

Regulation des Immunsystems durch Tryptophan-Depletion:  
Rolle der dendritischen Zellen

Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades (Dr. rer. nat.)  
der  
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn

vorgelegt von  
Manuela Maria Brenk  
aus  
Andernach

Bonn, 2008



Angefertigt mit Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der  
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn.

1. Gutachter: PD Dr. med. Dagmar von Bubnoff  
2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. Waldemar Kolanus

eingereicht am: 02.06.2008  
Tag der Promotion: 27.10.2008

Diese Dissertation ist auf dem Hochschulschriftenserver der ULB Bonn [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online) elektronisch publiziert.

Erscheinungsjahr 2008



*Für meine Familie, insbesondere*

*für meinen Bruder Julian*



## ZUSAMMENFASSUNG

Das Tryptophan-katabolisierende Enzym Indoleamin 2,3-Dioxygenase (IDO) spielt eine maßgebliche Rolle beim Abschalten von Immunantworten durch die Hemmung der T-Zellproliferation. Obwohl dendritische Zellen (DCs) zu den potentesten antigen-präsentierenden Zellen zählen und sie als die Initiatoren der Immunantwort gelten, existieren nur wenige Studien über den Effekt von IDO auf DCs selbst. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Frage bearbeitet, inwieweit der trp-Mangel die biologische Funktion von myeloischen DCs *in vitro* beeinflusst. Zu diesem Zweck wurden humane DCs aus CD14<sup>+</sup> Monozyten unter trp-Mangel (DCs<sup>-trp</sup>; 5 µM trp) sowie unter normalen Zellkulturbedingungen (DCs<sup>+trp</sup>; 30 µM trp) generiert. Um zellulären Stress zu bewältigen, leitet die Zelle Gegenmaßnahmen ein, die für das Überleben und für die optimale Anpassung der Zelle an ihre Umgebung essentiell sind. Es erfolgte in DCs<sup>-trp</sup> eine verstärkte Induktion des Transkriptionsfaktors CHOP, der durch die Stresssignalwege in Folge von Aminosäuremangel und durch fehlgefaltete bzw. ungefaltete Proteine hochreguliert wird. Die Differenzierung, Ausreifung und Vitalität der DCs<sup>-trp</sup> verglichen mit DCs<sup>+trp</sup> ist nicht eingeschränkt, was durch die Expression des DC-Markers CD1a, den Reifungsmarker CD83 und Apoptosetests belegt werden konnte. Erstmals wurde durch trp-Mangel die Hochregulierung des inhibitorischen Rezeptors ILT3 in DCs<sup>-trp</sup> und gleichzeitig eine geringere Expression kostimulatorischer Moleküle gezeigt. Zusätzlich zum tolerogenen Phänotyp (CD80<sub>low</sub> CD40<sub>low</sub>/ ILT3<sup>high</sup>) weisen diese Zellen eine deutlich verminderte Pinozytoseaktivität sowie eine geringere Expression von FcγRII (CD32) auf, welches auf eine eingeschränkte Antigenaufnahme hindeutet. Wie nach dem immunologischen Profil der DCs<sup>-trp</sup> zu erwarten, konnte in einem antigen-spezifischen System mit Tetanus Toxoid eine signifikant geringere T-Zellproliferation durch autologe DCs<sup>-trp</sup> verglichen mit DCs<sup>+trp</sup> gezeigt werden. Durch einen ILT3 neutralisierenden Antikörper wurde die verminderte stimulatorische Kapazität von DCs<sup>-trp</sup> partiell aufgehoben, was auf die funktionelle Bedeutung von ILT3 auf DCs<sup>-trp</sup> schließen lässt. Zudem induzieren autologe DCs<sup>-trp</sup> vermehrt ILT3 abhängig die Expression des regulatorischen T-Zell-Markers Foxp3 in antigen-stimulierten CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>DCs<sup>-trp</sup></sub>) als DCs<sup>+trp</sup> (T<sub>DCs<sup>+trp</sup></sub>). In Suppressionsexperimenten erfolgte durch T<sub>DCs<sup>-trp</sup></sub> verglichen mit T<sub>DCs<sup>+trp</sup></sub> eine stärkere Proliferationsinhibition gegenüber polyklonal- und antigen-stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen. Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass es sich bei der verminderten stimulatorischen Kapazität der DCs<sup>-trp</sup> nicht um einen passiven Effekt des 'Aushungerns' durch trp-Mangel handelt, sondern vielmehr um einen aktiven Suppressionsmechanismus, bei dem ILT3 eine maßgebliche Bedeutung zukommt. Die erhobenen *in vitro* Daten legen nahe, dass die Bildung tolerogener DCs<sup>-trp</sup> und die verstärkte Generierung von regulatorischen T-Zellen durch ein trp-verarmtes Mikromilieu ein bedeutender Mechanismus darstellen könnte, in dem IDO zur Induktion und Aufrechterhaltung von Toleranz beiträgt. Dieser Toleranzmechanismus könnte somit beispielsweise *in vivo* das Ausbreiten einer Entzündung begrenzen und Folgeschäden im Gewebe reduzieren. Er hat damit vermutlich einen entscheidenden Einfluss auf Verlauf und Ausgang der Immunantwort. Die genaue Kenntnis der Mechanismen, die für die *in vitro* Induktion tolerogener DCs verantwortlich sind, könnte eine Basis für therapeutische Ansätze darstellen.





# INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung.....	I
Inhaltsverzeichnis .....	II
<b>1 Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 <i>Immunantwort und Immunmodulation</i> .....	1
1.1.1 Grundlagen des Immunsystems.....	1
1.1.1.1 Die humorale und zelluläre Immunabwehr .....	2
1.1.1.2 Lymphozyten.....	3
1.1.1.3 T-Zellaktivierung .....	4
1.1.1.4 Rolle der dendritischen Zellen bei der Induktion einer Immunantwort .....	6
1.1.2 Immunologische Toleranz .....	9
1.1.2.1 Zentrale Toleranzinduktion im Thymus.....	9
1.1.2.2 Periphere Toleranzinduktion .....	10
1.1.2.2.1 Klonale Deletion und Apoptose .....	10
1.1.2.2.2 Anergie .....	11
1.1.2.2.3 Suppression durch regulatorische T-Zellen.....	12
1.1.2.2.3.1 Natürliche regulatorische T-Zellen .....	15
1.1.2.2.3.2 Induzierbare regulatorische T-Zellen .....	16
1.2 <i>Tryptophan und Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)</i> .....	17
1.2.1 Biologische Bedeutung von IDO: Immuntoleranz.....	21
1.2.2 Induktion des aminosäuresensitiven Signalwegs und ER-Stress .....	24
1.2.3 Suppression durch tolerogene dendritische Zellen .....	26
1.2.3.1 ILT (Immunoglobulin-like transcript) Rezeptoren.....	28
1.2.4 Biologische Relevanz: Tryptophangehalt im Körper .....	30
1.3 <i>Ziel und Fragestellung der Arbeit</i> .....	31
<b>2 Material und Methoden.....</b>	<b>33</b>
2.1 <i>Puffer und Lösungen</i> .....	33
2.2 <i>Chemikalien/Reagenzien</i> .....	36
2.3 <i>Geräte und Verbrauchsmaterial</i> .....	37
2.4 <i>Probanden</i> .....	39
2.5 <i>Zellen, Zellkultur-Medien und Seren</i> .....	40
2.5.1 Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes .....	40
2.5.2 Isolierung von T-Zellen aus peripheren Blut.....	41
2.5.3 Isolierung von Monozyten und T-Zellen aus Leukozytenkonzentrat .....	42
2.5.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen .....	43
2.6 <i>Immunologische Methoden</i> .....	44
2.6.1 Durchflusszytometrische Analyse.....	44
2.6.2 Immunologische Färbungen zur Phänotypisierung der Zellen .....	45
2.6.2.1 Extrazelluläre Immunfärbung .....	45
2.6.2.2 Intrazelluläre Saponinfärbung 0,1 %.....	46
2.6.3 Pinozytoseaktivität unreifer dendritischer Zellen .....	47
2.6.4 Apoptosetest.....	47
2.6.5 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay) .....	48
2.7 <i>Molekularbiologische Methoden</i> .....	50
2.7.1 Isolierung und Quantifizierung von RNA .....	50
2.7.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion.....	50
2.7.2.1 cDNA-Synthese .....	50
2.7.2.2 PCR.....	51
2.7.2.3 Primer.....	51
2.7.2.4 PCR-Reaktionsprofile .....	52
2.7.3 DNA-Nachweis durch Agarose-Gelelektrophorese .....	52

