshalb es interessant wäre in zukünftigen Experimenten zu klären ob die ALDH-Aktivität in DCs nicht nur durch TGF β und IFN γ , sondern auch durch Vitamin D gesteigert werden kann und ob RA die für die 1,25VD-Bildung nötige 1 α -Hydroxylase (und 25-Hydroxylase) induziert. Eine wechselseitige Erhöhung der Synthese der beiden aktiven Vitaminmetabolite 1,25VD und RA in DCs könnte die hier tendenziell beobachteten kooperativen Effekte (verminderte T-Lymphozyten-Expansion, verminderte T_H1- und gesteigerte T_{reg} Polarisation) erklären.

ALDH-Aktivität in	(-)	LPS	IFN γ	TGF β
DCs	+	+	++	++
TGF β -DCs	+	+	+	++

Tabelle 6-6: DCs und TGF β -DCs setzen Retinal in RA um, IFN γ und TGF β steigern die ALDH-Aktivität

Die Tabelle gibt schematisch die in dieser Arbeit mittels ALDEFLUOR-Assay® nachgewiesene ALDH-Aktivität in DCs (ohne Schraffur) und TGF β -DCs (schraffiert) wider. Dabei zeigten die nicht stimulierten (grau markierte Spalte) DCs und TGF β -DCs dieselbe ALDH-Aktivität wie die mit LPS-stimulierten korrespondierenden Ansätze (weiße Spalte). Eine Stimulation mit IFN γ (rot markierte Spalte) bewirkte in DCs eine deutliche Zunahme der ALDH-Aktivität und der Zusatz von TGF β (blau markierte Spalte) steigerte die Aktivität in DCs wie auch TGF β -DCs. Symbole: (-) kein Stimulus, + Aktivität in einigen Zellen nachgewiesen, ++ Aktivität in deutlich mehr Zellen nachgewiesen.

7. Zusammenfassung

T-Zell-vermittelte Immunantworten schützen den Menschen einerseits vor Infektionen und Malignomen, andererseits können sie auch an der Entstehung von Erkrankungen beteiligt sein. So vermitteln T-Lymphozyten im Rahmen hämatopoetischer Stammzelltransplantationen den erwünschten Graft-versus-Leukämie-Effekt lösen jedoch auch die Therapie-limitierende GvHD aus.

T-Lymphozyten werden durch DCs aktiviert, wobei die lokalen Umgebungsbedingungen entscheidenden Einfluss auf die resultierende Immunantwort nehmen. Einer verstärkten Aktivierung der DCs und in der Folge der T-Lymphozyten durch bakterielle Stimuli wie LPS stehen hier immunregulatorische Effekte von Vitamin D oder TGF β gegenüber, die in DCs einen tolerogenen Phänotyp induzieren und folglich die T-Zell-vermittelte Immunantwort abschwächen. Der Einfluss anderer Immunmodulatoren wie Vitamin A und MDP ist noch nicht vollständig geklärt.

Gerade vor dem Hintergrund, dass eine angepasste Modulation der T-Zell-vermittelten Immunantwort in der Therapie der GvHD klinisch relevant ist, war es Ziel dieser Arbeit den Einfluss der genannten Substanzen auf allogene Immunantworten genauer zu untersuchen und zwar anhand von MLRs mit DCs und allo-T-Lymphozyten. Dabei wurde insbesondere auf mögliche Effekte eines Zusammenwirkens mehrerer Substanzen sowie den Einsatz physiologischer Konzentrationen der Vitamine und deren lokale Aktivierung geachtet (zusammenfassend dargestellt in Abbildung 7-1 und Tabelle 7-1).

LPS bewirkte eine gesteigerte allo-T-Lymphozyten-Expansion sowie eine verstärkte CD25-Expression und T_H1-Polarisation bei gleichzeitig verminderter T_{reg} Polarisation. Dies steht im Einklang mit dem Pathogenesemodell der GvHD bei dem der Translokation bakterieller Bestandteile wie LPS über geschädigte epitheliale Barrieren eine entscheidende Bedeutung in der Induktion der Erkrankung zugeschrieben werden. Obwohl für den MDP-NOD2-Signalweg ein lindernder Einfluss auf die GvHD beschrieben ist konnte der Zusatz von MDP die LPS-vermittelten Effekte nicht abschwächen.

Im Gegensatz zu LPS bewirkt TGF β in DCs die Entstehung eines unreiferen, tolerogenen Phänotyps. Passend hierzu konnten in dieser Arbeit eine deutlich verminderte allo-T-Lymphozyten-Expansion und eine verstärkte T_{reg} Polarisation beim Einsatz von TGF β -DCs

nachgewiesen werden. Diese Daten weisen auf einen lindernden Effekt der TGF β -DCs auf die GvHD hin. Da TGF β jedoch auch mit einer verstärkten cGvHD und günstigen Bedingungen für die Tumorgenese und das Überleben von Krankheitserregern in Verbindung gebracht wird bleibt noch zu klären ob sich *in vivo* ein positiver Effekt der TGF β -DCs auf die GvHD ohne gleichzeitig erhöhtes Infektionsrisiko und verminderter GvL-Effekt ergibt.

	DC				TGF β -DC			
	(-)	25VD	Retinal	25VD + Retinal	(-)	25VD	Retinal	25VD + Retinal
[Methyl- 3 H]-Thymidin-Proliferationsmessung	Vergl.	(↓)	↔	↓	↓↓	↓↓(↓)	↓↓	↓↓(↓)
T-Lymphozyten-Zellzahl	Vergl.	↓↓	(↓)	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓	↓↓
Anteil CD25 $^{+}$ FOXP3 $^{+}$ T _{reg}	Vergl.	(↑)	↔	↑	↑↑	↑↑(↑)	↑↑	↑↑(↑)
Anteil CD62LT-L	Vergl.	↔	↑↑	↑↑	↔	↔	↑↑	↑↑

Tabelle 7-1: Einfluss von 25VD und Retinal auf die allo-T-Lymphozyten Antwort in MLRs mit DCs und TGF β -DCs

Die Tabelle zeigt eine Übersicht über die in dieser Arbeit beobachteten und im Text erwähnten Effekte der biologisch inaktiven Vitaminvorstufen 25VD und Retinal sowie deren Kombination auf die allo-T-Lymphozyten-Antwort in MLRs mit DCs und TGF β -DCs. Als bakterieller Stimulus wurde LPS hinzugegeben. Die sonst gleichen MLRs mit LPS und MDP lieferten nahezu gleiche Ergebnisse und sind hier nicht angetragen. In der linken Spalte sind die Beobachtungsgrößen benannt. In der zweiten Spalte ist die jeweilige Vergleichsgröße (DCs, allo-T-Lymphozyten, LPS, kein Vitamin) angegeben. Die im Vergleich dazu beobachteten Effekte unter verschiedenen Vitaminzusätzen (farbig markiert) sowie unter dem Einsatz von TGF β -DCs (schraffiert) sind in den einzelnen Zellen schematisch mit Pfeilsymbolen angetragen. Abkürzung: Vergl. Vergleichsgröße. Symbole: (-) kein Vitaminzusatz, ↔ kein Effekt, (↑) trendmäßige Zunahme, ↑ Zunahme, ↑(↑) etwas stärkere Zunahme, ↑↑ starke Zunahme, (↓) trendmäßige Abnahme, ↓ Abnahme, ↓↓ stärkere Abnahme, ↓↓(↓) stärkere bis noch stärkere Abnahme.

25VD bewirkte in den MLRs eine verminderte allo-T-Lymphozyten-Expansion, T_H1-Polarisation sowie eine verstärkte T_{reg} Polarisation. Die Ergebnisse dieser Arbeit stehen damit im Einklang mit der Annahme, dass eine Anhebung der 25VD-Serumspiegel die GvHD lindern könnte. Retinal schränkte die allo-T-Lymphozyten-Expansion ebenfalls, jedoch in geringerem Ausmaß, ein. Die Kombination von Retinal und 25VD bewirkte dagegen eine geringere allo-T-Lymphozyten-Expansion und T_H1-Polarisation sowie stärkere T_{reg} Polarisation als 25VD allein. Da Vitamin A unter verschiedenen Umgebungsbedingungen verschiedene Immunfunktionen zugeschrieben werden, kann vermutet werden, dass Vitamin D die nötigen Umgebungsbedingungen schafft um eine tolerogene Wirkung des Vitamin A zu ermöglichen. Eine kombinierte Vitamingabe könnte sich nach diesen Überlegungen günstig im Rahmen der GvHD auswirken.

Die Kombination der Vitamine mit TGF β -DCs zeigte keine zusätzlichen Effekte. Es kann vermutet werden, dass TGF β in DCs den stärkst möglichen tolerogenen Phänotyp induziert und die Vitamine daher keinen Einfluss mehr nehmen.

Zusammenfassung

Da CD62L-positive T-Lymphozyten als potente Auslöser der GvHD gelten ist besonders interessant, dass Retinal eine herausragende Reduktion der CD62L-Expression bewirkte. So könnte sich über eine Veränderung der Migrationseigenschaften der T-Lymphozyten möglicherweise eine Abschwächung der GvHD ergeben.

Aufgrund der Effekte des biologisch inaktiven Retinals wurde die Fähigkeit der DCs getestet Retinal in die aktive Retinsäure umzusetzen. In der Literatur wird die nötige ALDH-Aktivität nur für wenige (murine) DCs beschrieben. Hier konnte eine ALDH-Aktivität in etwa einem Viertel der eingesetzten humanen DCs nachgewiesen werden, die sich durch kurzzeitige Inkubation mit IFNy und stärker noch mit TGF β steigern ließ. Der Einfluss von TGF β während der DC-Reifung hatte keinen eindeutigen Einfluss auf deren ALDH-Aktivität. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass neben dem lokalen Vitamin D Metabolismus auch der lokale Vitamin A Metabolismus entscheidenden Einfluss auf T-Zell-vermittelte Immunantwort nimmt.

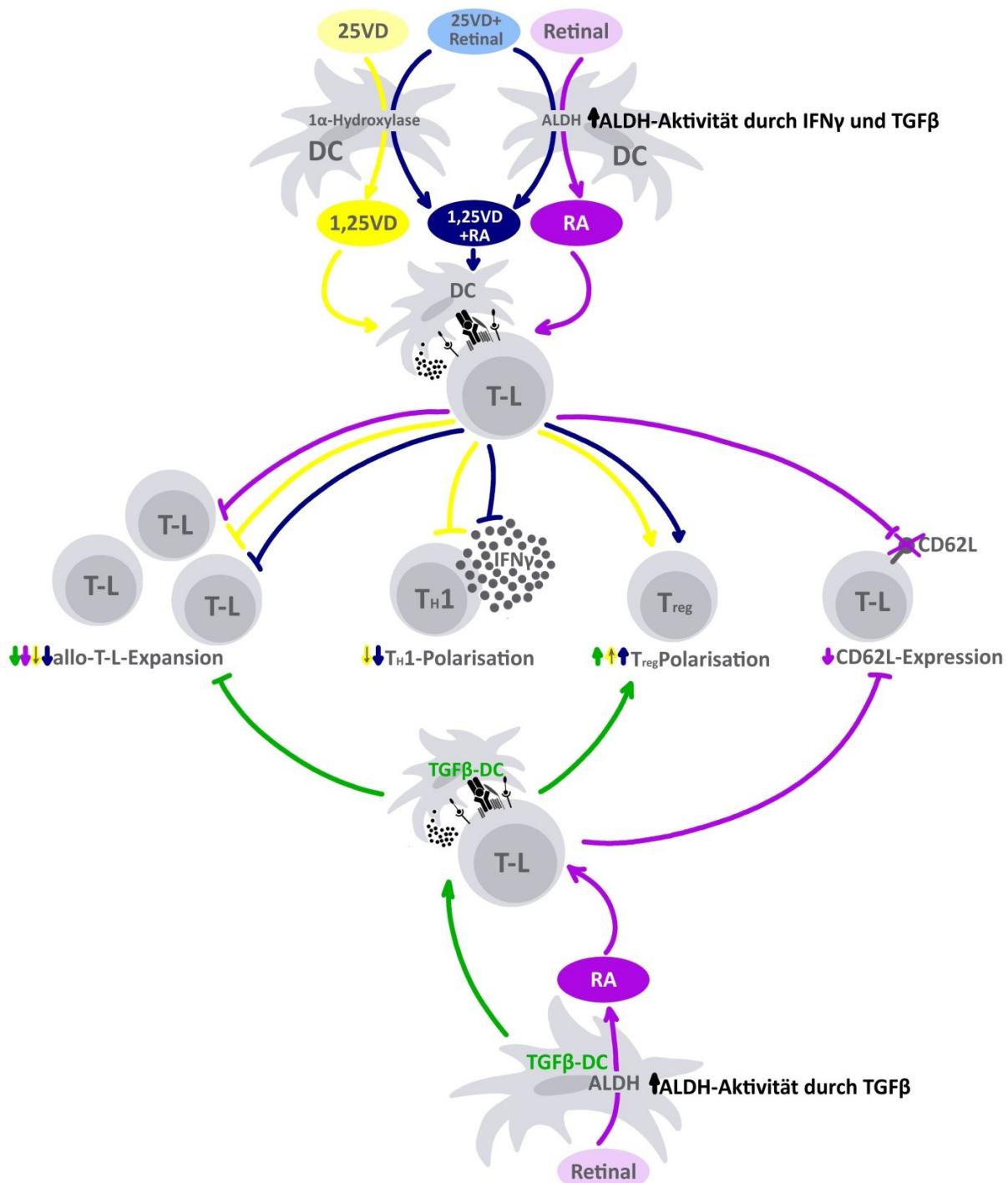


Abbildung 7-1: Einfluss von TGF β -DCs sowie der Vitamine D und A auf die T-Zell-vermittelte Immunantwort

Die Abbildung gibt schematisch die in dieser Arbeit beobachteten und im Text erwähnten Effekte wieder. Die inaktive Vorstufen der Vitamine D und A werden durch DCs in die biologisch aktiven Metaboliten 1,25VD und Retinsäure umgesetzt. Die ALDH-Aktivität (schwarz markiert) steigt in DCs unter dem Einfluss von IFN γ und TGF β in TGF β -DCs lediglich durch nochmalige Stimulation mit TGF β . Die Zugabe von 25VD zu MLRs bewirkte eine verminderte allo-T-Lymphozyten-Expansion, geringere T_{H1} -Polarisation und verstärkte T_{reg} -Polarisation (gelb markiert). Teilweise noch stärkere Effekte bewirkte die Vitaminkombination (25VD und Retinal, blau markiert). Retinal supprimierte deutlich die CD62L-Expression und etwas schwächer auch die allo-T-Lymphozyten-Expansion. Unter dem Einsatz von TGF β -DCs (grün markiert) wurden eine deutlich geringere allo-T-Lymphozyten-Expansion sowie stärkere T_{reg} -Polarisation nachgewiesen als unter dem Einsatz konventioneller DCs. Eigene zusammenfassende Abbildung.