2.8	<i>Proteinchemische Methoden</i> .....	53
2.8.1	Pulse Chase-Analyse .....	53
2.8.2	Herstellung der Zell-Lysate .....	53
2.8.3	Immunpräzipitation .....	54
2.8.4	SDS-Polyacrylamidelektrophorese und Westernblot-Analyse.....	55
2.9	<i>Funktionelle Untersuchungen zur Induktion proliferativer T-Zellantworten</i> .....	56
2.9.1	T-Zell-Proliferationsversuche.....	56
2.9.1.1	Induktion antigen-spezifischer und polyklonaler T-Zellantworten .....	56
2.9.1.2	Blockierungsexperimente mit anti-ILT3.....	57
2.9.1.3	Immunphänotypisierung antigen-stimulierter T-Zellen.....	58
2.9.2	Suppressions-Assays .....	59
2.9.2.1	Suppression antigen-stimulierter T-Zellen .....	59
2.9.2.2	Suppression polyklonal-stimulierter T-Zellen .....	59
2.10	<i>Statistik</i> .....	60
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	<b>61</b>
3.1	<i>Morphologie der DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup></i> .....	61
3.2	<i>Generierung und Reifung myeloischer DCs unter trp-Mangel ist nicht eingeschränkt...</i>	63
3.3	<i>Vitalität und Apoptose der DCs werden nicht durch ein vermindertes trp-Angebot beeinflusst</i> .....	65
3.4	<i>Induktion stressabhängiger Signalwege in DCs unter trp-Mangel</i> .....	67
3.5	<i>DCs<sup>-trp</sup> zeigen einen tolerogenen Phänotyp</i> .....	68
3.6	<i>Die Proteinbiosynthese von Ii, HLA-DM und MHC-II wird nicht durch trp-Mangel eingeschränkt</i> .....	71
3.7	<i>Verminderte Pinozytoseaktivität der DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup></i> .....	73
3.8	<i>Die Zytokinsekretion von DCs wird nicht durch trp-Mangel beeinflusst</i> .....	73
3.9	<i>Trp-Depletion beeinflusst nicht die IDO Proteinexpression der DCs</i> .....	75
3.10	<i>Die T-Zell-stimulatorische Funktion von DCs<sup>-trp</sup> ist eingeschränkt</i> .....	75
3.11	<i>L-Glutamin-Mangel und der Einfluss auf DCs</i> .....	77
3.12	<i>DCs<sup>-trp</sup> zeigen ILT3 abhängig eine verminderte T-Zell-stimulatorische Kapazität</i> .....	78
3.13	<i>Induktion von Foxp3 in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen durch ILT3<sup>high</sup> DCs<sup>-trp</sup></i> .....	80
3.14	<i>Erhöhte Induktion von Foxp3 in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit von ILT3</i> .....	81
3.15	<i>ILT3<sup>high</sup> DCs fördern die Generierung von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen mit regulatorischer Funktion</i> .....	82
<b>4</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>85</b>
4.1	<i>Übersicht der Hauptergebnisse</i> .....	87
4.2	<i>Wird die Differenzierung der Monozyten zu DCs und deren Reifung durch den trp-Mangel beeinflusst?</i> .....	88
4.3	<i>Weisen DCs unter trp-Mangel eine stärkere Anfälligkeit gegenüber Apoptose auf?</i> .....	90
4.4	<i>Wird der induzierbare aminosäuresensitive GCN2 Signalweg in Folge des geringeren trp-Angebots in DCs aktiviert?</i> .....	91
4.5	<i>Führt ein geringes trp-Angebot während der Differenzierung zu einer phänotypischen Veränderung dieser Zellen?</i> .....	92
4.6	<i>Werden in Folge der trp-Depletion Antigenaufnahme, -Prozessierung und -Präsentation von DCs beeinflusst?</i> .....	96
4.7	<i>Ist die stimulatorische Funktion der DCs<sup>-trp</sup> gegenüber T-Zellen eingeschränkt?</i> .....	98

---

4.8	<i>Führt die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Antigen durch ILT3<sup>high</sup> DCs<sup>-trp</sup> zur Generierung von T-Zellen mit regulatorischer Funktion?</i> .....	99
4.9	<i>Schlussfolgerung</i> .....	102
<b>5</b>	<b>Literatur</b> .....	<b>105</b>
<b>6</b>	<b>Anhang</b> .....	<b>129</b>
6.1	<i>Abkürzungen und Zeichen</i> .....	129
6.2	<i>Antikörper</i> .....	133
<b>7</b>	<b>Danksagung</b> .....	<b>134</b>
<b>8</b>	<b>Erklärung</b> .....	<b>137</b>
<b>9</b>	<b>Curriculum Vitae</b> .....	<b>139</b>
<b>10</b>	<b>Publikationsliste</b> .....	<b>141</b>



# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Immunantwort und Immunmodulation

Der Organismus muss sich ständig gegenüber einer Vielzahl von potenziell infektiösen Mikroorganismen wie Viren, Bakterien, Pilze oder Parasiten verteidigen. Auf eine Infektion mit einem Krankheitserreger reagiert der Körper mit einer sehr komplexen Abwehrreaktion von verschiedenen Effektorzellen und Effektormolekülen, die als Immunantwort bezeichnet wird. Das Immunsystem (lat.: *immunis* = frei, unberührt) von Vertebraten ermöglicht die Erkennung und gezielte Eliminierung von Pathogenen sowie veränderten körpereigenen Zellen. Um diese Aufgabe erfüllen zu können, ist es von großer Bedeutung, dass es körpereigene von körperfremden Strukturen (Antigene) bzw. 'ungefährlich' von 'gefährlich' unterscheiden kann (Geenen et al., 2001).

Unter pathologischen Bedingungen kann es zu unerwünschten adaptiven Immunantworten gegenüber nichtinfektiösen Antigenen kommen, die drei Arten von medizinischen Problemen verursachen: Allergien, Autoimmunität und Transplantatabstoßung. Immunreaktionen regulieren zu können d.h., sie zu unterdrücken wenn sie unerwünscht sind, oder sie bei Krankheiten zu stimulieren, die sich heute noch weitgehend der Immunabwehr entziehen (z.B. onkologische Erkrankungen, HIV = *human immunodeficiency virus*), ist einer der wichtigsten medizinischen Ziele der immunologischen Forschung. Die Unfähigkeit des Immunsystems auf ein Antigen zu reagieren wird als immunologische Toleranz bezeichnet und erfordert wie die Immunantwort auch eine präzise Regulierung, weil die Konsequenzen den ganzen Organismus betreffen können (Infektionen oder Autoimmunität). Bei der Immunantwort und der immunologischen Toleranz handelt es sich um sehr komplexe Vorgänge, und der derzeitige Forschungsstand ist noch weit davon entfernt ein einheitliches Bild zu liefern. Im Rahmen dieser Arbeit war ein Element des Immunsystems von besonderer Bedeutung: die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) - vermittelte Tryptophan-Depletion als immunmodulatorischer Mechanismus. In den folgenden Kapiteln werden zunächst die Grundlagen des Immunsystems beschrieben, bevor näher auf die immunologischen Toleranzmechanismen eingegangen wird.

### 1.1.1 Grundlagen des Immunsystems

Das Immunsystem des Menschen wiegt etwa 2 kg und zählt somit zu den größten Organsystemen im menschlichen Körper. Das angeborene (unspezifische) Immunsystem dient der ersten Abwehr. Im Gegensatz zum adaptiven (erworbenen) Immunsystem fehlt der angeborenen Immunität die Fähigkeit Krankheitserreger spezifisch zu erkennen und einen gezielten Schutz gegenüber einer erneuten Infektion mit demselben Mikroorganismus zu entwickeln. Die angeborenen Abwehrmechanismen setzen sofort ein und verhindern, dass sich eine Infektion etabliert bzw. halten sie so lange unter Kontrolle, bis sich eine adaptive Immunantwort ausgebildet hat. Nur infektiöse Mikroorganismen,

welche diese erste Verteidigungslinie der Immunabwehr überwinden, lösen eine adaptive Immunantwort aus, bei der langlebige Gedächtniszellen entstehen, so dass in vielen Fällen eine lebenslange Immunität gegen ein Pathogen erworben wird (Tanchot et al., 1997; Sprent & Surh, 2002).

Sowohl die angeborene Immunität als auch die adaptive Immunantwort basieren auf den Reaktionen von Leukozyten (weißen Blutzellen) die fortlaufend aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet werden. Die angeborene Immunität wird hauptsächlich durch natürliche Killerzellen, Makrophagen, Granulozyten, Monozyten, dendritischen Zellen (DCs) und das Komplementsystem vermittelt. Die Erkennung der Pathogene basiert dabei hauptsächlich auf evolutionär konservierten Strukturen (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) über Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs), die in der Keimbahn kodiert sind, wodurch ihre Spezifität genetisch festgelegt ist. Zu den wichtigsten Vertretern der PRRs zählt die Familie der *Toll-like* Rezeptoren (TLR), die PAMPs wie beispielsweise Lipopolysaccharide (LPS) oder doppelsträngige RNA von Viren (Polyinosin-Polycytidylsäure; Poly(I:C)), erkennen (Mazzoni & Segal, 2004). Die angeborene Immunität ist eine notwendige Voraussetzung für die adaptive Immunantwort, da die antigen-spezifischen Lymphozyten der adaptiven Immunantwort durch kostimulatorische Moleküle aktiviert werden, die auf Zellen des angeborenen Immunsystems im Verlauf ihrer Interaktion mit Mikroorganismen induziert werden. Daher resultiert eine effektive Immunantwort immer aus wirkungsvollen Interaktionen zwischen angeborener und adaptiver Immunität.

### 1.1.1.1 Die humorale und zelluläre Immunabwehr

Die Reaktionen des Immunsystems werden unterteilt in die humorale und die zelluläre Abwehr. Bei der humoralen Abwehr sind die Effektoren, die gegen ein Pathogen wirken, lösliche Moleküle (lat.: *humor* = Flüssigkeit). Die humorale Immunabwehr wird durch aktivierte B-Lymphozyten vermittelt, welche lösliche Antikörper mit hoher Spezifität gegen ein bestimmtes Pathogen sezernieren. Ein weiterer Bestandteil der humoralen Abwehr ist das Komplementsystem. Es handelt sich dabei um eine Reihe von Plasmaproteinen, welche verschiedene Aufgaben erfüllen (Verstärkung von Phagozytose, Chemotaktik, Lyse von Pathogenen).

Die zelluläre Abwehr ist dadurch gekennzeichnet, dass die Zellen ihrerseits die Effektoren gegen das Pathogen sind. Sie wird vor allem getragen von T- und B-Lymphozyten sowie von antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie DCs oder Makrophagen. Die Wirkungsweise der verschiedenen Zellen ist dabei unterschiedlich: entweder unterstützen oder aktivieren sie andere Zellen durch die Sekretion von Zytokinen, wie am Beispiel der T-Helferzellen oder sie lysieren infizierte Körperzellen direkt, um eine Vermehrung von Krankheitserregern zu verhindern (zytotoxische T-Zellen und Makrophagen).

### 1.1.1.2 Lymphozyten

Lymphozyten werden in B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen) unterschieden und entstehen im Knochenmark aus einer gemeinsamen lymphoiden Vorläuferzelle. Während B-Zellen im Knochenmark ausdifferenzieren, wandern T-Zellen zu ihrer Reifung in den Thymus. Reife T-Zellen sind solche, die einen T-Zell-Rezeptor (TCR) entwickelt haben. Reife naive T-Zellen (die noch keinen Kontakt mit ihrem spezifischen Antigen gehabt haben) werden in den Blutkreislauf entlassen und patrouillieren fortan kontinuierlich zwischen dem Blut und peripheren lymphatischen Geweben, so dass seltene antigen-spezifische T-Zellen ihrem Antigen auf einer APC begegnen.

B- und T-Zellen exprimieren auf ihrer Oberfläche Antigen-Rezeptoren, die aus variablen und konstanten Regionen bestehen. Die variablen Regionen der Antigen-Rezeptoren der B- und T-Zellen werden während der Reifung der Zellen durch somatische Rekombination aus verschiedenen Gen-Segmenten zufällig zusammengesetzt, wodurch eine enorme Diversität der Rezeptoren erzeugt wird. Trifft ein naiver Lymphozyt in einem peripheren lymphatischen Organ auf ein passendes Antigen, löst dies seine Aktivierung und Proliferation (klonale Expansion) und damit eine adaptive Immunantwort aus. Aktivierte B-Zellen proliferieren und differenzieren zu Antikörper-sezierenden Plasmazellen. Die Bindung von Antikörpern an Toxine oder Oberflächen-Antigene extrazellulärer Pathogene kann deren Wechselwirkung mit Körperzellen hemmen (Neutralisierung). Weiterhin erleichtert die Bindung an Oberflächen-Antigene extrazellulärer Pathogene (Opsonisierung) deren Aufnahme durch phagozytierende Zellen und aktiviert das Komplementsystem. Einige Bakterien sowie die meisten pathogenen Viren und Parasiten vermehren sich jedoch innerhalb von Zellen, wo sie für Antikörper nicht zugänglich sind. Intrazelluläre Infektionen werden durch die Zell-vermittelte adaptive Immunabwehr bekämpft. Für den Zell-vermittelten Teil der adaptiven Immunität sind die T-Zellen verantwortlich.

Durchflusszytometrisch sind T-Zellen durch den Phänotyp  $CD3^+$  ( $CD = Cluster\ of\ differentiation$ , Zelloberflächenantigene) innerhalb der  $CD45^+$  Leukozyten charakterisiert. Der heterodimere Antigen-Rezeptor der T-Zellen besteht aus einer  $\alpha$ - und einer  $\beta$ -Untereinheit oder seltener einer  $\gamma$ - und einer  $\delta$ -Untereinheit (Davis & Bjorkman, 1988). Wie der Antigen-Rezeptor der B-Zellen (BCR) besitzt auch der T-Zell-Rezeptor (TCR) selbst keine Signalfunktion. Die Signalübermittlung in die Zelle wird durch TCR-assoziierte akzessorische Ketten übernommen. Der TCR-Komplex beinhaltet ferner den CD4 oder den CD8 Korezeptor, welche die T-Zellen in zwei Subpopulationen, die T-Helfer- ( $T_H$ ) und zytotoxischen T-Zellen unterscheiden lassen. Im Gegensatz zum BCR, welcher lösliche Antigene binden kann, erkennt der Antigen-Rezeptor der T-Zellen Antigene nur in Form kurzer Peptide, die an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) gebunden sind. MHC Klasse I Moleküle werden durch den TCR sowie die Korezeptoren CD4 bzw. CD8 gebunden, wobei CD8 an MHC Klasse-I Moleküle, CD4 an MHC Klasse-II Moleküle bindet. Unreife doppelt-positive  $CD4^+ CD8^+$  T-Zellen unterlaufen im Thymus einer positiven Selektion, wenn ihr TCR an MHC Klasse-I- oder MHC Klasse-II Moleküle

bindet, wonach die Expression von CD4 bzw. CD8 supprimiert wird (Amsen & Kruisbeek, 1998). Die Bindung des TCR einer naiven T-Zelle an einen passenden Antigenpeptid/MHC Komplex einer APC löst die Proliferation der T-Zelle und die Differenzierung der Tochterzellen zu T-Effektorzellen aus. CD8<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren in der Regel zu zytotoxischen T-Zellen, deren Hauptfunktion darin besteht, virusinfizierte Körperzellen zu töten. Die zytotoxische Aktivität der Killerzellen wird durch die Freisetzung von Effektormolekülen vermittelt, die zum einen Poren in der Membran der Zielzelle erzeugen und zum anderen Apoptose in der Zielzelle auslösen. CD4<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zunächst zu sogenannten T-Helfer 0 (T<sub>H</sub>0)-Zellen, bevor sie weiter zu T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zellen differenzieren. Ob eine aktivierte T<sub>H</sub>0-Zelle zu einer T<sub>H</sub>1- oder einer T<sub>H</sub>2-Effektor-Zelle differenziert, wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst und soll im nachfolgenden Kapitel näher erläutert werden.

### 1.1.1.3 T-Zellaktivierung

Naive CD4<sup>+</sup> T-Zellen werden durch APCs, insbesondere von DCs in lymphatischen Geweben aktiviert. Bei einer Aktivierung müssen die T-Zellen wieder in den Zellzyklus eintreten und sich schnell teilen um zahlreiche Tochterzellen mit identischem Antigenrezeptor zu bilden. Die T-Zellproliferation und Differenzierung zu bewaffneten T-Effektorzellen wird durch das Zytokin Interleukin-2 (IL-2) gesteuert, welches unter anderem von der aktivierten T-Zelle selbst gebildet wird. Es werden zwei unterschiedliche Signale benötigt, um naive T-Zellen effizient zu aktivieren (Page et al., 1993; Matzinger, 1994). Die Signale, die durch die Interaktion des TCR und des Korezeptors CD4 bzw. CD8 mit dem Antigenpeptid/MHC Komplex ausgelöst werden, sind für die Aktivierung einer ruhenden T-Zelle nicht hinreichend. Für die vollständige Aktivierung einer naiven T-Zelle ist ein zweites kostimulatorisches Signal durch akzessorische Moleküle erforderlich (Page et al., 1993; Matzinger, 1994). Einer der Rezeptoren für kostimulatorische B7 Moleküle (CD80/CD86) der APCs ist CD28, der ebenfalls wie seine Liganden zur Immunglobulin-Superfamilie gehört. Dieser übermittelt durch die Bindung von CD80 und CD86 das zweite wichtige Signal für die T-Zellaktivierung (Linsley et al., 1991; Liu & Janeway, 1992; Janeway & Bottomly, 1994).

Eine wichtige Funktion des kostimulatorischen Signals besteht darin, die Synthese von IL-2 zu fördern. Die Interaktion löst in Verbindung mit der Stimulation des TCR die verstärkte Aktivierung der PI3-Kinase, die Stabilisierung der IL-2 mRNA sowie die Expression der IL-2 Rezeptor  $\alpha$ -Kette (CD25) und anti-apoptotischer Gene aus (Umlauf et al., 1995; Boise et al., 1995; Kane et al., 2001; Appleman et al., 2002). Die  $\alpha$ -Kette des IL-2 Rezeptors bildet zusammen mit der konstitutiv exprimierten  $\gamma$ - und  $\delta$ -Kette einen Rezeptor mit einer höheren Affinität zu IL-2, wodurch die Zelle auf sehr geringe IL-2 Konzentrationen ansprechen kann (Wang & Smith, 1987). Aufgrund der Bindung des Liganden IL-2 an diesen trimere Rezeptor erfolgt der Eintritt der T-Zelle in die G1-Phase des Zellzyklus und die Proliferation.