8. Literaturverzeichnis

- 1 **Abul K. Abbas A** "Cellular and Molecular Immunology, 7th Edition" 7. Aufl., Philadelphia: Elsevier/Saunders (2012)
- 2 **Janeway C, Murphy K** "Janeway Immunologie" 7. Aufl., Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (2009)
- 3 **Schmidt R, Lang F, Heckmann M** "Physiologie des Menschen: Mit Pathophysiologie" Springer-Lehrbuch 31. Aufl., Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag (2011)
- 4 **O'Hara A, Shanahan F** "The gut flora as a forgotten organ" EMBO Rep. (2006); 7(7): S.688–693
- 5 **Salzman N** "Microbiota-immune system interaction: an uneasy alliance" Current Opinion in Microbiology (2011); 14(1): S.99–105
- 6 **Bender A, Sapp M, Schuler G et al.** "Improved methods for the generation of dendritic cells from nonproliferating progenitors in human blood" J. Immunol. Methods (1996); 196(2): S.121–135
- 7 **Schütt C, Bröker B** "Grundwissen Immunologie" 3. Aufl., Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (2011)
- 8 **Banchereau J, Steinman R** "Dendritic cells and the control of immunity" Nature (1998); 392(6673): S.245–252
- 9 **Tan J, O'Neill H** "Maturation requirements for dendritic cells in T cell stimulation leading to tolerance versus immunity" J. Leukoc. Biol. (2005); 78(2): S.319–324
- 10 **Lutz M, Schuler G** "Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?" Trends Immunol. (2002); 23(9): S.445–449
- 11 **Randolph G, Angeli V, Swartz M** "Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels" Nat. Rev. Immunol. (2005); 5(8): S.617–628
- 12 **Stenger E, Turnquist H, Mapara M et al.** "Dendritic cells and regulation of graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia activity" Blood (2012); 119(22): S.5088–5103
- 13 **Maldonado R, von Andrian, Ulrich H** "How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells" Adv. Immunol. (2010); 108: S.111–165
- 14 **Rutella S, Danese S, Leone G** "Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age" Blood (2006); 108(5): S.1435–1440
- 15 **Steinman R, Hawiger D, Nussenzweig M** "Tolerogenic dendritic cells" Annu. Rev. Immunol. (2003); 21: S.685–711
- 16 **den Hartog G, van Altena C, Savelkoul, Huub F J et al.** "The Mucosal Factors Retinoic Acid and TGF- β 1 Induce Phenotypically and Functionally Distinct Dendritic Cell Types" Int. Arch. Allergy Immunol. (2013); 162(3): S.225–236

- 17 **Ohtani T, Mizuashi M, Nakagawa S et al.** "TGF-beta1 dampens the susceptibility of dendritic cells to environmental stimulation, leading to the requirement for danger signals for activation" *Immunology* (2009); 126(4): S.485–499
- 18 **Manicassamy S, Pulendran B** "Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors" *Semin. Immunol.* (2009); 21(4): S.185–193
- 19 **Kumar H, Kawai T, Akira S** "Toll-like receptors and innate immunity" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2009); 388(4): S.621–625
- 20 **Kumar H, Kawai T, Akira S** "Pathogen recognition by the innate immune system" *Int. Rev. Immunol.* (2011); 30(1): S.16–34
- 21 **Akira S, Takeda K, Kaisho T** "Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity" *Nat. Immunol.* (2001); 2(8): S.675–680
- 22 **Qian C, Cao X** "Regulation of Toll-like receptor signaling pathways in innate immune responses" *Ann. N. Y. Acad. Sci.* (2013); 1283: S.67–74
- 23 **Kawai T, Akira S** "The roles of TLRs, RLRs and NLRs in pathogen recognition" *Int. Immunol.* (2009); 21(4): S.317–337
- 24 **Schumann R** "Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for LPS/LBP complexes: a short review" *Res. Immunol.* (1992); 143(1): S.11–15
- 25 **Schumann R** "Old and new findings on lipopolysaccharide-binding protein: a soluble pattern-recognition molecule" *Biochem. Soc. Trans.* (2011); 39(4): S.989–993
- 26 **Peri F, Piazza M, Calabrese V et al.** "Exploring the LPS/TLR4 signal pathway with small molecules" *Biochem. Soc. Trans.* (2010); 38(5): S.1390–1395
- 27 **Beutler B, Rietschel E** "Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin" *Nat. Rev. Immunol.* (2003); 3(2): S.169–176
- 28 **Brosbøl-Ravnborg A, Bundgaard B, Höllsberg P** "Synergy between Vitamin D3 and Toll-Like Receptor Agonists Regulates Human Dendritic Cell Response during Maturation" *Clinical and Developmental Immunology* (2013); 2013(10): S.1–8
- 29 **Gambhir V, Kim J, Siddiqui S et al.** "Influence of 1,25-dihydroxy vitamin D3 on TLR4-induced activation of antigen presenting cells is dependent on the order of receptor engagement" *Immunobiology* (2011); 216(9): S.988–996
- 30 **Shin O, Harris J** "Innate immunity and transplantation tolerance: the potential role of TLRs/NLRs in GVHD" *Korean J Hematol* (2011); 46(2): S.69–79
- 31 **Chen G, Shaw M, Kim Y et al.** "NOD-like receptors: role in innate immunity and inflammatory disease" *Annu Rev Pathol* (2009); 4: S.365–398
- 32 **Inohara N, Nuñez G** "NODs: intracellular proteins involved in inflammation and apoptosis" *Nat. Rev. Immunol.* (2003); 3(5): S.371–382
- 33 **Bakdash G, Sittig S, van Dijk T et al.** "The nature of activatory and tolerogenic dendritic cell-derived signal II" *Front Immunol* (2013); 4: S.53

- 34 **Lafferty K, Woolnough J** "The origin and mechanism of the allograft reaction" Immunol. Rev. (1977); 35: S.231–262
- 35 **Jenkins M, Schwartz R** "Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo" J. Exp. Med. (1987); 165(2): S.302–319
- 36 **Weiss A, Wiskocil R, Stobo J** "The role of T3 surface molecules in the activation of human T cells: a two-stimulus requirement for IL 2 production reflects events occurring at a pre-translational level" J. Immunol. (1984); 133(1): S.123–128
- 37 **Kaliński P, Hilkens C, Wierenga E et al.** "T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal" Immunol. Today (1999); 20(12): S.561–567
- 38 **Zinkernagel R, Doherty P** "The discovery of MHC restriction" Immunol. Today (1997); 18(1): S.14–17
- 39 **Doherty P, Zinkernagel R** "A biological role for the major histocompatibility antigens" Lancet (1975); 1(7922): S.1406–1409
- 40 **Aruffo A, Seed B** "Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1987); 84(23): S.8573–8577
- 41 **Azuma M, Ito D, Yagita H et al.** "B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28" Nature (1993); 366(6450): S.76–79
- 42 **Linsley P, Brady W, Grosmaire L et al.** "Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation" J. Exp. Med. (1991); 173(3): S.721–730
- 43 **Steinman R, Nussenzweig M** "Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (2002); 99(1): S.351–358
- 44 **Schulz O, Edwards A, Schito M et al.** "CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal" Immunity (2000); 13(4): S.453–462
- 45 **Quezada S, Jarvinen L, Lind E et al.** "CD40/CD154 interactions at the interface of tolerance and immunity" Annu. Rev. Immunol. (2004); 22: S.307–328
- 46 **Greaves P, Gribben J** "The role of B7 family molecules in hematologic malignancy" Blood (2013); 121(5): S.734–744
- 47 **Mosmann T, Cherwinski H, Bond M et al.** "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins" J. Immunol. (1986); 136(7): S.2348–2357
- 48 **Aggarwal S, Ghilardi N, Xie M et al.** "Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17" J. Biol. Chem. (2003); 278(3): S.1910–1914
- 49 **Walsh K, Mills, Kingston H G** "Dendritic cells and other innate determinants of T helper cell polarisation" Trends Immunol. (2013)

- 50 **Amsen D, Spilianakis C, Flavell R** "How are T(H)1 and T(H)2 effector cells made?" *Curr. Opin. Immunol.* (2009); 21(2): S.153–160
- 51 **Wan Y, Flavell R** "How diverse--CD4 effector T cells and their functions" *J Mol Cell Biol* (2009); 1(1): S.20–36
- 52 **Zhu J, Yamane H, Paul W** "Differentiation of effector CD4 T cell populations (*)" *Annu. Rev. Immunol.* (2010); 28: S.445–489
- 53 **Shtrichman R, Samuel C** "The role of gamma interferon in antimicrobial immunity" *Curr. Opin. Microbiol.* (2001); 4(3): S.251–259
- 54 **Lu Y, Waller E** "Dichotomous role of interferon-gamma in allogeneic bone marrow transplant" *Biol. Blood Marrow Transplant.* (2009); 15(11): S.1347–1353
- 55 **Blazar B, Murphy W, Abedi M** "Advances in graft-versus-host disease biology and therapy" *Nat. Rev. Immunol.* (2012); 12(6): S.443–458
- 56 **Zhu J, Paul W** "Heterogeneity and plasticity of T helper cells" *Cell Res.* (2010); 20(1): S.4–12
- 57 **Lee Y, Mukasa R, Hatton R et al.** "Developmental plasticity of Th17 and Treg cells" *Curr. Opin. Immunol.* (2009); 21(3): S.274–280
- 58 **Oldenhove G, Bouladoux N, Wohlfert E et al.** "Decrease of Foxp3+ Treg cell number and acquisition of effector cell phenotype during lethal infection" *Immunity* (2009); 31(5): S.772–786
- 59 **Murphy E, Shibuya K, Hosken N et al.** "Reversibility of T helper 1 and 2 populations is lost after long-term stimulation" *J. Exp. Med.* (1996); 183(3): S.901–913
- 60 **Veldhoen M, Hocking R, Atkins C et al.** "TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells" *Immunity* (2006); 24(2): S.179–189
- 61 **Moretta L, Moretta A** "Killer immunoglobulin-like receptors" *Curr. Opin. Immunol.* (2004); 16(5): S.626–633
- 62 **Nishikawa H, Sakaguchi S** "Regulatory T cells in tumor immunity" *Int. J. Cancer* (2010); 127(4): S.759–767
- 63 **Oleinika K, Nibbs R, Graham G et al.** "Suppression, subversion and escape: the role of regulatory T cells in cancer progression" *Clin. Exp. Immunol.* (2013); 171(1): S.36–45
- 64 **da Silva Martins, Maria, Piccirillo C** "Functional stability of Foxp3+ regulatory T cells" *Trends Mol Med* (2012); 18(8): S.454–462
- 65 **Sakaguchi S, Miyara M, Costantino C et al.** "FOXP3+ regulatory T cells in the human immune system" *Nat. Rev. Immunol.* (2010); 10(7): S.490–500
- 66 **Fontenot J, Gavin M, Rudensky A** "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells" *Nat. Immunol.* (2003); 4(4): S.330–336
- 67 **Hori S, Nomura T, Sakaguchi S** "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3" *Science* (2003); 299(5609): S.1057–1061

- 68 **Wan Y, Flavell R** "Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated *Foxp3* expression" *Nature* (2007); 445(7129): S.766–770
- 69 **Williams L, Rudensky A** "Maintenance of the *Foxp3*-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of *Foxp3*" *Nat. Immunol.* (2007); 8(3): S.277–284
- 70 **Powell B, Buist N, Stenzel P** "An X-linked syndrome of diarrhea, polyendocrinopathy, and fatal infection in infancy" *J. Pediatr.* (1982); 100(5): S.731–737
- 71 **Bennett C, Christie J, Ramsdell F et al.** "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of *FOXP3*" *Nat. Genet.* (2001); 27(1): S.20–21
- 72 **d'Hennezel E, Bin Dhuban K, Torgerson T et al.** "The immunogenetics of immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome" *J. Med. Genet.* (2012); 49(5): S.291–302
- 73 **Zheng S, Wang J, Gray J et al.** "Natural and induced CD4+CD25+ cells educate CD4+CD25- cells to develop suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10" *J. Immunol.* (2004); 172(9): S.5213–5221
- 74 **Fantini M, Becker C, Monteleone G et al.** "Cutting edge: TGF-beta induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through *Foxp3* induction and down-regulation of *Smad7*" *J. Immunol.* (2004); 172(9): S.5149–5153
- 75 **Chen W, Jin W, Hardegen N et al.** "Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor *Foxp3*" *J. Exp. Med.* (2003); 198(12): S.1875–1886
- 76 **Coombes J, Siddiqui, Karima R R, Arancibia-Cárcamo C et al.** "A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces *Foxp3*+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism" *J. Exp. Med.* (2007); 204(8): S.1757–1764
- 77 **Jeffery L, Burke F, Mura M et al.** "1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3" *J. Immunol.* (2009); 183(9): S.5458–5467
- 78 **Yamazaki S, Steinman R** "Dendritic cells as controllers of antigen-specific *Foxp3*+ regulatory T cells" *J. Dermatol. Sci.* (2009); 54(2): S.69–75
- 79 **Curotto de Lafaille, Maria A, Lafaille J** "Natural and adaptive *foxp3*+ regulatory T cells: more of the same or a division of labor?" *Immunity* (2009); 30(5): S.626–635
- 80 **Josefowicz S, Rudensky A** "Control of regulatory T cell lineage commitment and maintenance" *Immunity* (2009); 30(5): S.616–625
- 81 **Campbell D, Koch M** "Phenotypical and functional specialization of FOXP3+ regulatory T cells" *Nat. Rev. Immunol.* (2011); 11(2): S.119–130

- 82 **Duarte J, Zelenay S, Bergman M et al.** "Natural Treg cells spontaneously differentiate into pathogenic helper cells in lymphopenic conditions" *Eur. J. Immunol.* (2009); 39(4): S.948–955
- 83 **Shevach E** "Mechanisms of foxp3+ T regulatory cell-mediated suppression" *Immunity* (2009); 30(5): S.636–645
- 84 **Wood K, Luo S, Akl A** "Regulatory T cells: potential in organ transplantation.1" *Transplantation* (2004); 77(Supplement): S.S6
- 85 **Asseman C, Mauze S, Leach M 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): S.995–1004
- 86 **Schmitt E, Williams C** "Generation and function of induced regulatory T cells" *Front Immunol* (2013); 4: S.152
- 87 **Taylor A, Verhagen J, Blaser K et al.** "Mechanisms of immune suppression by interleukin-10 and transforming growth factor-beta: the role of T regulatory cells" *Immunology* (2006); 117(4): S.433–442
- 88 **Akdis C, Blaser K** "Mechanisms of interleukin-10-mediated immune suppression" *Immunology* (2001); 103(2): S.131–136
- 89 **Sansom D, Walker, Lucy S K** "The role of CD28 and cytotoxic T-lymphocyte antigen-4 (CTLA-4) in regulatory T-cell biology" *Immunol. Rev.* (2006); 212: S.131–148
- 90 **Peterson R** "Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression" *Toxicol Pathol* (2012); 40(2): S.186–204
- 91 **Smith T, Kumar V** "Revival of CD8+ Treg-mediated suppression" *Trends in Immunology* (2008); 29(7): S.337–342
- 92 **Govinden R, Bhoola K** "Genealogy, expression, and cellular function of transforming growth factor-beta" *Pharmacol. Ther.* (2003); 98(2): S.257–265
- 93 **Li M, Wan Y, Sanjabi S et al.** "Transforming growth factor-beta regulation of immune responses" *Annu. Rev. Immunol.* (2006); 24: S.99–146
- 94 **Rubtsov Y, Rudensky A** "TGFbeta signalling in control of T-cell-mediated self-reactivity" *Nat. Rev. Immunol.* (2007); 7(6): S.443–453
- 95 **Li M, Flavell R** "TGF-beta: a master of all T cell trades" *Cell* (2008); 134(3): S.392–404
- 96 **Yoshimura A, Wakabayashi Y, Mori T** "Cellular and molecular basis for the regulation of inflammation by TGF-beta" *J. Biochem.* (2010); 147(6): S.781–792
- 97 **Werner F, Jain M, Feinberg M et al.** "Transforming growth factor-beta 1 inhibition of macrophage activation is mediated via Smad3" *J. Biol. Chem.* (2000); 275(47): S.36653–36658
- 98 **Strobl H, Knapp W** "TGF-beta1 regulation of dendritic cells" *Microbes Infect.* (1999); 1(15): S.1283–1290

- 99 **Sun C, Hall J, Blank R et al.** "Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T reg cells via retinoic acid" *J. Exp. Med.* (2007); 204(8): S.1775–1785
- 100 **Tran D** "TGF- β : the sword, the wand, and the shield of FOXP3(+) regulatory T cells" *J Mol Cell Biol* (2012); 4(1): S.29–37
- 101 **Gorelik L, Flavell R** "Abrogation of TGFbeta signaling in T cells leads to spontaneous T cell differentiation and autoimmune disease" *Immunity* (2000); 12(2): S.171–181
- 102 **Lucas P, Kim S, Melby S et al.** "Disruption of T cell homeostasis in mice expressing a T cell-specific dominant negative transforming growth factor beta II receptor" *J. Exp. Med.* (2000); 191(7): S.1187–1196
- 103 **Kulkarni A, Huh C, Becker D et al.** "Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1993); 90(2): S.770–774
- 104 **Gangadharan D, Cheroutre H** "The CD8 isoform CD8alphaalpha is not a functional homologue of the TCR co-receptor CD8alphabeta" *Curr. Opin. Immunol.* (2004); 16(3): S.264–270
- 105 **Cheroutre H, Lambolez F** "Doubting the TCR coreceptor function of CD8alphaalpha" *Immunity* (2008); 28(2): S.149–159
- 106 **Konkel J, Maruyama T, Carpenter A et al.** "Control of the development of CD8 $\alpha\alpha+$ intestinal intraepithelial lymphocytes by TGF- β " *Nat. Immunol.* (2011); 12(4): S.312–319
- 107 **Bruce D, Cantorna M** "Intrinsic requirement for the vitamin D receptor in the development of CD8 $\alpha\alpha$ -expressing T cells" *J. Immunol.* (2011); 186(5): S.2819–2825
- 108 **Ojdana D, Safiejko K, Lipska A et al.** "Effector and memory CD4+ and CD8+ T cells in the chronic infection process" *Folia Histochem. Cytobiol.* (2008); 46(4): S.413–417
- 109 **Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A** "Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance" *Annu. Rev. Immunol.* (2004); 22: S.745–763
- 110 **Mora J, Iwata M, von Andrian, Ulrich H** "Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage" *Nat. Rev. Immunol.* (2008); 8(9): S.685–698
- 111 **DeLuca H** "Overview of general physiologic features and functions of vitamin D" *Am. J. Clin. Nutr.* (2004); 80(6 Suppl): S.1689S–96S
- 112 **Holick M** "Sunlight and vitamin D for bone health and prevention of autoimmune diseases, cancers, and cardiovascular disease" *Am. J. Clin. Nutr.* (2004); 80(6 Suppl): S.1678S–88S
- 113 **Araugo O, Flowers F, Brown K** "Vitamin D therapy in psoriasis" *DICP* (1991); 25(7-8): S.835–839
- 114 **Hlavaty T, Krajcovicova A, Payer J** "Vitamin D therapy in inflammatory bowel diseases: who, in what form, and how much?" *J Crohns Colitis* (2015); 9(2): S.198–209

- 115 **Benrashid M, Moyers K, Mohty M et al.** "Vitamin D deficiency, autoimmunity, and graft-versus-host-disease risk: Implication for preventive therapy" *Exp. Hematol.* (2012); 40(4): S.263–267
- 116 **Holick M** "Vitamin D deficiency" *N. Engl. J. Med.* (2007); 357(3): S.266–281
- 117 **Ooi J, Chen J, Cantorna M** "Vitamin D regulation of immune function in the gut: why do T cells have vitamin D receptors?" *Mol. Aspects Med.* (2012); 33(1): S.77–82
- 118 **Ponchon G, DeLuca H** "The role of the liver in the metabolism of vitamin D" *J. Clin. Invest.* (1969); 48(7): S.1273–1279
- 119 **Lawson D, Fraser D, Kodicek E et al.** "Identification of 1,25-dihydroxycholecalciferol, a new kidney hormone controlling calcium metabolism" *Nature* (1971); 230(5291): S.228–230
- 120 **Jones G, Strugnell S, DeLuca H** "Current understanding of the molecular actions of vitamin D" *Physiol. Rev.* (1998); 78(4): S.1193–1231
- 121 **Kao K, Abidi N, Ranasinha S et al.** "Low vitamin D is associated with hypertension in paediatric obesity" *J Paediatr Child Health* (2015)
- 122 **Littorin B, Blom P, Schölin A et al.** "Lower levels of plasma 25-hydroxyvitamin D among young adults at diagnosis of autoimmune type 1 diabetes compared with control subjects: results from the nationwide Diabetes Incidence Study in Sweden (DISS)" *Diabetologia* (2006); 49(12): S.2847–2852
- 123 **Poel Y, Hummel P, Lips P et al.** "Vitamin D and gestational diabetes: a systematic review and meta-analysis" *Eur. J. Intern. Med.* (2012); 23(5): S.465–469
- 124 **Li Y, Zhou L** "Vitamin D Deficiency, Obesity and Diabetes" *Cell. Mol. Biol. (Noisy-le-grand)* (2015); 61(3): S.35–38
- 125 **Facchini L, Venturini E, Galli L et al.** "Vitamin D and tuberculosis: a review on a hot topic" *J Chemother* (2015); 27(3): S.128–138
- 126 **Cannell J, Vieth R, Umhau J et al.** "Epidemic influenza and vitamin D" *Epidemiol. Infect.* (2006); 134(6): S.1129–1140
- 127 **Lee J, Dadhania D, August P et al.** "Circulating levels of 25-hydroxyvitamin D and acute cellular rejection in kidney allograft recipients" *Transplantation* (2014); 98(3): S.292–299
- 128 **Lowery E, Bemiss B, Cascino T et al.** "Low vitamin D levels are associated with increased rejection and infections after lung transplantation" *J. Heart Lung Transplant.* (2012); 31(7): S.700–707
- 129 **Kreutz M, Eissner G, Hahn J et al.** "Variations in 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and 25-hydroxyvitamin D3 serum levels during allogeneic bone marrow transplantation" *Bone Marrow Transplant.* (2004); 33(8): S.871–873
- 130 **Bahr L von, Blennow O, Alm J et al.** "Increased incidence of chronic GvHD and CMV disease in patients with vitamin D deficiency before allogeneic stem cell transplantation" *Bone Marrow Transplant.* (2015)

- 131 **Zehnder D, Bland R, Williams M et al.** "Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d(3)-1 alpha-hydroxylase" *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (2001); 86(2): S.888–894
- 132 **Kreutz M, Andreesen R, Krause S et al.** "1,25-dihydroxyvitamin D3 production and vitamin D3 receptor expression are developmentally regulated during differentiation of human monocytes into macrophages" *Blood* (1993); 82(4): S.1300–1307
- 133 **Fritsche J, Mondal K, Ehrnsperger A et al.** "Regulation of 25-hydroxyvitamin D3-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 by human dendritic cells" *Blood* (2003); 102(9): S.3314–3316
- 134 **Hewison M, Freeman L, Hughes S et al.** "Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells" *J. Immunol.* (2003); 170(11): S.5382–5390
- 135 **Gottfried E, Rehli M, Hahn J et al.** "Monocyte-derived cells express CYP27A1 and convert vitamin D3 into its active metabolite" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2006); 349(1): S.209–213
- 136 **Hewison M** "Vitamin D and the intracrinology of innate immunity" *Mol. Cell. Endocrinol.* (2010); 321(2): S.103–111
- 137 **Sigmundsdottir H, Pan J, Debes G et al.** "DCs metabolize sunlight-induced vitamin D3 to 'program' T cell attraction to the epidermal chemokine CCL27" *Nat. Immunol.* (2007); 8(3): S.285–293
- 138 **Jeffery L, Wood A, Qureshi O et al.** "Availability of 25-hydroxyvitamin D(3) to APCs controls the balance between regulatory and inflammatory T cell responses" *J. Immunol.* (2012); 189(11): S.5155–5164
- 139 **Kundu R, Chain B, Coussens A et al.** "Regulation of CYP27B1 and CYP24A1 hydroxylases limits cell-autonomous activation of vitamin D in dendritic cells" *Eur. J. Immunol.* (2014); 44(6): S.1781–1790
- 140 **Haussler M, Whitfield G, Haussler C et al.** "The nuclear vitamin D receptor: biological and molecular regulatory properties revealed" *J. Bone Miner. Res.* (1998); 13(3): S.325–349
- 141 **Nagy L, Szanto A, Szatmari I et al.** "Nuclear hormone receptors enable macrophages and dendritic cells to sense their lipid environment and shape their immune response" *Physiol. Rev.* (2012); 92(2): S.739–789
- 142 **Chun R, Liu P, Modlin R et al.** "Impact of vitamin D on immune function: lessons learned from genome-wide analysis" *Front Physiol* (2014); 5: S.151
- 143 **Bastie J, Balitrand N, Guidez F et al.** "1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3 transrepresses retinoic acid transcriptional activity via vitamin D receptor in myeloid cells" *Mol. Endocrinol.* (2004); 18(11): S.2685–2699
- 144 **Bhalla A, Amento E, Clemens T et al.** "Specific high-affinity receptors for 1,25-dihydroxyvitamin D3 in human peripheral blood mononuclear cells: presence in monocytes and induction in T lymphocytes following activation" *J. Clin. Endocrinol. Metab.* (1983); 57(6): S.1308–1310

- 145 **Provvedini D, Tsoukas C, Deftos L et al.** "1,25-dihydroxyvitamin D3 receptors in human leukocytes" *Science* (1983); 221(4616): S.1181–1183
- 146 **Brennan A, Katz D, Nunn J et al.** "Dendritic cells from human tissues express receptors for the immunoregulatory vitamin D3 metabolite, dihydroxycholecalciferol" *Immunology* (1987); 61(4): S.457–461
- 147 **Veldman C, Cantorna M, DeLuca H** "Expression of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) receptor in the immune system" *Arch. Biochem. Biophys.* (2000); 374(2): S.334–338
- 148 **Cantorna M, Snyder L, Lin Y et al.** "Vitamin D and 1,25(OH)2D regulation of T cells" *Nutrients* (2015); 7(4): S.3011–3021
- 149 **Berer A, Stöckl J, Majdic O et al.** "1,25-Dihydroxyvitamin D(3) inhibits dendritic cell differentiation and maturation in vitro" *Exp. Hematol.* (2000); 28(5): S.575–583
- 150 **Dionne S, Calderon M, White J et al.** "Differential effect of vitamin D on NOD2- and TLR-induced cytokines in Crohn's disease" *Mucosal Immunol* (2014); 7(6): S.1405–1415
- 151 **Wang T, Dabbas B, Laperriere D et al.** "Direct and indirect induction by 1,25-dihydroxyvitamin D3 of the NOD2/CARD15-defensin beta2 innate immune pathway defective in Crohn disease" *J. Biol. Chem.* (2010); 285(4): S.2227–2231
- 152 **Nikolic T, Roep B** "Regulatory Multitasking of Tolerogenic Dendritic Cells – Lessons Taken from Vitamin D3-Treated Tolerogenic Dendritic Cells" *Front. Immunol.* (2013); 4
- 153 **Piemonti L, Monti P, Sironi M et al.** "Vitamin D3 affects differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells" *J. Immunol.* (2000); 164(9): S.4443–4451
- 154 **Penna G, Adorini L** "1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation" *J. Immunol.* (2000); 164(5): S.2405–2411
- 155 **Griffin M, Lutz W, Phan V et al.** "Dendritic cell modulation by 1alpha,25-dihydroxyvitamin D3 and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (2001); 98(12): S.6800–6805
- 156 **Rigby W, Yirinec B, Oldershaw R et al.** "Comparison of the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D3 on T lymphocyte subpopulations" *Eur. J. Immunol.* (1987); 17(4): S.563–566
- 157 **Chen J, Bruce D, Cantorna M** "Vitamin D receptor expression controls proliferation of naïve CD8+ T cells and development of CD8 mediated gastrointestinal inflammation" *BMC Immunol.* (2014); 15: S.6
- 158 **Reichel H, Koeffler H, Tobler A et al.** "1 alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits gamma-interferon synthesis by normal human peripheral blood lymphocytes" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1987); 84(10): S.3385–3389