In den letzten Jahren wurde deutlich, dass es sich bei dem kostimulatorischen Signal nicht ausschließlich um ein singuläres Ereignis handelt, sondern dass die T-Zelle mit ihrer interagierenden APC einen kostimulatorischen Dialog führt, der neben aktivierenden Signalen auch inhibierende Signale beinhaltet. Bei diesem 'Dialog' handelt es sich um einen regulatorischen Prozess, der eine 'angemessene' T-Zellantwort gewährleistet und damit zur Prävention einer Überreaktion von T-Zellen dient. Erkennt eine T-Zelle spezifische Antigene ohne Kostimulation durch den CD28 Rezeptor, oder erhält sie ein koinhibitorisches Signal über das zytotoxische T-Lymphozyten-Antigen-4 (CTLA-4; CD152), so erfolgt nur eine geringe IL-2 Produktion und es kommt nicht zur T-Zellteilung (Fraser et al., 1991; Chen, 2004). Vielmehr werden T-Zellen, die nur über den TCR Signale empfangen apoptotisch oder verfallen in einen nicht-reaktiven Zustand, der als Anergie bezeichnet wird (siehe Kapitel 1.1.2.2.2). Außerdem ist die Produktion anderer Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF- $\beta$  (*transforming growth factor  $\beta$* ) stark reduziert (Chai et al., 1999).

Ist eine naive T-Zelle einmal aktiviert, exprimiert sie eine Vielzahl an Molekülen, die das kostimulatorische Signal erhalten oder modifizieren wie beispielsweise CD40 Ligand (CD40L, CD154) der wie CD40 zu der Tumornekrose-Faktor (TNF)-Familie zählt (Gonzalo et al., 2001). So übermittelt der CD40L über die Bindung an CD40 auf APCs Aktivierungssignale und führt zu einer verstärkten Expression von CD80 und CD86, was die T-Zellproliferation weiter anregt. Inzwischen wurden weitere kostimulatorische Moleküle beschrieben, zu denen auch Zytokine gehören. CD4<sup>+</sup> T-Zellen differenzieren nach ihrer Aktivierung zunächst zu sogenannten T-Helfer 0 (T<sub>H</sub>0)-Zellen, welche die Zytokine IL-2 und IL-4 sowie Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) sezernieren bevor sie weiter zu T<sub>H</sub>1- oder T<sub>H</sub>2-Zellen differenzieren. Ob eine aktivierte T<sub>H</sub>0-Zelle zu einer T<sub>H</sub>1- oder einer T<sub>H</sub>2-Effektor-Zelle differenziert, wird von verschiedenen Faktoren beeinflusst, wobei die Zytokinproduktion von DCs dabei eine bedeutende Rolle spielt. Das Zytokin IL-12 begünstigt die T<sub>H</sub>1-Differenzierung, während IL-4 die Entwicklung von T<sub>H</sub>2-Zellen fördert (Agnello et al., 2003). Die inflammatorischen T<sub>H</sub>1-Zellen sezernieren IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  sowie TNF- $\beta$  und veranlassen Makrophagen dazu, intrazelluläre Bakterien abzutöten. T<sub>H</sub>2-Zellen sind dagegen darauf spezialisiert, B-Zellen zu aktivieren, welche die stimulierenden Zytokine IL-4 und IL-5 sezernieren.

Sobald das Antigen in Folge einer Immunreaktion eliminiert wurde, nimmt die Anzahl der klonal expandierten T-Zellen wieder ab. Bei den zurückbleibenden T-Zellen handelt es sich um langlebige T-Zellen, den sogenannten T-Gedächtniszellen (*memory T-cells*), die bei einem zweiten Kontakt mit dem gleichen Antigen nicht mehr über DCs aktiviert werden müssen. Die Signal-Transduktionsmaschinerie liegt bereits gekoppelt in diesen Zellen vor, was sie dazu befähigt, innerhalb kürzester Zeit direkt B-Zellen oder Makrophagen zu aktivieren. Die Signale oder Mechanismen, die zu einer Differenzierung von T-Gedächtniszellen führen, sind noch weitgehend unklar, jedoch gibt die Literatur starke Hinweise darauf, dass für die Etablierung dieser Zellen die Aktivierung der DCs über die CD40L/CD40 Interaktion erforderlich ist (Williams & Bevan, 2007).

#### 1.1.1.4 Rolle der dendritischen Zellen bei der Induktion einer Immunantwort

Dendritische Zellen gelten als Initiatoren und Modulatoren der Immunantwort, und stellen die Verbindung zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem dar (Steinman, 1991; Epstein et al., 1995; Fujii et al., 2004). Sie wurden erstmalig 1973 von Steinman und Cohn in der Milz von Mäusen beschrieben und erhielten ihren Namen nach ihren langen charakteristischen zytoplasmatischen Ausläufern, den Dendriten (lat.: *dendriticus* = verzweigt). Morphologisch sind DCs als unregelmäßig geformte Zellen mit großen Zellkörpern und langen Dendriten charakterisiert, die zwischen den T-Zellen ein verzweigtes Netzwerk bilden (Steinman & Cohn, 1973; Banchereau & Steinman, 1998; Katsnelson, 2006). DCs sind die potentesten APCs die bekannt sind und initiieren eine deutlich effektivere Immunantwort als andere APCs (Monozyten, Makrophagen oder B-Zellen), da sie ein breites Spektrum an Krankheitserregern und Antigenen aufnehmen, prozessieren und präsentieren können (Lutz & Schuler, 2002; Steinman & Banchereau, 2007; Burgdorf & Kurts, 2008). Sie sind daher die wichtigsten Aktivatoren für naive T-Zellen (Epstein et al., 1995; Guery et al., 1996). Hochaffine antigen-bindende Rezeptoren erlauben eine Antigenaufnahme von hoher Effizienz, so dass es der Zelle gestattet, Antigenpeptide sogar im pico- sowie nanomolaren Bereich zu präsentieren, während andere APCs erst bei einer Antigenkonzentration im mikromolaren Bereich eine effiziente Antigenpräsentation leisten können.

Leukozyten werden fortlaufend aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark gebildet, aus denen sich zwei spezialisierte Typen von Stammzellen, die lymphatische Vorläuferzelle und die myeloische Vorläuferzelle ableiten. Ebenso wie Makrophagen entwickeln sich DCs wie epidermale Langerhans Zellen und interstitielle (dermale) DCs aus den myeloischen Vorläuferzellen des Knochenmarks (Caux et al., 1992; Inaba et al., 1993; Pickl et al., 1996). Die einzelnen Entwicklungsstufen, hier vereinfacht dargestellt, sind bisher noch unklar, aber derzeit Gegenstand intensiver Forschung. So können sich DCs einerseits unter dem Einfluss von GM-CSF und IL-4 aus der myeloischen Zellreihe entwickeln, die gemeinsam oder getrennt von der monozytären Zellreihe verlaufen kann (Reid et al., 1990; Caux et al., 1992; Inaba et al., 1993; Brichard et al., 1993; Sallusto & Lanzavecchia, 1994; Young et al., 1995; Zhou & Tedder, 1996; Pickl et al., 1996; Szabolcs et al., 1996; Chapuis et al., 1997; Randolph et al., 2007a). Andererseits können sich DCs auch aus der lymphoiden Reihe differenzieren (Ardavin et al., 1993; Galy et al., 1995; Maraskovsky et al., 1996; Saunders et al., 1996). Aus lymphoiden Vorläuferzellen des Knochenmarks entwickeln sich unter Einfluss von IL-3 sogenannte lymphoide bzw. plasmazytoide CD123<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> DCs (pDCs) (Banchereau et al., 2000; Galibert et al., 2001).

Nach ihrer Migration aus dem Knochenmark differenzieren die beiden beschriebenen DC-Subtypen im peripheren Blut zu unreifen (immaturen) dendritischen Zellen (iDCs) und wandern in die angrenzenden Organe, um dort die lokale Umgebung nach Krankheitserregern abzusuchen (Liu, 2001). Langerhans Zellen befinden sich vornehmlich in der Haut, während die dermalen DCs in allen Organen vorkommen, um dort Antigene

aufzunehmen. Die pDCs befinden sich in den Tonsillen und patrouillieren im Blut um auf ihre Antigene zu treffen.

Im peripheren Blut beträgt der prozentuale Anteil an DCs nur ca. 0,1 - 0,5 % aller Leukozyten (Fearnley et al., 1997) und deshalb wurde die Rolle der DCs in immunologischen Prozessen erst relativ spät erkannt. Aufgrund dieser geringen Mengen sind direkte Untersuchungen der Zellen *in vitro* problematisch, jedoch erlauben entsprechende Methoden ein relativ einfaches Anreichern von Monozyten aus dem peripheren Blut. Durch die Kombination von GM-CSF und IL-4 lassen sich ausreichende Mengen an unreifen myeloischen DCs aus Monozyten differenzieren (Akagawa et al., 1996). Die so generierten myeloischen DCs wurden in der vorliegenden Arbeit über den membranständigen DC-Marker CD1a charakterisiert (Ziegler-Heitbrock & Ulevitch, 1993; Conti et al., 2008). Sowohl Langerhans Zellen als auch dermale DCs exprimieren den Lipid-präsentierenden Didehydroxymycobactin Rezeptor CD1a (Hunger et al., 2004; Koch et al., 2006). Dieser stellt eine Isoform des Proteins CD1 (auch bekannt als T6) dar, dessen Struktur MHC Klasse-I Molekülen ähnelt. CD1 präsentiert keine Peptide, sondern Glykolipide und Lipide, wie sie unter anderem in der Membran von Bakterien, Viren, Pilzen und Protozoen vorhanden sind. Darüber hinaus werden auch körpereigenen Glykolipide und Lipide präsentiert (Barral & Brenner, 2007).