- 159 **Lemire J, Adams J, Kermani-Arab V et al.** "1,25-Dihydroxyvitamin D₃ suppresses human T helper/inducer lymphocyte activity *in vitro*" *J. Immunol.* (1985); 134(5): S.3032–3035
- 160 **Palmer M, Lee Y, Maynard C et al.** "Lineage-specific effects of 1,25-dihydroxyvitamin D(3) on the development of effector CD4 T cells" *J. Biol. Chem.* (2011); 286(2): S.997–1004
- 161 **Ikeda U, Wakita D, Ohkuri T et al.** "1 α ,25-Dihydroxyvitamin D₃ and all-trans retinoic acid synergistically inhibit the differentiation and expansion of Th17 cells" *Immunol. Lett.* (2010); 134(1): S.7–16
- 162 **Urry Z, Chambers E, Xystrakis E et al.** "The role of 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ and cytokines in the promotion of distinct Foxp3+ and IL-10+ CD4+ T cells" *Eur. J. Immunol.* (2012); 42(10): S.2697–2708
- 163 **Raverdeau M, Mills, Kingston H G** "Modulation of T cell and innate immune responses by retinoic Acid" *J. Immunol.* (2014); 192(7): S.2953–2958
- 164 **Cassani B, Villablanca E, Calisto J de et al.** "Vitamin A and immune regulation: Role of retinoic acid in gut-associated dendritic cell education, immune protection and tolerance" *Molecular Aspects of Medicine* (2012); 33(1): S.63–76
- 165 **Dowling J, Wald G** "Vitamin A Deficiency And Night Blindness" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* (1958); 44(7): S.648–661
- 166 **Bollag W** "Vitamin A and retinoids: from nutrition to pharmacotherapy in dermatology and oncology" *Lancet* (1983); 1(8329): S.860–863
- 167 **Clagett-Dame M, Knutson D** "Vitamin A in reproduction and development" *Nutrients* (2011); 3(4): S.385–428
- 168 **McCullough F, Northrop-Clewes C, Thurnham D** "The effect of vitamin A on epithelial integrity" *Proc Nutr Soc* (1999); 58(2): S.289–293
- 169 **Hall J, Cannons J, Grainger J et al.** "Essential role for retinoic acid in the promotion of CD4(+) T cell effector responses via retinoic acid receptor alpha" *Immunity* (2011); 34(3): S.435–447
- 170 **Sommer A, Tarwotjo I, Hussaini G et al.** "Increased mortality in children with mild vitamin A deficiency" *Lancet* (1983); 2(8350): S.585–588
- 171 **Green H, Mellanby E** "Vitamin A as an Anti-Infective Agent" *Br Med J* (1928); 2(3537): S.691–696
- 172 **Sommer A** "Vitamin a deficiency and clinical disease: an historical overview" *J. Nutr.* (2008); 138(10): S.1835–1839
- 173 **Blomhoff R, Blomhoff H** "Overview of retinoid metabolism and function" *J. Neurobiol.* (2006); 66(7): S.606–630
- 174 **Harrison E** "Mechanisms involved in the intestinal absorption of dietary vitamin A and provitamin A carotenoids" *Biochim. Biophys. Acta* (2012); 1821(1): S.70–77

- 175 **Dowling J, Wald G** "The Biological Functions of Vitamin A Acid" Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. (1960); 46(5): S.587–608
- 176 **Kanai M, Raz A, Goodman D** "Retinol-binding protein: the transport protein for vitamin A in human plasma" J. Clin. Invest. (1968); 47(9): S.2025–2044
- 177 **Duester G, Mic F, Molotkov A** "Cytosolic retinoid dehydrogenases govern ubiquitous metabolism of retinol to retinaldehyde followed by tissue-specific metabolism to retinoic acid" Chem. Biol. Interact. (2003); 143-144: S.201–210
- 178 **Iwata M, Hirakiyama A, Eshima Y et al.** "Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells" Immunity (2004); 21(4): S.527–538
- 179 **Lampen A, Meyer S, Arnhold T et al.** "Metabolism of vitamin A and its active metabolite all-trans-retinoic acid in small intestinal enterocytes" J. Pharmacol. Exp. Ther. (2000); 295(3): S.979–985
- 180 **Guilliams M, Crozat K, Henri S et al.** "Skin-draining lymph nodes contain dermis-derived CD103(-) dendritic cells that constitutively produce retinoic acid and induce Foxp3(+) regulatory T cells" Blood (2010); 115(10): S.1958–1968
- 181 **Ruane D, Brane L, Reis B et al.** "Lung dendritic cells induce migration of protective T cells to the gastrointestinal tract" J. Exp. Med. (2013); 210(9): S.1871–1888
- 182 **Zhu B, Buttrick T, Bassil R et al.** "IL-4 and retinoic acid synergistically induce regulatory dendritic cells expressing Aldh1a2" J. Immunol. (2013); 191(6): S.3139–3151
- 183 **Yokota A, Takeuchi H, Maeda N et al.** "GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity" Int. Immunopharmacol. (2009); 21(4): S.361–377
- 184 **Stock A, Booth S, Cerundolo V** "Prostaglandin E2 suppresses the differentiation of retinoic acid-producing dendritic cells in mice and humans" J. Exp. Med. (2011); 208(4): S.761–773
- 185 **Hurst R, Else K** "The retinoic acid-producing capacity of gut dendritic cells and macrophages is reduced during persistent *T. muris* infection" Parasite Immunol. (2013); 35(7-8): S.229–233
- 186 **Ross A** "Vitamin A and retinoic acid in T cell-related immunity" Am. J. Clin. Nutr. (2012); 96(5): S.1166S-72S
- 187 **Takeuchi H, Yokota A, Ohoka Y et al.** "Cyp26b1 regulates retinoic acid-dependent signals in T cells and its expression is inhibited by transforming growth factor- β " PLoS ONE (2011); 6(1): S.e16089
- 188 **Giguere V, Ong E, Segui P et al.** "Identification of a receptor for the morphogen retinoic acid" Nature (1987); 330(6149): S.624–629
- 189 **Brand N, Petkovich M, Krust A et al.** "Identification of a second human retinoic acid receptor" Nature (1988); 332(6167): S.850–853
- 190 **Levin A, Sturzenbecker L, Kazmer S et al.** "9-cis retinoic acid stereoisomer binds and activates the nuclear receptor RXR alpha" Nature (1992); 355(6358): S.359–361

- 191 **Schug T, Berry D, Shaw N et al.** "Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors" *Cell* (2007); 129(4): S.723–733
- 192 **Kiss M, Czimmeier Z, Nagy L** "The role of lipid-activated nuclear receptors in shaping macrophage and dendritic cell function: From physiology to pathology" *J. Allergy Clin. Immunol.* (2013); 132(2): S.264–286
- 193 **Fritzsche J, Stonehouse T, Katz D et al.** "Expression of retinoid receptors during human monocyte differentiation in vitro" *Biochem. Biophys. Res. Commun.* (2000); 270(1): S.17–22
- 194 **Villalblanca E, Wang S, Calisto J de et al.** "MyD88 and retinoic acid signaling pathways interact to modulate gastrointestinal activities of dendritic cells" *Gastroenterology* (2011); 141(1): S.176–185
- 195 **Duriancik D, Lackey D, Hoag K** "Vitamin A as a regulator of antigen presenting cells" *J. Nutr.* (2010); 140(8): S.1395–1399
- 196 **Darmanin S, Chen J, Zhao S et al.** "All-trans retinoic acid enhances murine dendritic cell migration to draining lymph nodes via the balance of matrix metalloproteinases and their inhibitors" *J. Immunol.* (2007); 179(7): S.4616–4625
- 197 **Geissmann F, Revy P, Brousse N et al.** "Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells" *J. Exp. Med.* (2003); 198(4): S.623–634
- 198 **Zhan X, Liu Y, Yang J et al.** "All-trans-retinoic acid ameliorates experimental allergic encephalomyelitis by affecting dendritic cell and monocyte development" *Immunology* (2013); 138(4): S.333–345
- 199 **DePaolo R, Abadie V, Tang F et al.** "Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens" *Nature* (2011); 471(7337): S.220–224
- 200 **Maynard C, Weaver C** "Immunology: Context is key in the gut" *Nature* (2011); 471(7337): S.169–170
- 201 **Benson M, Pino-Lagos K, Rosemblatt M et al.** "All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation" *J. Exp. Med.* (2007); 204(8): S.1765–1774
- 202 **Mucida D, Park Y, Kim G et al.** "Reciprocal TH17 and regulatory T cell differentiation mediated by retinoic acid" *Science* (2007); 317(5835): S.256–260
- 203 **Mucida D, Pino-Lagos K, Kim G et al.** "Retinoic acid can directly promote TGF-beta-mediated Foxp3(+) Treg cell conversion of naive T cells" *Immunity* (2009); 30(4): S.471–2; author reply 472–3
- 204 **Chen Z, Laurence A, O'Shea J** "Signal transduction pathways and transcriptional regulation in the control of Th17 differentiation" *Semin. Immunol.* (2007); 19(6): S.400–408

- 205 **Lovett-Racke A, Racke M** "Retinoic acid promotes the development of Th2-like human myelin basic protein-reactive T cells" *Cell. Immunol.* (2002); 215(1): S.54–60
- 206 **Iwata M, Eshima Y, Kagechika H** "Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors" *Int. Immunol.* (2003); 15(8): S.1017–1025
- 207 **Nikawa T, Odahara K, Koizumi H et al.** "Vitamin A prevents the decline in immunoglobulin A and Th2 cytokine levels in small intestinal mucosa of protein-malnourished mice" *J. Nutr.* (1999); 129(5): S.934–941
- 208 **Schuster G, Kenyon N, Stephensen C** "Vitamin A deficiency decreases and high dietary vitamin A increases disease severity in the mouse model of asthma" *J. Immunol.* (2008); 180(3): S.1834–1842
- 209 **Pino-Lagos K, Guo Y, Brown C et al.** "A retinoic acid-dependent checkpoint in the development of CD4+ T cell-mediated immunity" *Journal of Experimental Medicine* (2011); 208(9): S.1767–1775
- 210 **Dennert G, Lotan R** "Effects of retinoic acid on the immune system: stimulation of T killer cell induction" *Eur. J. Immunol.* (1978); 8(1): S.23–29
- 211 **Allie S, Zhang W, Tsai C et al.** "Critical role for all-trans retinoic acid for optimal effector and effector memory CD8 T cell differentiation" *J. Immunol.* (2013); 190(5): S.2178–2187
- 212 **Eksteen B, Mora J, Haughton E et al.** "Gut homing receptors on CD8 T cells are retinoic acid dependent and not maintained by liver dendritic or stellate cells" *Gastroenterology* (2009); 137(1): S.320–329
- 213 **Gahr M, Speer C** "Pädiatrie: Mit 366 Tabellen" 4. Aufl., Berlin [u.a.]: Springer-Verlag (2013)
- 214 **Piper W** "Innere Medizin: Mit 117 Tabellen" Springer-Lehrbuch 2. Aufl., Berlin, Heidelberg: SpringerMedizin (2013)
- 215 **Hilgendorf I, Greinix H, Halter J et al.** "Long-term follow-up after allogeneic stem cell transplantation" *Dtsch Arztebl Int* (2015); 112(4): S.51–58
- 216 **Thomas E, Storb R, Clift R et al.** "Bone-marrow transplantation (first of two parts)" *N. Engl. J. Med.* (1975); 292(16): S.832–843
- 217 **Jagasia M, Arora M, Flowers, Mary E D et al.** "Risk factors for acute GVHD and survival after hematopoietic cell transplantation" *Blood* (2012); 119(1): S.296–307
- 218 **Pasquini M, Wang Z, Horowitz M et al.** "2010 report from the Center for International Blood and Marrow Transplant Research (CIBMTR): current uses and outcomes of hematopoietic cell transplants for blood and bone marrow disorders" *Clin Transpl* (2010): S.87–105
- 219 **Ferrara J, Levine J, Reddy P et al.** "Graft-versus-host disease" *Lancet* (2009); 373(9674): S.1550–1561

- 220 **Korngold R, Sprent J** "Lethal graft-versus-host disease after bone marrow transplantation across minor histocompatibility barriers in mice. Prevention by removing mature T cells from marrow" *J. Exp. Med.* (1978); 148(6): S.1687–1698
- 221 **Billingham R** "The biology of graft-versus-host reactions" *Harvey Lect* (1966); 62: S.21–78
- 222 **Glucksberg H, Storb R, Fefer A et al.** "Clinical manifestations of graft-versus-host disease in human recipients of marrow from HL-A-matched sibling donors" *Transplantation* (1974); 18(4): S.295–304
- 223 **Vogelsang G, Lee L, Bensen-Kennedy D** "Pathogenesis and treatment of graft-versus-host disease after bone marrow transplant" *Annu Rev Med* (2003); 54: S.29–52
- 224 **Kreisel W, Dahlberg M, Bertz H et al.** "Endoscopic diagnosis of acute intestinal GVHD following allogeneic hematopoietic SCT: a retrospective analysis in 175 patients" *Bone Marrow Transplant.* (2012); 47(3): S.430–438
- 225 **Lorenz F, Marklund S, Werner M et al.** "Fecal calprotectin as a biomarker of intestinal graft versus host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation" *Sci. Rep.* (2015); 5: S.7920
- 226 **Sung A, Chao N** "Concise review: acute graft-versus-host disease: immunobiology, prevention, and treatment" *Stem Cells Transl Med* (2013); 2(1): S.25–32
- 227 **Snover D, Weisdorf S, Ramsay N et al.** "Hepatic graft versus host disease: a study of the predictive value of liver biopsy in diagnosis" *Hepatology* (1984); 4(1): S.123–130
- 228 **Lee S, Vogelsang G, Flowers, Mary E D** "Chronic graft-versus-host disease" *Biol. Blood Marrow Transplant.* (2003); 9(4): S.215–233
- 229 **Goker H, Haznedaroglu I, Chao N** "Acute graft-vs-host disease: pathobiology and management" *Exp. Hematol.* (2001); 29(3): S.259–277
- 230 **Ferrara J** "Pathogenesis of acute graft-versus-host disease: cytokines and cellular effectors" *J Hematother Stem Cell Res* (2000); 9(3): S.299–306
- 231 **Shlomchik W, Couzens M, Tang C et al.** "Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells" *Science* (1999); 285(5426): S.412–415
- 232 **Chakraverty R, Sykes M** "The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia" *Blood* (2007); 110(1): S.9–17
- 233 **Duffner U, Maeda Y, Cooke K et al.** "Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease" *J. Immunol.* (2004); 172(12): S.7393–7398
- 234 **van Bekkum, D W, Roodenburg J, Heidt P et al.** "Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora" *J Natl Cancer Inst* (1974); 52(2): S.401–404
- 235 **van Bekkum D, Knaan S** "Role of bacterial microflora in development of intestinal lesions from graft-versus-host reaction" *J Natl Cancer Inst* (1977); 58(3): S.787–790