Im unreifen Zustand zeigen DCs deutlich verkürzte Dendriten, und exprimieren auf der Zelloberfläche wenige MHC Moleküle sowie keine kostimulatorischen Moleküle (CD80, CD86, CD40) (Austyn, 1992; Jiang et al., 1995; Sallusto et al., 1995; Steinman & Swanson, 1995). Unreife DCs sind jedoch in der Lage Antigene aufzunehmen, wobei folgende Mechanismen charakteristisch sind:

- Makropinozytose: mit Hilfe des Rezeptor-unabhängigen Mechanismus wird extrazelluläres Material aufgenommen (Lanzavecchia, 1996; Falcone et al., 2006).
- Rezeptor-vermittelte Endozytose über FcRII-Rezeptoren: Auf diese Weise sind iDCs unter anderem in der Lage Antikörper-Antigenkomplexe zu binden und aufzunehmen (Anderson, 1989; Nimmerjahn & Ravetch, 2007).
- Rezeptor-vermittelte Endozytose über den Mannoserezeptor (Burgdorf et al., 2007): Er führt zur Aufnahme von endogenen Glykoproteinen und mikrobiellen Bestandteilen.
- Phagozytotische Aufnahme von nekrotischen und apoptotischen Zellfragmenten, sowie Aufnahme ganzer Zellen über CD36, avb3 und avb5 Integrine (Albert et al., 1998; Gallucci et al., 1999).

DCs lösen über Signalkaskaden (z.B. die TLR-Signalwege) eine adaptive Immunantwort aus, wenn in einem infizierten Gewebe ein Pathogen aufgenommen wird und/ oder sie durch inflammatorische Signale stimuliert werden (Aliprantis et al., 1999; Brightbill et al., 1999; Cella et al., 1999). Durch die Aufnahme von Antigenen wird die Ausreifung der DCs (mDCs) induziert, wodurch unterschiedliche Prozesse eingeleitet werden, welche die Biologie, im speziellen die Morphologie (Shutt et al., 2000; Al-Alwan et al., 2003; Burns & Thrasher, 2004), das Migrationsvermögen (Randolph, 2001; Gunn, 2003; Randolph et al.,

2005), die Expression von Oberflächenmolekülen (Sallusto et al., 1998; Sozzani et al., 1998), und die Funktion (Steinman, 1991; Banchereau & Steinman, 1998; Ridge et al., 1998) der DCs beeinflusst.

Im Zuge der Reifung kommt es zur Hochregulierung der mit Peptid beladenen MHC Klasse Moleküle. Da T-Zellen kein intaktes Protein erkennen, werden die von APCs aufgenommenen Proteine intrazellulär durch Proteasen zu Peptiden prozessiert und an MHC Klasse Moleküle gebunden auf der Zelloberfläche für T-Zellen erkennbar gemacht. Wie bereits eingangs erwähnt unterscheidet man zwei Klassen von MHC Molekülen (siehe Kapitel 1.1.1.2). MHC Moleküle der Klasse-I (MHC-I) werden von nahezu allen kernhaltigen Zellen des Körpers exprimiert und präsentieren Peptide proteasomal degradiertes, zytosolischer Proteine, die zelleigenen oder pathogenen Ursprungs (intrazelluläre Antigene wie z.B. virale- oder Tumorantigene) sein können (Mellman & Steinman, 2001). Diese Peptide werden über einen sogenannten TAP-Komplex (*transporters associated with antigen processing*) in das Endoplasmatische Retikulum (ER) transportiert, wo die MHC Klasse-I Moleküle mit passenden Peptiden beladen werden. Dagegen werden MHC Klasse-II (MHC-II) Moleküle, mit Ausnahme der Makrophagen-verwandten Mikroglia-Zellen im Gehirn, nur von APCs des Immunsystems exprimiert. MHC Klasse-II Moleküle werden im endo-/lysosomalen Kompartiment mit Peptidfragmenten, die in intrazellulären phagolysosomalen Vesikeln abgebaut werden, beladen und anschließend auf die Zelloberfläche transportiert. Neben zelleigenen können diese Proteine pathogenen Ursprungs sein, die durch APCs phagozytotisch oder endozytotisch aufgenommen wurden (extrazelluläre Antigene) (Mellman & Steinman, 2001; Trombetta et al., 2003).

Zudem bewirkt die Ausreifung der DCs Veränderungen im Zytoskelett, woraufhin das Migrationsvermögen und das Adhäsionsverhalten der Zellen beeinflusst wird (Flores-Romo, 2001; Burns & Thrasher, 2004; Randolph et al., 2007b). Die mDCs wandern schließlich durch die afferenten Lymphgefäße in die T-Zell-reichen Regionen der sekundären lymphatischen Organe, wo sie im Zuge ihrer Reifung die Fähigkeit verlieren Antigene aufzunehmen, da sie die Expression von Molekülen wie beispielsweise Fc-Rezeptoren herunterregulieren. Stattdessen kommt es zur Aufregulierung kostimulatorischer Moleküle, wie der Glykoproteine CD80, CD86 und CD40 (Dilioglou et al., 2003a; Dilioglou et al., 2003b). Des Weiteren wird auf mDCs das membranständige und zur Immunglobulin-Superfamilie zugehörige CD83 Molekül auf der Oberfläche hochreguliert, das unter anderem eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von naiven T-Zellen einnimmt (Prechtel & Steinkasserer, 2007). Daher wurde in dieser Arbeit, der in der Literatur beschriebene Reifungsmarker, CD83 für die Charakterisierung der mDCs eingesetzt (Weissman et al., 1995; Zhou & Tedder, 1995a; Zhou & Tedder, 1995b; Zhou & Tedder, 1996). Zudem werden im ausgereiften Stadium die Dendriten der DCs länger (> 10 µm), wodurch die Zellen ihre charakteristische Struktur annehmen (Banchereau & Steinman, 1998). Im Lymphknoten können mDCs als effektive APCs antigen-spezifische naive T-Zellen über kostimulatorische Signale aktivieren und somit ihrer Hauptaufgabe nachkommen. Wie bereits beschrieben handelt es sich bei der Kostimulation der T-Zellen

um einen komplexen Vorgang, in den aktivierende und inhibitorische Signale involviert sind, deren Summe darüber entscheidet ob und wie das Immunsystem reagiert (Mirshahidi et al., 2001; 2002; Lutz & Schuler, 2002; Martin-Orozco & Dong, 2006). Auch DCs weisen in Abhängigkeit von aktivierenden und inhibitorischen Signalen die auf sie einwirken, eine funktionelle Plastizität auf. Es ist heute weitgehend akzeptiert, dass sogenannte regulatorische oder tolerogene DCs, welche im Kapitel 1.2.3 näher beschrieben werden, Immunantworten modulieren können.

### **1.1.2 Immunologische Toleranz**

Als immunologische Toleranz bezeichnet man die Unfähigkeit des Immunsystems, auf ein Antigen zu reagieren. Eine wichtige Eigenschaft des Immunsystems ist, neben der Toleranz gegenüber körpereigenem Antigen (Selbst-Toleranz), auch die Fähigkeit 'ungefährlich' von 'gefährlich' unterscheiden zu können. Ist dies nicht gegeben, kann die Folge eine Zerstörung von körpereigenem Gewebe (z.B. Autoimmunerkrankungen) sein oder es kann zu allergischen Erkrankungen (z.B. allergisches Asthma, Lebensmittelallergien) kommen. Die Entstehung und Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz in einem sich entwickelnden und reifen Immunsystem wird durch eine Vielzahl unterschiedlicher Mechanismen gewährleistet, die im Thymus aber auch im peripheren lymphoiden und nicht-lymphoiden Gewebe stattfinden. An den zugrunde liegenden immunologischen Vorgängen, die in passive (hauptsächlich Deletion und Anergie) und aktive Toleranzmechanismen (Suppression) unterschieden werden, sind sowohl das lymphatische System mit T- und B-Zellen als auch APCs, insbesondere DCs, beteiligt. Von der zentralen Toleranz, die während der Lymphozytenentwicklung in den zentralen Immunorganen entsteht, wird eine periphere Toleranz unterschieden, die reife Lymphozyten in peripheren Geweben entwickeln.