- 236 **Lampert I, Moore R, Huby R et al.** "Observations on the role of endotoxin in graft-versus-host disease" Prog Clin Biol Res (1988); 272: S.351–359
- 237 **Penack O, Holler E, van den Brink, Marcel R M** "Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors" Blood (2010); 115(10): S.1865–1872
- 238 **Heidegger S, van den Brink, Marcel R M, Haas T et al.** "The role of pattern-recognition receptors in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after allogeneic stem cell transplantation" Front Immunol (2014); 5: S.337
- 239 **Vossen J, Guiot, Harry F L, Lankester A et al.** "Complete suppression of the gut microbiome prevents acute graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation" PLoS ONE (2014); 9(9): S.e105706
- 240 **Krüger W, Bohlius J, Cornely O et al.** "Antimicrobial prophylaxis in allogeneic bone marrow transplantation. Guidelines of the infectious diseases working party (AGIHO) of the german society of haematology and oncology" Ann Oncol (2005); 16(8): S.1381–1390
- 241 **Cooke K, Gerbitz A, Crawford J et al.** "LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation" J. Clin. Invest. (2001); 107(12): S.1581–1589
- 242 **Holler E, Landfried K, Meier J et al.** "The role of bacteria and pattern recognition receptors in GVHD" Int J Inflam (2010); 2010: S.814326
- 243 **Klingemann H, Barnett M, Reece D et al.** "Use of an immunoglobulin preparation enriched for IgM (Pentaglobin) for the treatment of acute graft-versus-host disease" Bone Marrow Transplant. (1990); 6(3): S.199–202
- 244 **Calcaterra C, Sfondrini L, Rossini A et al.** "Critical role of TLR9 in acute graft-versus-host disease" J. Immunol. (2008); 181(9): S.6132–6139
- 245 **Nestel F, Price K, Seemayer T et al.** "Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease" J. Exp. Med. (1992); 175(2): S.405–413
- 246 **Cooke K, Hill G, Crawford J et al.** "Tumor necrosis factor- alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease" J. Clin. Invest. (1998); 102(10): S.1882–1891
- 247 **Gerbitz A, Schultz M, Wilke A et al.** "Probiotic effects on experimental graft-versus-host disease: let them eat yogurt" Blood (2004); 103(11): S.4365–4367
- 248 **Chen Y, Zhao Y, Cheng Q et al.** "The Role of Intestinal Microbiota in Acute Graft-versus-Host Disease" J Immunol Res (2015); 2015: S.145859
- 249 **Natividad J, Petit V, Huang X et al.** "Commensal and probiotic bacteria influence intestinal barrier function and susceptibility to colitis in Nod1-/-; Nod2-/- mice" Inflamm Bowel Dis (2012); 18(8): S.1434–1446

- 250 **de Zoete M, Flavell R** "Interactions between Nod-Like Receptors and Intestinal Bacteria" *Front Immunol* (2013); 4: S.462
- 251 **Penack O, Smith O, Cunningham-Bussel A et al.** "NOD2 regulates hematopoietic cell function during graft-versus-host disease" *J. Exp. Med.* (2009); 206(10): S.2101–2110
- 252 **Hugot J, Chamaillard M, Zouali H et al.** "Association of NOD2 leucine-rich repeat variants with susceptibility to Crohn's disease" *Nature* (2001); 411(6837): S.599–603
- 253 **Ogura Y, Bonen D, Inohara N et al.** "A frameshift mutation in NOD2 associated with susceptibility to Crohn's disease" *Nature* (2001); 411(6837): S.603–606
- 254 **Strober W, Kitani A, Fuss I et al.** "The molecular basis of NOD2 susceptibility mutations in Crohn's disease" *Mucosal Immunol* (2008); 1 Suppl 1: S.S5-9
- 255 **Holler E, Rogler G, Herfarth H et al.** "Both donor and recipient NOD2/CARD15 mutations associate with transplant-related mortality and GvHD following allogeneic stem cell transplantation" *Blood* (2004); 104(3): S.889–894
- 256 **Elmaagacli A, Koldehoff M, Hindahl H et al.** "Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation" *Transplantation* (2006); 81(2): S.247–254
- 257 **Holler E, Rogler G, Brenmoehl J et al.** "Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination" *Blood* (2006); 107(10): S.4189–4193
- 258 **van der Velden W, Blijlevens N, Maas F et al.** "NOD2 polymorphisms predict severe acute graft-versus-host and treatment-related mortality in T-cell-depleted hematopoietic stem cell transplantation" *Bone Marrow Transplant.* (2009); 44(4): S.243–248
- 259 **Strober W, Asano N, Fuss I et al.** "Cellular and molecular mechanisms underlying NOD2 risk-associated polymorphisms in Crohn's disease" *Immunol Rev* (2014); 260(1): S.249–260
- 260 **Strober W, Watanabe T** "NOD2, an intracellular innate immune sensor involved in host defense and Crohn's disease" *Mucosal Immunol* (2011); 4(5): S.484–495
- 261 **Watanabe T, Asano N, Murray P et al.** "Muramyl dipeptide activation of nucleotide-binding oligomerization domain 2 protects mice from experimental colitis" *J. Clin. Invest.* (2008); 118(2): S.545–559
- 262 **Cantó E, Moga E, Ricart E et al.** "MDP-Induced selective tolerance to TLR4 ligands: impairment in NOD2 mutant Crohn's disease patients" *Inflamm Bowel Dis* (2009); 15(11): S.1686–1696
- 263 **Barreau F, Madre C, Meinzer U et al.** "Nod2 regulates the host response towards microflora by modulating T cell function and epithelial permeability in mouse Peyer's patches" *Gut* (2010); 59(2): S.207–217

- 264 **Granell M, Urbano-Ispizua A, Aróstegui J et al.** "Effect of NOD2/CARD15 variants in T-cell depleted allogeneic stem cell transplantation" *Haematologica* (2006); 91(10): S.1372–1376
- 265 **Sairafi D, Uzunel M, Remberger M et al.** "No impact of NOD2/CARD15 on outcome after SCT" *Bone Marrow Transplant.* (2008); 41(11): S.961–964
- 266 **Mayor N, Shaw B, Hughes D et al.** "Single nucleotide polymorphisms in the NOD2/CARD15 gene are associated with an increased risk of relapse and death for patients with acute leukemia after hematopoietic stem-cell transplantation with unrelated donors" *J Clin Oncol* (2007); 25(27): S.4262–4269
- 267 **Nguyen Y, Al-Lehibi A, Gorbe E et al.** "Insufficient evidence for association of NOD2/CARD15 or other inflammatory bowel disease-associated markers on GVHD incidence or other adverse outcomes in T-replete, unrelated donor transplantation" *Blood* (2010); 115(17): S.3625–3631
- 268 **Coomes S, Moore B** "Pleiotropic effects of transforming growth factor- β in hematopoietic stem-cell transplantation" *Transplantation* (2010); 90(11): S.1139–1144
- 269 **Mou H, Lin M, Cen H et al.** "Prevention of murine acute graft-versus-host disease by recipient-derived TGF β 1-treated dendritic cells" *Transplant Proc* (2004); 36(5): S.1604–1606
- 270 **Li G, Yang J, Hao J et al.** "[The role of third-party tolerogenic dendritic cells in the prevention of acute graft-versus-host-disease following allogeneic bone marrow transplantation in mice]" *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* (2012); 33(6): S.461–466
- 271 **Yang J, Li R, Ren Y et al.** "Third-party tolerogenic dendritic cells reduce allo-reactivity in vitro and ameliorate the severity of acute graft-versus-host disease in allo-bone marrow transplantation" *Scand J Immunol* (2013); 78(6): S.486–496
- 272 **Banovic T, MacDonald, Kelli P A, Morris E et al.** "TGF- β in allogeneic stem cell transplantation: friend or foe?" *Blood* (2005); 106(6): S.2206–2214
- 273 **Kim D, Won H, Su S et al.** "Risk stratification of organ-specific GVHD can be improved by single-nucleotide polymorphism-based risk models" *Bone Marrow Transplant.* (2014); 49(5): S.649–656
- 274 **Hattori H, Matsuzaki A, Suminoe A et al.** "Polymorphisms of transforming growth factor-beta1 and transforming growth factor-beta1 type II receptor genes are associated with acute graft-versus-host disease in children with HLA-matched sibling bone marrow transplantation" *Bone Marrow Transplant.* (2002); 30(10): S.665–671
- 275 **Noori-Daloii M, Rashidi-Nezhad A, Izadi P et al.** "Transforming growth factor-beta1 codon 10 polymorphism is associated with acute GVHD after allogenic BMT in Iranian population" *Ann Transplant* (2007); 12(4): S.5–10
- 276 **Liem L, Fibbe W, van Houwelingen, H C et al.** "Serum transforming growth factor-beta1 levels in bone marrow transplant recipients correlate with blood cell counts and chronic graft-versus-host disease" *Transplantation* (1999); 67(1): S.59–65

- 277 **Carli C, Giroux M, Delisle J** "Roles of transforming growth factor- β in graft-versus-host and graft-versus-tumor effects" Biol. Blood Marrow Transplant. (2012); 18(9): S.1329–1340
- 278 **Malone F, Leisenring W, Storer B et al.** "Prolonged anorexia and elevated plasma cytokine levels following myeloablative allogeneic hematopoietic cell transplant" Bone Marrow Transplant. (2007); 40(8): S.765–772
- 279 **Zhang P, Chen B, Chao N** "Prevention of GVHD without losing GVL effect: windows of opportunity" Immunol Res (2011); 49(1-3): S.49–55
- 280 **Edinger M, Hoffmann P** "Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences" Curr. Opin. Immunol. (2011); 23(5): S.679–684
- 281 **Weiden P, Flournoy N, Thomas E et al.** "Antileukemic effect of graft-versus-host disease in human recipients of allogeneic-marrow grafts" N. Engl. J. Med. (1979); 300(19): S.1068–1073
- 282 **Fowler D, Breglio J, Nagel G et al.** "Allospecific CD4+, Th1/Th2 and CD8+, Tc1/Tc2 populations in murine GVL: type I cells generate GVL and type II cells abrogate GVL" Biol. Blood Marrow Transplant. (1996); 2(3): S.118–125
- 283 **Brok H, Heidt P, van der Meide, P H et al.** "Interferon-gamma prevents graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation in mice" J. Immunol. (1993); 151(11): S.6451–6459
- 284 **Wang H, Asavaroengchai W, Yeap B et al.** "Paradoxical effects of IFN-gamma in graft-versus-host disease reflect promotion of lymphohematopoietic graft-versus-host reactions and inhibition of epithelial tissue injury" Blood (2009); 113(15): S.3612–3619
- 285 **Anderson B, McNiff J, Yan J et al.** "Memory CD4+ T cells do not induce graft-versus-host disease" J. Clin. Invest. (2003); 112(1): S.101–108
- 286 **Chen B, Cui X, Sempowski G et al.** "Transfer of allogeneic CD62L- memory T cells without graft-versus-host disease" Blood (2004); 103(4): S.1534–1541
- 287 **Zheng H, Matte-Martone C, Li H et al.** "Effector memory CD4+ T cells mediate graft-versus-leukemia without inducing graft-versus-host disease" Blood (2008); 111(4): S.2476–2484
- 288 **Zheng H, Matte-Martone C, Jain D et al.** "Central memory CD8+ T cells induce graft-versus-host disease and mediate graft-versus-leukemia" J. Immunol. (2009); 182(10): S.5938–5948
- 289 **Juchem K, Anderson B, Zhang C et al.** "A repertoire-independent and cell-intrinsic defect in murine GVHD induction by effector memory T cells" Blood (2011); 118(23): S.6209–6219
- 290 **Levy R** "Repertoire isn't everything for GVHD" Blood (2011); 118(23): S.5985–5987
- 291 **Zhang P, Wu J, Deoliveira D et al.** "Allospecific CD4(+) effector memory T cells do not induce graft-versus-host disease in mice" Biol. Blood Marrow Transplant. (2012); 18(10): S.1488–1499

- 292 **Zhang J, Barefoot B, Mo W et al.** "CD62L- memory T cells enhance T-cell regeneration after allogeneic stem cell transplantation by eliminating host resistance in mice" *Blood* (2012); 119(26): S.6344–6353
- 293 **Cohen J, Trenado A, Vasey D et al.** "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease" *J. Exp. Med.* (2002); 196(3): S.401–406
- 294 **Hoffmann P, Ermann J, Edinger M et al.** "Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation" *J. Exp. Med.* (2002); 196(3): S.389–399
- 295 **Taylor P, Lees C, Blazar B** "The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality" *Blood* (2002); 99(10): S.3493–3499
- 296 **Edinger M, Hoffmann P, Ermann J et al.** "CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation" *Nat Med* (2003); 9(9): S.1144–1150
- 297 **Di Ianni M, Falzetti F, Carotti A et al.** "Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation" *Blood* (2011); 117(14): S.3921–3928
- 298 **Hippen K, Riley J, June C et al.** "Clinical perspectives for regulatory T cells in transplantation tolerance" *Semin. Immunol.* (2011); 23(6): S.462–468
- 299 **Hart P, Gorman S, Finlay-Jones J** "Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D?" *Nat. Rev. Immunol.* (2011); 11(9): S.584–596
- 300 **Rosenblatt J, Bissonnette A, Ahmad R et al.** "Immunomodulatory effects of vitamin D: implications for GVHD" *Bone Marrow Transplant.* (2010); 45(9): S.1463–1468
- 301 **Pakkala I, Taskinen E, Pakkala S et al.** "MC1288, a vitamin D analog, prevents acute graft-versus-host disease in rat bone marrow transplantation" *Bone Marrow Transplant.* (2001); 27(8): S.863–867
- 302 **Middleton P, Cullup H, Dickinson A et al.** "Vitamin D receptor gene polymorphism associates with graft-versus-host disease and survival in HLA-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation" *Bone Marrow Transplant.* (2002); 30(4): S.223–228
- 303 **Bogunia-Kubik K, Middleton P, Norden J et al.** "Association of vitamin D receptor polymorphisms with the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation" *Int J Immunogenet* (2008); 35(3): S.207–213
- 304 **Glotzbecker B, Ho V, Aldridge J et al.** "Low levels of 25-hydroxyvitamin D before allogeneic hematopoietic SCT correlate with the development of chronic GVHD" *Bone Marrow Transplant.* (2013); 48(4): S.593–597
- 305 **Kreutz M, Karrer S, Hoffmann P et al.** "Whole-Body UVB Irradiation during Allogeneic Hematopoietic Cell Transplantation Is Safe and Decreases Acute Graft-versus-Host Disease" *J Investig Dermatol* (2011); 132(1): S.179–187

- 306 **Chen X, Dodge J, Komorowski R et al.** "A critical role for the retinoic acid signaling pathway in the pathophysiology of gastrointestinal graft-versus-host disease" *Blood* (2013); 121(19): S.3970–3980
- 307 **Aoyama K, Saha A, Tolar J et al.** "Inhibiting retinoic acid signaling ameliorates graft-versus-host disease by modifying T-cell differentiation and intestinal migration" *Blood* (2013); 122(12): S.2125–2134
- 308 **Koenecke C, Prinz I, Bubke A et al.** "Shift of graft-versus-host-disease target organ tropism by dietary vitamin A" *PLoS ONE* (2012); 7(5): S.e38252
- 309 **Yang H, Gu J, Zhu Q et al.** "Protection of acute GVHD by all-trans retinoic acid through suppression of T cell expansion and induction of regulatory T cells through IL-2 signaling" *Int Immunopharmacol* (2015); 28(2): S.911–916
- 310 **Schmitz S** "Der Experimentator: Zellkultur" 3. Aufl., Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (2011)
- 311 **Mast G** "Gebrauchsanweisung Zählkammern" (25.06.2010). Im Internet: http://www.marienfeld-superior.com/index.php/anleitungen.html?file=tl_files/Infomaterial/Anleitungen%20und%20Anwendung/Z%C3%A4hlkammern/2010-Marienfeld-info-Zaehlkammern.pdf; Stand: 02.03.2017
- 312 **Nalge Nunc International** "Cryopreservation Manual" (27.04.1998). Im Internet: <https://tools.thermofisher.com/content/sfs/brochures/D17044.pdf>; Stand: 02.03.2017
- 313 **Graw R, Herzig G, Eisel R et al.** "Leukocyte and platelet collection from normal donors with the continuous flow blood cell separator" *Transfusion* (1971); 11(2): S.94–101
- 314 **Luttmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D** "Der Experimentator: Immunologie" 3. Aufl., Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag (2009)
- 315 **Sanderson R, Shepperdson R, Vatter A et al.** "Isolation and enumeration of peripheral blood monocytes" *J. Immunol.* (1977); 118(4): S.1409–1414
- 316 **Johnson W, Mei B, Cohn Z** "The separation, long-term cultivation, and maturation of the human monocyte" *J. Exp. Med.* (1977); 146(6): S.1613–1626
- 317 **BCI** "JE-5.0 Elutriation System" (15.10.2014). Im Internet: https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/ajax/searchdownload/techdoc/TP_DOC_88286/JE5-IM-13; Stand: 02.03.2017
- 318 **Geissmann F, Prost C, Monnet J et al.** "Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells" *J. Exp. Med.* (1998); 187(6): S.961–966
- 319 **Roche Diagnostics GmbH** "CASY Model TT - Cell Counter and Analyzer: Label-Free Viability Control and Cell Sizing" (12.06.2008). Im Internet: http://www.sunway.com.tw/resourcefile/sunway_wab/Innovatis_Casy_TT.pdf; Stand: 02.03.2017

- 320 **Stemcell Technologies** "ALDEFLUOR - Aldehyde Dehydrogenase-Based Cell Detection Kit: Product Information Sheet"
- 321 **Herrath M von, Harrison L** "Regulatory Lymphocytes: Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity" *Nat Rev Immunol* (2003); 3(3): S.223–232
- 322 **Yamazaki S, Inaba K, Tarbell K et al.** "Dendritic cells expand antigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells including suppressors of alloreactivity" *Immunol. Rev.* (2006); 212: S.314–329
- 323 **Bleakley M, Heimfeld S, Loeb K et al.** "Outcomes of acute leukemia patients transplanted with naive T cell-depleted stem cell grafts" *J. Clin. Invest.* (2015); 125(7): S.2677–2689
- 324 **Sivula J, Cordova Z, Tuimala J et al.** "Toll-like receptor gene polymorphisms confer susceptibility to graft-versus-host disease in allogenic hematopoietic stem cell transplantation" *Scand J Immunol* (2012); 76(3): S.336–341
- 325 **Zhao Y, Liu Q, Yang L et al.** "TLR4 inactivation protects from graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation" *Cell Mol Immunol* (2013); 10(2): S.165–175
- 326 **Visintin A, Mazzoni A, Spitzer J et al.** "Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells" *J. Immunol.* (2001); 166(1): S.249–255
- 327 **Fritz J, Girardin S, Fitting C et al.** "Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists" *Eur. J. Immunol.* (2005); 35(8): S.2459–2470
- 328 **Dowling D, Hamilton C, O'Neill S** "A comparative analysis of cytokine responses, cell surface marker expression and MAPKs in DCs matured with LPS compared with a panel of TLR ligands" *Cytokine* (2008); 41(3): S.254–262
- 329 **Stern J, Smith K** "Interleukin-2 induction of T-cell G1 progression and c-myb expression" *Science* (1986); 233(4760): S.203–206
- 330 **Malek T, Castro I** "Interleukin-2 Receptor Signaling: At the Interface between Tolerance and Immunity" *Immunity* (2010); 33(2): S.153–165
- 331 **Agrawal S, Agrawal A, Doughty B et al.** "Cutting edge: different Toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos" *J. Immunol.* (2003); 171(10): S.4984–4989
- 332 **Tada H, Aiba S, Shibata K et al.** "Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells" *Infect Immun* (2005); 73(12): S.7967–7976
- 333 **Lorenz E, Schwartz D, Martin P et al.** "Association of TLR4 mutations and the risk for acute GVHD after HLA-matched-sibling hematopoietic stem cell transplantation" *Biol. Blood Marrow Transplant.* (2001); 7(7): S.384–387

- 334 **Agnese D, Calvano J, Hahm S et al.** "Human toll-like receptor 4 mutations but not CD14 polymorphisms are associated with an increased risk of gram-negative infections" *J Infect Dis* (2002); 186(10): S.1522–1525
- 335 **Skevaki C, Pararas M, Kostelidou K et al.** "Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases" *Clin. Exp. Immunol.* (2015); 180(2): S.165–177
- 336 **Landfried K, Bataille F, Rogler G et al.** "Recipient NOD2/CARD15 status affects cellular infiltrates in human intestinal graft-versus-host disease" *Clin. Exp. Immunol.* (2010); 159(1): S.87–92
- 337 **Uehori J, Fukase K, Akazawa T et al.** "Dendritic cell maturation induced by muramyl dipeptide (MDP) derivatives: monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation" *J. Immunol.* (2005); 174(11): S.7096–7103
- 338 **Magalhaes J, Fritz J, Le Bourhis L et al.** "Nod2-dependent Th2 polarization of antigen-specific immunity" *J. Immunol.* (2008); 181(11): S.7925–7935
- 339 **Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O et al.** "Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guérin*: involvement of toll-like receptors" *Infect Immun* (2000); 68(12): S.6883–6890
- 340 **Biswas A, Petnicki-Ocwieja T, Kobayashi K** "Nod2: a key regulator linking microbiota to intestinal mucosal immunity" *J Mol Med* (2012); 90(1): S.15–24
- 341 **Rehman A, Sina C, Gavrilova O et al.** "Nod2 is essential for temporal development of intestinal microbial communities" *Gut* (2011); 60(10): S.1354–1362
- 342 **Wehkamp J, Harder J, Weichenthal M et al.** "NOD2 (CARD15) mutations in Crohn's disease are associated with diminished mucosal alpha-defensin expression" *Gut* (2004); 53(11): S.1658–1664
- 343 **Aiba S, Manome H, Yoshino Y et al.** "In vitro treatment of human transforming growth factor-beta1-treated monocyte-derived dendritic cells with haptens can induce the phenotypic and functional changes similar to epidermal Langerhans cells in the initiation phase of allergic contact sensitivity reaction" *Immunology* (2000); 101(1): S.68–75
- 344 **Fogel-Petrovic M, Long J, Misso N et al.** "Physiological concentrations of transforming growth factor beta1 selectively inhibit human dendritic cell function" *Int Immunopharmacol* (2007); 7(14): S.1924–1933
- 345 **Geissmann F, Revy P, Regnault A et al.** "TGF-beta 1 prevents the noncognate maturation of human dendritic Langerhans cells" *J. Immunol.* (1999); 162(8): S.4567–4575
- 346 **van der Aar A, Picavet D, Muller F et al.** "Langerhans cells favor skin flora tolerance through limited presentation of bacterial antigens and induction of regulatory T cells" *J. Invest. Dermatol.* (2013); 133(5): S.1240–1249
- 347 **Garib F, Rizopulu A** "T-Regulatory Cells as Part of Strategy of Immune Evasion by Pathogens" *Biochemistry Mosc* (2015); 80(8): S.957–971

- 348 **Kao J, Zhang M, Miller M et al.** "Helicobacter pylori immune escape is mediated by dendritic cell-induced Treg skewing and Th17 suppression in mice" *Gastroenterology* (2010); 138(3): S.1046–1054
- 349 **Tu E, Chia, Pei Zhi Cheryl, Chen W** "TGF β in T cell biology and tumor immunity: Angel or devil?" *Cytokine Growth Factor Rev* (2014); 25(4): S.423–435
- 350 **Ghiringhelli F, Puig P, Roux S et al.** "Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation" *J. Exp. Med.* (2005); 202(7): S.919–929
- 351 **Liu V, Wong L, Jang T et al.** "Tumor evasion of the immune system by converting CD4+CD25- T cells into CD4+CD25+ T regulatory cells: role of tumor-derived TGF-beta" *J. Immunol.* (2007); 178(5): S.2883–2892
- 352 **Dumitriu I, Dunbar D, Howie S et al.** "Human dendritic cells produce TGF-beta 1 under the influence of lung carcinoma cells and prime the differentiation of CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells" *J. Immunol.* (2009); 182(5): S.2795–2807
- 353 **Schräder M, Bendik I, Becker-André M et al.** "Interaction between retinoic acid and vitamin D signaling pathways" *J. Biol. Chem.* (1993); 268(24): S.17830–17836
- 354 **Joseph R, Bayraktar U, Kim T et al.** "Vitamin D receptor upregulation in alloreactive human T cells" *Hum Immunol* (2012); 73(7): S.693–698
- 355 **Naranjo-Gómez M, Raïch-Regué D, Oñate C et al.** "Comparative study of clinical grade human tolerogenic dendritic cells" *J Transl Med* (2011); 9: S.89
- 356 **Unger W, Laban S, Kleijwegt F et al.** "Induction of Treg by monocyte-derived DC modulated by vitamin D3 or dexamethasone: differential role for PD-L1" *Eur. J. Immunol.* (2009); 39(11): S.3147–3159
- 357 **Jin C, Hong C, Takei M et al.** "All-trans retinoic acid inhibits the differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells" *Leuk Res* (2010); 34(4): S.513–520
- 358 **Brown C, Noelle R** "Seeing through the dark: New insights into the immune regulatory functions of vitamin A" *Eur. J. Immunol.* (2015); 45(5): S.1287–1295
- 359 **Hill J, Hall J, Sun C et al.** "Retinoic acid enhances Foxp3 induction indirectly by relieving inhibition from CD4+CD44hi Cells" *Immunity* (2008); 29(5): S.758–770
- 360 **Sato T, Kitawaki T, Fujita H et al.** "Human CD1c⁺ myeloid dendritic cells acquire a high level of retinoic acid-producing capacity in response to vitamin D₃" *J. Immunol.* (2013); 191(6): S.3152–3160
- 361 **Gordon J, Ma Y, Churchman L et al.** "Regulatory dendritic cells for immunotherapy in immunologic diseases" *Front Immunol* (2014); 5: S.7
- 362 **Alroy I, Towers T, Freedman L** "Transcriptional repression of the interleukin-2 gene by vitamin D3: direct inhibition of NFATp/AP-1 complex formation by a nuclear hormone receptor" *Mol Cell Biol* (1995); 15(10): S.5789–5799

- 363 **Bhalla A, Amento E, Serog B et al.** "1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits antigen-induced T cell activation" *J. Immunol.* (1984); 133(4): S.1748–1754
- 364 **Qi X, Li P, Li G et al.** "1,25-dihydroxyvitamin D(3) regulates LPS-induced cytokine production and reduces mortality in rats" *World J Gastroenterol* (2008); 14(24): S.3897–3902
- 365 **Rigby W, Denome S, Fanger M** "Regulation of lymphokine production and human T lymphocyte activation by 1,25-dihydroxyvitamin D3. Specific inhibition at the level of messenger RNA" *J. Clin. Invest.* (1987); 79(6): S.1659–1664
- 366 **Chambers E, Suwannasaen D, Mann E et al.** "1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in combination with transforming growth factor- β increases the frequency of Foxp3 $^{+}$ regulatory T cells through preferential expansion and usage of interleukin-2" *Immunology* (2014); 143(1): S.52–60
- 367 **Ertesvag A, Engedal N, Naderi S et al.** "Retinoic acid stimulates the cell cycle machinery in normal T cells: involvement of retinoic acid receptor-mediated IL-2 secretion" *J. Immunol.* (2002); 169(10): S.5555–5563
- 368 **Engedal N, Ertesvag A, Blomhoff H** "Survival of activated human T lymphocytes is promoted by retinoic acid via induction of IL-2" *Int. Immunopharmacol.* (2004); 16(3): S.443–453
- 369 **Engedal N, Gjevik T, Blomhoff R et al.** "All-trans retinoic acid stimulates IL-2-mediated proliferation of human T lymphocytes: early induction of cyclin D3" *J. Immunol.* (2006); 177(5): S.2851–2861
- 370 **Miyatake J, Maeda Y** "Inhibition of proliferation and CD25 down-regulation by retinoic acid in human adult T cell leukemia cells" *Leukemia* (1997); 11(3): S.401–407
- 371 **Qiu Y, Peng K, Liu M et al.** "CD8 $\alpha\alpha$ TCR $\alpha\beta$ Intraepithelial Lymphocytes in the Mouse Gut" *Dig Dis Sci* (2016)
- 372 **Nambu Y, Hayashi T, Jang K et al.** "In situ differentiation of CD8 $\alpha\alpha$ T cells from CD4 T cells in peripheral lymphoid tissues" *Sci Rep* (2012); 2: S.642
- 373 **Poussier P, Ning T, Banerjee D et al.** "A unique subset of self-specific intraintestinal T cells maintains gut integrity" *J. Exp. Med.* (2002); 195(11): S.1491–1497
- 374 **Vantourout P, Hayday A** "Six-of-the-best: unique contributions of $\gamma\delta$ T cells to immunology" *Nat. Rev. Immunol.* (2013); 13(2): S.88–100
- 375 **Hu Y, Cui Q, Luo C et al.** "A promising sword of tomorrow: Human $\gamma\delta$ T cell strategies reconcile allo-HSCT complications" *Blood Rev* (2015)
- 376 **Xiong Y, Bensoussan D, Decot V** "Adoptive Immunotherapies After Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation in Patients With Hematologic Malignancies" *Transfus Med Rev* (2015); 29(4): S.259–267
- 377 **Yu X, Liu Z, Wang Y et al.** "Characteristics of V δ 1(+) and V δ 2(+) $\gamma\delta$ T cell subsets in acute liver allograft rejection" *Transpl Immunol* (2013); 29(1-4): S.118–122
- 378 **Minculescu L, Sengeløv H** "The role of gamma delta T cells in haematopoietic stem cell transplantation" *Scand J Immunol* (2015); 81(6): S.459–468