#### **1.1.2.1 Zentrale Toleranzinduktion im Thymus**

Es ist heute weitgehend akzeptiert, dass im Thymus T-Zelltoleranz gegen ubiquitär vorkommende Zelloberflächenantigene, Serumkomponenten oder Proteine des allgemeinen Zellstoffwechsels erzeugt wird (Klein & Kyewski, 2000). Der Hauptmechanismus der T-Zelltoleranz ist die klonale Deletion autoreaktiver T-Zellen. Aus dem Knochenmark wandern unreife T-Vorläuferzellen in den Thymus ein und kommen dort mit Selbst-Antigenenpeptiden in Kontakt. Über Wechselwirkungen mit Thymusepithelzellen und nicht-lymphatischen Zellen (vorwiegend DCs und Makrophagen) findet die Selektion der T-Zellen statt (Sprent et al., 1988; Schwartz, 1989; Ladi et al., 2006). T-Zellen, deren Rezeptoren eine zu hohe Affinität zu den MHC Molekülen des eigenen Organismus oder zu den präsentierten Eigenpeptiden aufweisen, werden dort deletiert, indem der programmierte Zelltod (Apoptose) eingeleitet wird. Durch diesen Mechanismus, der auch als negative Selektion bezeichnet wird, kommt es zur starken Dezimierung hochaffiner, autoreaktiver Zellen (Sohn et al., 2007). T-Zellen die keine Aktivität bezüglich der präsentierten Antigene und MHC Klasse Moleküle zeigen, erhalten offensichtlich keine

Überlebenssignale und sterben ebenfalls ab. Hingegen erhalten T-Zellen mit mittlerer Affinität zu Selbstantigenen und MHC Klasse Molekülen, Reifungssignale und differenzieren im Thymus zu reifen T-Zellen aus um anschließend in die Peripherie entlassen zu werden (Mariathasan et al., 1999; Bevan, 2007). Dieser Vorgang wird auch als positive Selektion bezeichnet. Die Mechanismen der positiven und der negativen Selektion zeigen, dass für die Induktion und Aufrechterhaltung immunologischer Toleranz die kontinuierliche Anwesenheit von Selbstantigenen erforderlich ist. Deshalb stellt die Effizienz der Antigenprozessierung und Präsentation von Zellen im Thymus einen limitierenden Faktor in der Verfügbarkeit von Selbstantigenen dar. Jedoch führt dies zur Frage, wie Selbsttoleranz gegen Proteine, die nur während bestimmter Entwicklungsstadien oder nur in bestimmten Organen vorkommen, entsteht.

### **1.1.2.2 Periphere Toleranzinduktion**

Einige autoreaktive T-Zellen entgehen der negativen Selektion im Thymus. Vermutlich werden manche Selbstantigene nicht oder nicht in ausreichender Form im Thymus exprimiert (Nossal, 1994). Um in einem solchen Fall den Ausbruch einer Autoimmunerkrankung zu verhindern, aber auch gegenüber nichtpathogenen Antigenen Toleranz zu etablieren, existieren in der Peripherie verschiedene, sich gegenseitig nicht ausschließende Sicherungsmechanismen, die eine T-Zelltoleranz außerhalb des Thymus induzieren und erhalten (Banchereau & Steinman, 1998; Akbar et al., 2007). In den folgenden Kapiteln soll näher auf die unterschiedlichen Toleranzmechanismen zur Induktion peripherer Toleranz eingegangen werden.

#### **1.1.2.2.1 Klonale Deletion und Apoptose**

Apoptose ist ein zentraler Mechanismus zur Eliminierung von Zellen während der Embryonalentwicklung, zur Aufrechterhaltung der Homöostase sowie zur Kontrolle entarteter Zellen und von Funktionen des Immunsystems (Jameson, 2002; Taylor et al., 2008). Ein Mechanismus der peripheren Toleranzinduktion ist der aktivierungsinduzierte Zelltod (*activation induced cell death*, AICD). Autoreaktive T-Zellen, welche wiederholt auf persistierende Antigene (z.B. Selbst-Antigene) treffen, und in diesem Fall kein kostimulatorisches Signal durch die präsentierende Zelle erhalten, werden durch den AICD FAS (CD95)/FasLigand (FasL) vermittelt deletiert. Auch dort, wo Selbstantigene nicht ubiquitär sondern nur in bestimmten Geweben exprimiert werden, wurde periphere Deletion beobachtet (Förster, 1998; Belz et al., 2002). Sollte die T-Zelle doch aktiviert werden, so fehlt ihr in der Regel das entsprechende Chemokin und Zytokinmilieu, welches für gewöhnlich aus der Umgebung und von anderen ebenfalls aktivierten Immunzellen wie den DCs stammt. Die fehlende Versorgung von T-Zellen mit essentiellen Wachstumsfaktoren führt zur Apoptose dieser Zellen, was auch als passiver Eliminierungsmechanismus bezeichnet wird (Ferber et al., 1994; Kurts et al., 1997; Guo & Hay, 1999).

Neben der Deletion autoreaktiver T-Zellen stellt der AICD sicher, dass nach der Eliminierung des Antigens T-Zellklone, die im Rahmen einer Immunantwort expandiert

sind, anschließend wieder dezimiert werden und somit die Homöostase wieder hergestellt wird (Jameson, 2002). Aufgrund der wiederholten Aktivierung der T-Zelle durch ihr spezifisches Antigen wird eine Fas/FasL (CD95L) - abhängige Apoptose induziert (Van et al., 1996). Bei aktivierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgt eine Koexpression der Oberflächenmoleküle Fas und Fas-L, deren Aufeinandertreffen ein apoptotisches Signal erzeugt. Durch die Bildung der Fas/FasL Cluster können über Adapterproteine angesammelte Prokaspasen rekrutiert werden. Anschließend kommt es zur gegenseitigen Aktivierung dieser, woraufhin eine Kaspasenkaskade die Apoptose der Zelle induziert (Dhein et al., 1995; Ju et al., 1995; Hengartner, 2000; Taylor et al., 2008). Jedoch differenzieren einige wenige der CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie B-Zellen zu Gedächtniszellen (Tanchot et al., 1997; Sprent & Surh, 2002). Auch die Zellen immunprivilegierte Gewebe (Kapitel 1.2.3) wie beispielsweise die vordere Augenkammer exprimieren natürlicherweise CD95L, um in einwandernden T-Zellen Apoptose zu induzieren. Dieser Mechanismus stellt sicher, dass das Gewebe nicht durch eine Entzündungsreaktion geschädigt wird (Griffith et al., 1995). Die Expression von CD95L auf Tumorzellen stellt ein weiteres Beispiel für die Toleranzinduktion dar und ist unter anderem für deren ungebremste Expansion verantwortlich.

### 1.1.2.2.2 Anergie

Die Induktion von Anergie in aktivierten T-Zellen stellt neben der Apoptose einen weiteren Mechanismus dar, um die Homöostase nach einer Immunantwort wieder herzustellen (Webb et al., 1990; Moskophidis et al., 1993; Sprent & Webb, 1995). Wie bereits erwähnt werden T-Zellen, die bei der Antigenerkennung in Abwesenheit eines zweiten kostimulatorischen Signals nur über den TCR Signale empfangen, nicht zwangsläufig apoptotisch, sondern verfallen in einen nicht-reaktiven Zustand der als Anergie bezeichnet wird (Schwartz, 2003). Trotz Antigenkontakt werden diese anergen T-Zellen weder apoptotisch noch zeigen sie die erwartete klonale Expansion und Zytokinsekretion. Hieraus wird ersichtlich, dass die Umgebung, in der ein bestimmtes Antigen erkannt wird, entscheidend für die Stimulation oder Anergisierung einer naiven T-Zelle ist.

T-Zellanergie konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* experimentell induziert werden (Jenkins & Schwartz, 1987; Ramsdell et al., 1989; Johnson & Jenkins, 1994; Lombardi et al., 1994; Falb et al., 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die antigen-spezifischen T-Zellen weiterhin vorhanden sind, jedoch weder proliferieren noch IL-2 im gewohnten Maße sezernieren und daher keine systemische Immunantwort auslösen (Gimmi et al., 1993; Johnson & Jenkins, 1994). Die fehlende T-Zellantwort ist somit nicht durch eine Deletion der antigen-spezifischen T-Zellen bedingt. Der Zustand der Anergie kann durch exogene Zugabe von sehr großen Mengen IL-2 aufgehoben werden und scheint auf molekularer Ebene durch eine negative Regulation der IL-2-Gentranskription bedingt zu sein (DeSilva et al., 1996; Li et al., 1996; Bachmann & Oxenius, 2007; Zheng et al., 2008). *In vitro* Untersuchungen konnten zeigen, dass anerge T-Zellen, induziert durch fehlende Kostimulation, die Fähigkeit besitzen die Proliferation anderer antigen-spezifischer T-Zellen über direkten Zell-Zellkontakt zu hemmen. Diese Daten implizieren eine regulatorische Funktion 'anergischer' T-Zellen, woraufhin die Bezeichnung eines nicht-

reaktiven Zustandes der Zellen in diesem Zusammenhang eher unzutreffend erscheint (Lombardi et al., 1994; Taams et al., 1998; Chai et al., 1999; Taams et al., 2000; Akbar et al., 2007) (siehe nachfolgendes Kapitel).