- 379 **Shadman M, Rajabian Z, Ajami A et al.** "Frequency of $\gamma\delta$ T Cells and Invariant Natural Killer T Cells in Helicobacter Pylori-infected Patients with Peptic Ulcer and Gastric Cancer" Iran J Allergy Asthma Immunol (2015); 14(5): S.493–501
- 380 **Wistuba-Hamprecht K, Haehnel K, Janssen N et al.** "Peripheral blood T-cell signatures from high-resolution immune phenotyping of $\gamma\delta$ and $\alpha\beta$ T-cells in younger and older subjects in the Berlin Aging Study II" Immun Ageing (2015); 12: S.25
- 381 **Keir M, Francisco L, Sharpe A** "PD-1 and its ligands in T-cell immunity" Curr. Opin. Immunol. (2007); 19(3): S.309–314
- 382 **Chen C, Qu Q, Huang J et al.** "Expression of programmed-death receptor ligands 1 and 2 may contribute to the poor stimulatory potential of murine immature dendritic cells" Immunobiology (2007); 212(3): S.159–165
- 383 **Staeva-Vieira T, Freedman L** "1,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits IFN-gamma and IL-4 levels during in vitro polarization of primary murine CD4+ T cells" J. Immunol. (2002); 168(3): S.1181–1189
- 384 **Penna G, Roncari A, Amuchastegui S et al.** "Expression of the inhibitory receptor ILT3 on dendritic cells is dispensable for induction of CD4+Foxp3+ regulatory T cells by 1,25-dihydroxyvitamin D3" Blood (2005); 106(10): S.3490–3497
- 385 **Chambers E, Nanzer A, Richards D et al.** "Serum 25-dihydroxyvitamin D levels correlate with CD4(+)Foxp3(+) T-cell numbers in moderate/severe asthma" J. Allergy Clin. Immunol. (2012); 130(2): S.542–544
- 386 **Milliken, Sarah V I, Wassall H, Lewis B et al.** "Effects of ultraviolet light on human serum 25-hydroxyvitamin D and systemic immune function" J. Allergy Clin. Immunol. (2012); 129(6): S.1554–1561
- 387 **Smolders J, Thewissen M, Peelen E et al.** "Vitamin D status is positively correlated with regulatory T cell function in patients with multiple sclerosis" PLoS ONE (2009); 4(8): S.e6635
- 388 **Wang J, Huizinga, Tom W J, Toes, Rene E M** "De novo generation and enhanced suppression of human CD4+CD25+ regulatory T cells by retinoic acid" J. Immunol. (2009); 183(6): S.4119–4126
- 389 **Lu L, Zhou X, Wang J et al.** "Characterization of protective human CD4CD25 FOXP3 regulatory T cells generated with IL-2, TGF- β and retinoic acid" PLoS ONE (2010); 5(12): S.e15150
- 390 **Yamanaka K, Dimitroff C, Fuhlbrigge R et al.** "Vitamins A and D are potent inhibitors of cutaneous lymphocyte-associated antigen expression" J. Allergy Clin. Immunol. (2008); 121(1): S.148-157.e3
- 391 **Vassena L, Giuliani E, Rita Buonomini A et al.** "L-Selectin (Cd62L) Is Downregulated On Cd4+ And Cd8+ T Lymphocytes Of Hiv-1-Infected Individuals Naïve For Art" J Acquir Immune Defic Syndr (2016)
- 392 **Iwata M, Yokota A** "Retinoic acid production by intestinal dendritic cells" Vitam Horm (2011); 86: S.127–152

- 393 **Gyöngyösi A, Szatmari I, Pap A et al.** "RDH10, RALDH2, and CRABP2 are required components of PPAR γ -directed ATRA synthesis and signaling in human dendritic cells" *J Lipid Res* (2013); 54(9): S.2458–2474
- 394 **Molenaar R, Knippenberg M, Goverse G et al.** "Expression of retinaldehyde dehydrogenase enzymes in mucosal dendritic cells and gut-draining lymph node stromal cells is controlled by dietary vitamin A" *J. Immunol.* (2011); 186(4): S.1934–1942
- 395 **Lee Y, Yi H, Suh Y et al.** "Blockade of Retinol Metabolism Protects T Cell-Induced Hepatitis by Increasing Migration of Regulatory T Cells" *Mol Cells* (2015); 38(11): S.998–1006
- 396 **Yang H, Chou H, Gu X et al.** "Mechanistic insights into immunomodulation by hepatic stellate cells in mice: a critical role of interferon-gamma signaling" *Hepatology* (2009); 50(6): S.1981–1991
- 397 **Dunham R, Thapa M, Velazquez V et al.** "Hepatic stellate cells preferentially induce Foxp3 $^{+}$ regulatory T cells by production of retinoic acid" *J. Immunol.* (2013); 190(5): S.2009–2016
- 398 **Ichikawa S, Mucida D, Tynznik A et al.** "Hepatic stellate cells function as regulatory bystanders" *J. Immunol.* (2011); 186(10): S.5549–5555
- 399 **Bakdash G, Vogelpoel, L T C, van Capel, T M M et al.** "Retinoic acid primes human dendritic cells to induce gut-homing, IL-10-producing regulatory T cells" *Mucosal Immunol* (2015); 8(2): S.265–278
- 400 **Wu T, Wang Y, Wu T et al.** "Inhibition of allogenic T-cell cytotoxicity by hepatic stellate cell via CD4 $^{+}$ CD25 $^{+}$ Foxp3 $^{+}$ regulatory T cells in vitro" *Transplant Proc* (2012); 44(4): S.1055–1059
- 401 **Asavaroengchai W, Wang H, Wang S et al.** "An essential role for IFN-gamma in regulation of alloreactive CD8 T cells following allogeneic hematopoietic cell transplantation" *Biol. Blood Marrow Transplant.* (2007); 13(1): S.46–55
- 402 **Refaeli Y, van Parijs L, Alexander S et al.** "Interferon gamma is required for activation-induced death of T lymphocytes" *J. Exp. Med.* (2002); 196(7): S.999–1005
- 403 **Foulds K, Rotte M, Paley M et al.** "IFN-gamma mediates the death of Th1 cells in a paracrine manner" *J. Immunol.* (2008); 180(2): S.842–849
- 404 **Zhao Z, Cao Z, Xu W et al.** "Immune protection function of multipotent mesenchymal stromal cells: role of transforming growth factor- β 1" *Cancer Invest* (2012); 30(9): S.646–656
- 405 **Quinn C, Jessup W, Wong J et al.** "Expression and regulation of sterol 27-hydroxylase (CYP27A1) in human macrophages: a role for RXR and PPARgamma ligands" *Biochem J* (2005); 385(Pt 3): S.823–830

9. Anhang

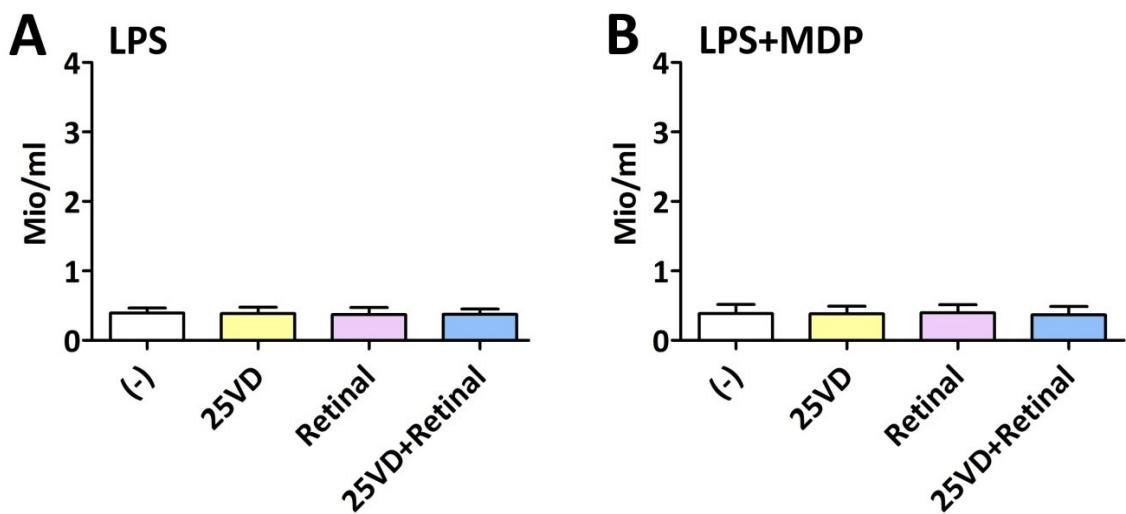


Abbildung 9-1: Lymphozyten-Zellzahl nach vier Tagen MLR

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über sieben Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Am siebten Tag wurden die DC geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei jeweils bakterielle Stimuli sowie die Vitaminvorstufen 25VD (5×10^{-8} M), Retinal (10^{-6} M), eine Kombination beider Vitaminvorstufen ($25VD 5 \times 10^{-8}$ M, Retinal 10^{-6} M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. A zeigt Ansätze in denen DC mit LPS (10ng/ml) und Lymphozyten sowie den angegebenen Vitaminen kultiviert wurden, B Ansätze mit DC, Lymphozyten, LPS (10ng/ml), MDP (100ng/ml) und Vitaminen. Die Messung der Zellzahl erfolgte am vierten Tag der MLR. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Einzelexperimenten. Alle zugehörigen SEM sind angetragen.

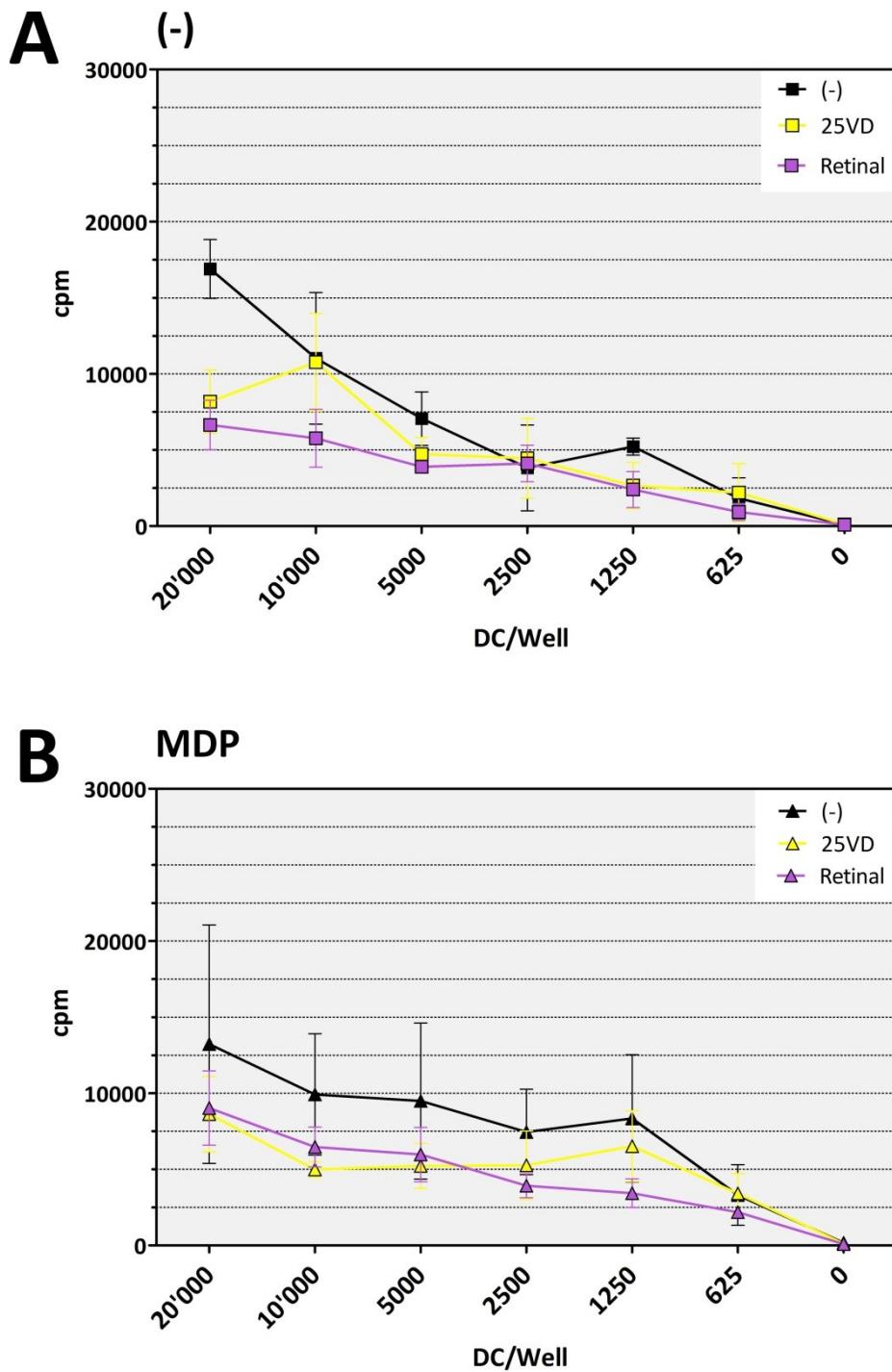


Abbildung 9-2: Einfluss von 25VD und Retinal auf die Proliferation der Lymphozyten in der MLR mit MDP oder ohne bakteriellen Stimulus

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über sieben Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Am siebten Tag wurden die DCs geerntet und mit allogenen Lymphozyten (10^5 /Well, $0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei der bakterielle Stimulus MDP (100ng/ml) oder kein Stimulus sowie die beiden Vitaminvorstufen Calcidiol (25VD, 5×10^{-8} M), Retinal (10^{-6} M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. Die iDC selbst wurden in einer Verdünnungsreihe (wie im Graph angegeben, beginnend mit 2×10^4 /Well entsprechend 10^5 /ml) eingesetzt. Am siebten Tag der MLR wurden die Lymphozyten 18 bis 20 Stunden mit [Methyl^3H]-Thymidin inkubiert und der Einbau des radioaktiv markierten Thymidins in neu synthetisierte DNA mittels Zerfallszähler gemessen, wodurch die Proliferationsrate der Lymphozyten analysiert wurde. Dargestellt sind Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten \pm SEM.