Des Weiteren weisen einige Studien daraufhin, dass der Zustand der T-Zellenergie nicht ausschließlich auf fehlender B7-vermittelter Kostimulation beruhen muss. So konnten nach chronischer Antigenstimulation auch anerge T-Zellen beobachtet werden. Das T-Lymphozyten-Antigen-4 (CTLA-4; CD152), welches ausschließlich auf T-Zellen exprimiert wird, induziert in T-Zellen Toleranz und Anergie und zählt zu den stärksten Inhibitoren der T-Zellaktivierung (Greenwald et al., 2001; Alegre et al., 2001). Nach der B7/CD28-vermittelten T-Zellaktivierung kommt es zeitlich verzögert zur Hochregulierung von CTLA-4, das eine 10-100x höhere Affinität als der CD28 Rezeptor für die B7 Moleküle CD80 und CD86 besitzt und bindet diese daher vorrangig. Infolgedessen wird die aktivierende Signalgebung durch B7/CD28 beeinträchtigt, weshalb aktivierte T-Zellen weniger empfänglich für die Stimulation durch APCs sind (Chambers & Allison, 1999; Schwartz, 2003). Die Signalgebung über CTLA-4 bewirkt die Übermittlung eines negativen Signals in die aktivierte T-Zelle und limitiert die IL-2-Synthese (Parry et al., 2005). Wird die Expression von CTLA-4 gehemmt, so kommt es zu einem massiven Anstieg der T-Zell-Effektorfunktion (Tivol et al., 1995; Waterhouse et al., 1995). Die Bindung von CTLA-4 spielt somit ebenfalls eine entscheidende Rolle bei der Begrenzung proliferativer T-Zellenantworten. Die Interaktion zwischen CTLA-4 und CD80/CD86 hat jedoch nicht nur einen immunsuppressiven Effekt auf die T-Zelle, sondern auch auf die beteiligte APC (Finger & Bluestone, 2002; Fallarino et al., 2003). Zudem konnte auch eine ausgesprochen hohe Expression von CTLA-4 auf Tregs beobachtet werden, wo es eine bedeutende Rolle bei der regulatorischen Funktion dieser T-Zellpopulation einnimmt (Takahashi et al., 2000; Kingsley et al., 2002; Sanchez-Fueyo et al., 2002; Vasu et al., 2004).

### **1.1.2.2.3 Suppression durch regulatorische T-Zellen**

Die Selbst-Toleranz von T-Zellen basiert klassischerweise auf klonaler Deletion und T-Zellenergie. Untersuchungen konnten jedoch zeigen, dass in die Peripherie entlassene autoreaktive T-Zellen durch natürliche regulatorische T-Zellen kontrolliert werden (Sakaguchi, 2005; Schwartz, 2005; Beissert et al., 2006). Beweise für einen aktiven Mechanismus der Selbst-Toleranz (dominante Suppression), zeigen sich in der Tatsache, dass in vielen verschiedenen experimentellen Systemen die Regression spontaner oder auch induzierter Immunkrankheiten (wie z.B. Autoimmunerkrankungen) durch den Transfer von nTregs möglich ist (Sakaguchi et al., 1995; Itoh et al., 1999; Shevach, 2000). Diese Tregs bilden nur einen ausgesprochen kleinen Anteil (<10%) innerhalb der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Population (Sakaguchi, 2000; Shevach, 2002; Akbar et al., 2007).

Neben der bedeutenden Rolle zum Erhalt von Selbst-Toleranz wird Tregs eine wichtige immunmodulatorische Funktion gegenüber Fremdan antigenen oder Allergenen zugeschrieben (Akbari & Umetsu, 2004). Vermutlich sind Tregs an der Toleranz gegenüber



Allergenen, die über die Mukosa des Darms oder über der Lunge aufgenommen werden, zentral beteiligt (Akbari et al., 2001). Auch konnte anhand eines transgenen Mausmodells gezeigt werden, dass Tregs bei der Prävention von EAE (*experimental allergic encephalomyelitis*) verantwortlich sind. Im Kontext der Transplantationsabstoßung rücken Tregs, die alloreaktive T-Zellen des Empfängers inhibieren und dadurch die Transplantatverträglichkeit verbessern, ebenfalls zunehmend in den Vordergrund (Chang et al., 2002; Suci-Foca & Cortesini, 2007).

CD4<sup>+</sup> Tregs werden aufgrund ihres Entstehungsortes in natürlich vorkommende CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs (nTregs), die als eigene Linie während der T-Zell-Differenzierung im Thymus entstehen und induzierbare Tregs (iTregs) unterschieden, die sich aus peripheren CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen entwickeln (Akbar et al., 2007). Es konnte gezeigt werden, dass aus dem Thymus isolierte nTregs einen sehr ähnlichen Phänotyp wie iTregs aufweisen (Itoh et al., 1999). Sowohl iTregs als auch nTregs exprimieren neben CD25 die gleichen Oberflächenmoleküle, wie z.B. CTLA-4, GITR, CD45RB und den Transkriptionsfaktor Foxp3 (Shimizu et al., 2002; McHugh et al., 2002; Akbar et al., 2007). Eine Übersicht der derzeit bekannten Treg-Populationen soll die folgende Tabelle, verändert nach Akbar und Mitarbeitern, liefern (Akbar et al., 2007; Suci-Foca & Cortesini, 2007).

**Tab. 1: Subtypen regulatorischer T-Zellen: Phänotyp, Funktionsmechanismen und Herkunft verändert nach Akbar und Mitarbeitern, 2007.** \*natürliche regulatorische CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen (nTregs) exprimieren überwiegend CD45RO, ein Marker für Gedächtniszellen. Allerdings exprimiert ein geringer Anteil der nTregs CD45RA. Altersbedingt kommt es jedoch zur Dezimierung dieser Zellpopulation, die häufig auch als naive nTregs bezeichnet wird. CD45RA<sup>+</sup> nTregs sind bezüglich ihrer Funktion und ihrem Phänotyp weitgehend vergleichbar mit CD45RO<sup>+</sup> nTregs.

Treg-Populationen	Phänotyp	Mechanismus	Herkunft
Natürliche Tregs (nTregs)*	Foxp3 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> GITR <sup>+</sup> CD45RB <sup>low</sup> CD62L <sup>+/-</sup> CD127 <sup>low</sup>	Zell-Zellkontakt, IL-10, TGF-β, CTLA4 und GITR	Thymus
Expandierte nTregs	Foxp3 <sup>+</sup> HLA-DR <sup>+</sup> CD62L <sup>+/-</sup> CD69 <sup>+</sup>	Zell-Zellkontakt	direkte klonale Expansion von nTregs
Induzierte Tregs (iTregs)	Foxp3 <sup>+</sup> CTLA-4 <sup>+</sup> GITR <sup>+</sup> CD45RB <sup>low</sup>	Zell-Zellkontakt und in einigen Fällen TGF-β	Umprogrammierung und/ oder Expansion von nicht regulatorischen CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>-</sup> T-Zellen
T <sub>H3</sub>	Foxp3 <sup>+</sup>	TGF-β und/ oder IL-10	Peripherie
Tr1	Foxp3 <sup>+</sup>	IL-10	Peripherie
CD8 <sup>+</sup> T <sub>S</sub>	Foxp3 <sup>+</sup>	Zell-Zellkontakt, ILT3 und ILT4	Peripherie

Bisher wurden im Zusammenhang mit regulatorischen Funktionen neben CD8<sup>+</sup> Tregs hauptsächlich T-Zellen der CD4<sup>+</sup> Subpopulation beschrieben, da CD4<sup>+</sup> T-Zellen eine

zentrale Funktion für die Aktivierung von DCs, CD8<sup>+</sup> T-Zellen sowie B-Zellen besitzen (Sakaguchi et al., 1995). Diese Tregs werden durch den Transkriptionsfaktor Foxp3 (*forkhead box P3*) und CTLA-4 und zeigen eine geringe CD45RB Expression (Khattari et al., 2003; Akbar et al., 2007; Zheng & Rudensky, 2007; Rudd, 2008). In CD25-, CD122- (IL-2 Rezeptor  $\beta$ -Kette) und IL-2- *Knock-out* Mäuse sowie durch die Neutralisation von IL-2 durch spezifische Antikörper kommt es zur Entwicklung schwerer Autoimmunerkrankungen, die durch den adoptiven Transfer von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs verhindert wird (Malek et al., 2002; Almeida et al., 2002; Turka & Walsh, 2008). Durch diese Studien wurde auch die wichtige Bedeutung von IL-2 für die Entwicklung bzw. Funktion von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs nachgewiesen.

Durch die Entdeckung, dass der Ausfall des Transkriptionsfaktors Foxp3 im Mausmodell und im Humansystem zu Autoimmunreaktionen führt und für inflammatorische Erkrankungen verantwortlich ist, wurde Foxp3 als Marker für Tregs etabliert (Hori et al., 2003; Khattari et al., 2003; Fontenot et al., 2003). Hieraus wird ersichtlich, dass die Expression von Foxp3 entscheidend für die Aufrechterhaltung peripherer Toleranz und der Wiederherstellung der Homöostase nach einer Immunreaktion ist. Des Weiteren konnte in Versuchen mit CD28 *Knock-out* Mäusen und mittels Blockade von CD28 durch CTLA-4 gezeigt werden, dass Interaktionen zwischen CD28 und CD80/CD86 eine entscheidende Rolle bei der Entstehung von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs im Thymus und in der Peripherie spielen (Salomon & Bluestone, 2001; Tang et al., 2003). Weitere Moleküle, die ebenfalls im Zusammenhang mit Tregs beschrieben werden, sind GITR (*glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor*), ein zu der TNF-Superfamilie zählender Rezeptor (Shimizu et al., 2002; McHugh et al., 2002; Grohmann et al., 2007) und das Integrin  $\alpha_E\beta_7$  (CD103) (Lehmann et al., 2002). Die Expression von Integrinen auf Tregs scheinen eine wichtige Rolle bei ihrer Migration in das Zielgewebe wie beispielsweise der Haut zu spielen (Suffia et al., 2005).