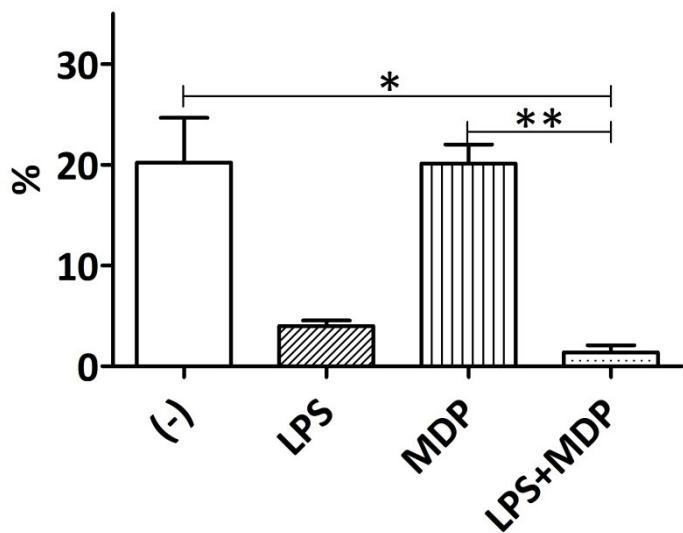


Abbildung 9-3: Einfluss von LPS und MDP auf den Anteil FOXP3⁺ an den CD4⁺CD25⁺T-Lymphozyten in der MLR

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Am achten Tag wurden die DCs geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei die bakteriellen Stimuli LPS (10ng/ml), MDP (100ng/ml), LPS (10ng/ml) und MDP (100ng/ml) oder zur Kontrolle kein Stimulus zugesetzt wurden. Die FACS-Oberflächenfärbung auf CD3, CD4, CD8 sowie die Intrazellulärfärbung auf FOXP3 bzw. die FOXP3-Isotyp-Färbung erfolgten am sechsten Tag der MLR. Dargestellt sind Mittelwerte des Anteils FOXP3⁺Zellen an der gesamten CD4⁺CD25⁺Population aus drei unabhängigen Experimenten. Die angegebenen Zahlenwerte entsprechen der „Frequency of Parent“, d.h. dem prozentualen Anteil der jeweiligen Population an der übergeordneten, abzüglich dem Isotyp. Alle zugehörigen SEM sind angetragen. Statistische Analysen erfolgten mit Hilfe des Student's t-Test: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$; verglichene Werte durch Balken markiert.

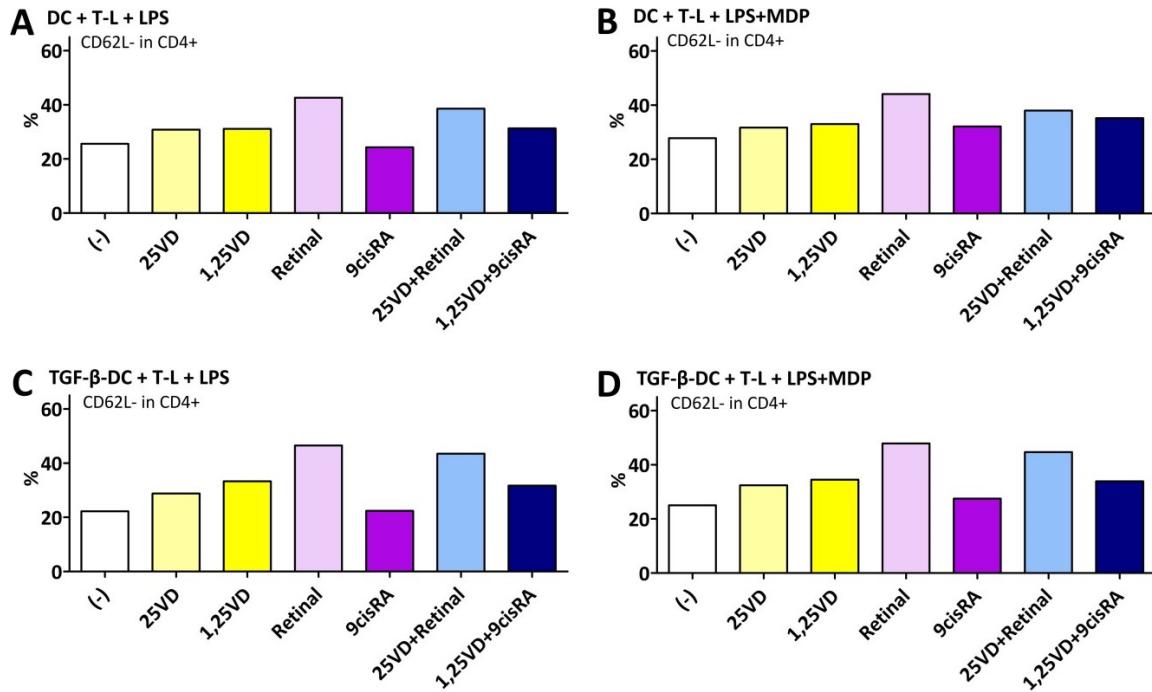


Abbildung 9-4: Einfluss von 25VD, 1,25VD, Retinal und 9cisRA auf die Expression von CD62L auf CD4⁺T-Lymphozyten in der MLR

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Zur Generierung der TGF β -DCs wurden außerdem 10ng/ml TGF β hinzugegeben. Am achten Tag wurden die DCs bzw. TGF β -DCs geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei jeweils LPS alleine oder in Kombination mit MDP sowie die Vitaminvorstufen 25VD (5×10^{-8} M), Retinal (10^{-6} M), eine Kombination beider Vitaminvorstufen ($25VD 5 \times 10^{-8}M$, Retinal $10^{-6}M$), die biologisch aktiven Vitamine 1,25VD (5×10^{-9} M) und Retinsäure (9cisRA, 10^{-7} M), eine Kombination aus beiden biologisch aktiven Vitaminen ($1,25VD 5 \times 10^{-9}M$, 9cisRA $10^{-7}M$) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. **A** zeigt Ansätze in denen DC mit LPS (10ng/ml) und Lymphozyten sowie den angegebenen Vitaminen kultiviert wurden, **B** Ansätze mit DC, Lymphozyten, LPS (10ng/ml) und Vitaminen, **C** Ansätze mit TGF β -DC, Lymphozyten, LPS (10ng/ml) und Vitaminen und **D** Ansätze mit TGF β -DC, Lymphozyten, LPS (10ng/ml), MDP (100ng/ml) sowie den Vitaminen. Die FACS-Oberflächenfärbung auf CD3, CD4, CD8, CD62L und CD45RO erfolgten am sechsten Tag der MLR. Dargestellt die Ergebnisse eines repräsentativen Einzelexperiments. Die angegebenen Zahlenwerte entsprechen der „Frequency of Parent“, d.h. dem prozentualen Anteil der jeweiligen Population an den CD4⁺T-Lymphozyten.

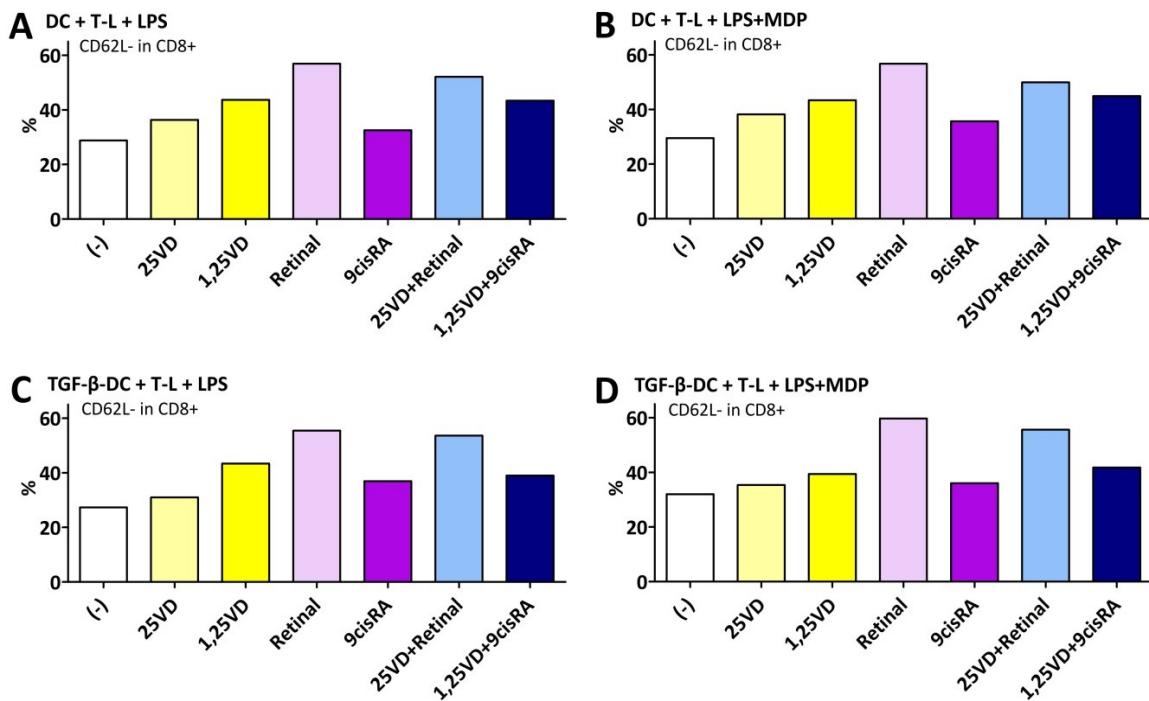


Abbildung 9-5: Einfluss von 25VD, 1,25VD, Retinal und 9cisRA auf die Expression von CD62L auf CD8⁺T-Lymphozyten in der MLR

Um humane Monozyten zu iDC zu differenzieren wurden diese über acht Tage in FCS-haltigem Medium mit GM-CSF und IL-4 kultiviert. Zur Generierung der TGF β -DCs wurden außerdem 10ng/ml TGF β hinzugegeben. Am achten Tag wurden die DCs bzw. TGF β -DCs geerntet und je $0,5 \times 10^5$ /ml mit allogenen Lymphozyten ($0,5 \times 10^6$ /ml) in einer MLR kokultiviert, wobei jeweils LPS alleine oder in Kombination mit MDP sowie die Vitaminvorstufen 25VD (5×10^{-8} M), Retinal (10^{-6} M), die biologisch aktiven Vitamine 1,25VD (5×10^{-9} M) und Retinsäure (9cisRA, 10^{-7} M), eine Kombination aus beiden biologisch aktiven Vitaminen (1,25VD 5×10^{-9} M, 9cisRA 10^{-7} M) oder als Kontrolle kein Vitamin zugesetzt wurden. **A** zeigt Ansätze in denen DC mit LPS (10ng/ml) und Lymphozyten sowie den angegebenen Vitaminen kultiviert wurden, **B** Ansätze mit DC, Lymphozyten, LPS (10ng/ml), MDP (100ng/ml) und Vitaminen, **C** Ansätze mit TGF β -DC, Lymphozyten, LPS (10ng/ml) und Vitaminen und **D** Ansätze mit TGF β -DC, Lymphozyten, LPS (10ng/ml), MDP (100ng/ml) sowie den Vitaminen. Die FACS-Oberflächenfärbung auf CD3, CD4, CD8, CD62L und CD45RO erfolgten am sechsten Tag der MLR. Dargestellt die Ergebnisse eines repräsentativen Einzelexperiments. Die angegebenen Zahlenwerte entsprechen der „Frequency of Parent“, d.h. dem prozentualen Anteil der jeweiligen Population an den CD8⁺T-Lymphozyte.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt **Prof. Dr. Marina Kreutz** für die ausgezeichnete Betreuung meiner Doktorarbeit. Neben der hervorragenden fachlichen Unterstützung hat mich Dein ungeheuer großes Interesse an allen Ideen und Ergebnissen beeindruckt. Ich bin außerdem sehr dankbar für Deine große Hilfsbereitschaft, Deine außerordentliche Geduld und die vielen Ratschläge und Ermutigungen. Ich habe aus der Zeit viele wertvolle und tolle Erfahrungen mitgenommen.

Für die Ermöglichung dieser Arbeit am Institut für Hämatologie und internistische Onkologie danke ich **Prof. Dr. Reinhard Andreesen** und **Prof. Dr. Wolfgang Herr**.

Zudem danke ich **Prof. Dr. Sigrid Karrer** für die Bereitschaft zur Begutachtung meiner Arbeit.

Besonders bedanken möchte ich mich bei **Dr. Katrin Peter** für die tolle Betreuung. Danke für die vielen lehrreichen und gleichzeitig auch immer unterhaltsamen Stunden am LSR und im Labor. Es war super mit Dir zusammen zu arbeiten. Danke für Deine Hilfsbereitschaft, die Unterstützung, Motivation und vor allem für Dein unglaubliches Engagement.

Vielen herzlichen Dank an **Alice Peuker** für Deine Unterstützung, die Proliferationsmessungen und Deine Hilfe bei der Arbeit im Labor mit vielen wertvollen Tipps und Tricks.

Ein großes Dankeschön geht an alle Mitarbeiter der **AG Kreutz** und **AG Rehli**, die zum tollen Arbeitsklima beitragen und den H1 für mich zu einem Ort voller schöner Erinnerungen machen. Vielen lieben Dank an Julia für Deine geduldige Hilfe bei allen (Excel-)Problemen, danke auch an Almut, Sandra, Daggi, Johanna, Saskia, Marta und alle anderen im H1 für Eure Hilfe, die aufbauenden Gespräche, die Kaffeepausen und die schöne Zeit.

Auch gilt mein Dank der **Dr. Wolbauer-Stiftung Donauwörth** und der **Studienstiftung des deutschen Volkes** für die Förderung während meines Studiums.

Von Herzen danke ich **allen Freunden**, die mich während des Studiums und der Zeit im Labor begleitet haben, ihr seid ein wichtiger Teil meines Lebens. Julia, Dir danke ich zusätzliches für die Vermittlung dieser Arbeit.

Ungeheuer dankbar bin ich **meiner Familie** für die bedingungslose Unterstützung während all der Jahre. **Markus** und **Matthias** euch danke ich, dass ihr immer für mich da seid. Ihr seid die besten Brüder, die man sich vorstellen kann. Herzlichen Dank an **Carola** und **Thomas**, dass Ihr mich so toll aufnehmt und uns in allen Belangen unterstützt. **Mama** und **Papa** Euch danke ich von ganzem Herzen für ein tolles Zuhause, bedingungslosen Rückhalt und dass Ihr uns Dreien so Vieles ermöglicht habt. Eure uneingeschränkte Unterstützung ist die Grundlage für alles was ich im Leben erreicht habe. Ihr seid für mich perfekte Eltern. **Axel**, Dir möchte ich besonders für Deine Geduld, Dein Verständnis und für Deine Liebe danken. Ich bin unbeschreiblich froh, dass es Dich gibt und dass wir zusammen durchs Leben gehen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder anderer Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Andrea Kaiser