Diskutiert wird derzeit, ob Tregs ihre Wirkung über direkten Zell-Zellkontakt oder über die Sekretion von löslichen anti-inflammatorischen Zytokinen wie z.B. IL-10 oder TGF- $\beta$  ausüben. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen benötigen zur Entfaltung ihrer suppressiven Funktion offensichtlich Antigen- sowie Zell-Zellkontakt und IL-2 in ihrer Umgebung, jedoch sezernieren sie kein IL-2 (Shevach, 2000; Hori et al., 2003; Turka & Walsh, 2008). Weiterhin konnte gezeigt werden, dass Zytokine wie TGF- $\beta$  (Davidson et al., 2007) oder IL-10 einen regulatorischen Effekt gegenüber T-Zellen besitzen. Dabei inhibiert TGF- $\beta$ 1 die Proliferation der Lymphozyten und IL-10 hemmt die Aktivierung von Makrophagen und die Expression von Kostimulatoren (Mosmann et al., 1991; Wahl, 1994; Buer et al., 1998). Diese inhibitorischen Zytokine schränken die klonale Expansion spezifischer Lymphozyten ein und lassen aktivierte Makrophagen und andere inflammatorische Zellen in ihren Ruhezustand zurückkehren.

### 1.1.2.3.1 Natürliche regulatorische T-Zellen

Die ursprünglich 1995 von Sakaguchi et al. beschriebenen CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> nTregs wurden erstmals von Jonuleit und Mitarbeitern im Humansystem beschrieben (Sakaguchi et al., 1995; Jonuleit et al., 2001; Dieckmann et al., 2002). CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> nTregs entstehen wie bereits erwähnt während der Differenzierung von Thymozyten. Welche Signale im Thymus jedoch darüber entscheiden, ob ein T-Zellvorläufer sich zu einer regulatorischen oder reaktiven T-Zelle entwickelt, ist weitestgehend unbekannt. Vermutlich führt die hochaffine Bindung an bestimmte Selbstpeptide dazu, die Differenzierung von T-Zellen mit autoreaktiven TCR zu CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> nTregs einzuleiten (Bensinger et al., 2001; Picca & Caton, 2005; Picca et al., 2006). Neben den genannten Markern für Tregs werden ebenfalls die Expression von CD69 und CD62 Ligand (L-Selectin) sowie eine niedrige Expression von CD127 ( $\alpha$ -Kette des IL-7-Rezeptors) im Zusammenhang mit nTregs beschrieben (Akbar et al., 2007).

CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> nTregs supprimieren *in vitro* die Aktivierung und Proliferation von naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen über einen Zell-Zellkontakt abhängigen Mechanismus (Shevach, 2000; Hori et al., 2003). *In vitro* befinden sich nTregs in einem Zustand der Anergie, in dem sie trotz Antigenkontakt über MHC Klasse-II Moleküle weder apoptotisch werden noch die erwartete klonale Expansion und Zytokinsekretion zeigen (Sakaguchi et al., 1995; Itoh et al., 1999; Shevach, 2000; Shevach, 2001; Hori et al., 2003). Erfolgt jedoch eine CD3/CD28 Stimulation über spezifische monoklonale Antikörper oder eine Behandlung dieser Zellen mit IL-4, kann sowohl der anerge Zustand als auch die Suppressoraktivität der nTregs aufgehoben werden. Es wird angenommen, dass die beobachtete Anergie der Tregs *in vitro* Zell-Zellkontakt abhängig durch die hohe Dichte verursacht wird (Walker et al., 2003a). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass einige TLRs (TLR2 und TLR8) auf nTregs exprimiert werden und, im Falle einer Stimulation, die Treg-vermittelte Immunsuppression verhindern können (Miyara & Sakaguchi, 2007). In der Literatur wird derzeit diskutiert, ob die *in vitro* gewonnenen Daten die *in vivo* Situation widerspiegeln. Im Maussystem konnte gezeigt werden, dass nTregs mit transgenen TCR nach entsprechender Antigenexposition *in vivo* proliferieren können ohne dass ihre suppressive Wirkung beeinträchtigt wird (Yamazaki et al., 2003; Walker et al., 2003b). Obwohl heute die zentrale Entstehung von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> nTregs im Thymus akzeptiert ist, wurde nach den *in vivo* Studien von Walker und Yamazaki bezweifelt, dass dies der einzige Weg ihrer Entstehung ist. Im Rahmen der altersbedingten Thymusinvolution sinkt auch die Zahl an T-Lymphozyten. Daher müsste bei einer ausschließlich zentralen Entstehung die Zahl an CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> nTregs mit der Zeit abnehmen (Akbar et al., 2007). Ungeachtet dessen ist interessanterweise ein altersbedingter Anstieg dieser Zellpopulation zu beobachten (Gregg et al., 2005; Vukmanovic-Stejic et al., 2006). Es gibt derzeit drei Hypothesen zum Erhalt von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs *in vivo*. Zum einen wird die Existenz einer langlebigen nTreg Subpopulation postuliert, die eine erhöhte Resistenz gegenüber Apoptose aufweisen. Die zweite Theorie beschreibt die direkte Expansion von nTregs in der Peripherie. Sowohl *in vivo* also auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass eine Proliferation von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> nTregs trotz ihres anergen Phänotyps möglich ist (Kretschmer et al., 2005). Diese

Proliferation ist jedoch von der Anwesenheit von Zytokinen wie IL-2 abhängig, welche nicht von den Tregs selbst produziert werden können (Yamazaki et al., 2003; Walker et al., 2003b). Drittens unterstützen zahlreiche Studien die Theorie einer Neuentstehung von Tregs aus T-Gedächtniszellen und CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen in der Peripherie nach Antigenpräsentation ohne adäquate Kostimulation (z.B. durch tolerogene DCs, siehe Kapitel 1.2.3) oder durch nTregs vermittelt (Lombardi et al., 1994; Taams et al., 1998; Dieckmann et al., 2002; Manavalan et al., 2003; Akbar et al., 2003; Kretschmer et al., 2005). Diese Zellen werden als induzierbare Tregs (iTregs) oder adaptive Tregs bezeichnet.

#### 1.1.2.2.3.2 Induzierbare regulatorische T-Zellen

CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs können sich unter bestimmten Bedingungen aus naiven CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen entwickeln. So beispielsweise in Anwesenheit von IL-10, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$  oder durch Stimulation dieser Zellen mit myeloischen iDCs, reifen pDCs oder durch ILT2 und ILT3 (*Immunoglobulin-like transcript 3*) positive APCs (Roncarolo et al., 2001; Levings et al., 2001; Levings et al., 2002; Gilliet & Liu, 2002; Adams et al., 2003; Fallarino et al., 2006b; Sharma et al., 2007). Ob der Erhalt von Tregs die Vermehrung durch klonale Expansion beinhaltet, oder ob weitere Tregs durch 'infektiöse Toleranz' aus der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellpopulation rekrutiert werden oder beides wird derzeit in der Literatur diskutiert (Seddon & Mason, 2000; Akbar et al., 2007). Diverse Studien führen zu der Annahme, dass Tregs die Induktion von Toleranz in zwei Stufen kontrollieren: Der erste Schritt beinhaltet einen direkten Zell-Zellkontakt abhängigen Mechanismus, indem nTregs Anergie in CD4<sup>+</sup> T-Zellen auslösen. Diese anergen Zellen mit regulatorischer Funktion (iTregs) vermitteln wiederum Toleranz in einem zweiten Zell-Zellkontakt unabhängigen Schritt über Zytokine und vermitteln somit ihre suppressive Wirkung gegenüber weiteren CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Dieckmann et al., 2002; Jonuleit et al., 2002; Battaglia & Roncarolo, 2004; Suci-Foca & Cortesini, 2007).

Im humanen System konnte im Gegensatz zum Mausmodell gezeigt werden, dass CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Effektorzellen unter bestimmten Umständen wie nach Aktivierung oder durch Gabe von TGF- $\beta$ , Foxp3 exprimieren können (Fu et al., 2004). Jedoch zeigen diese Zellen nicht immer eine regulatorische Funktion (Akbar et al., 2007). Daher wird Foxp3 im Zusammenhang mit Kostimulation als geeigneter Marker für humane Tregs in der Literatur angezweifelt. Jedoch unterstützt die Induktion von Foxp3 in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen nach Aktivierung die Hypothese einer Neuentstehung regulatorischer T-Zellen aus CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen in der Peripherie. Um humane CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> Tregs dennoch von aktivierten CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Effektorzellen diskriminieren zu können ist es zwingend erforderlich, ihren supprimierenden Effekt gegenüber T-Effektorzellen funktionell nachzuweisen (Akbar et al., 2007).

CD4<sup>+</sup> iTregs wie T<sub>H</sub>3- und Tr1-Lymphozyten entstehen im Gegensatz zu nTregs ausschließlich in der Peripherie und vermitteln ihre suppressiven Eigenschaften unter anderem über lösliche Faktoren (IL-10, TGF- $\beta$ ). T<sub>H</sub>3-Lymphozyten entstehen aus naiven T-Zellen nach Antigenpräsentation durch DCs aus der Milz (Everson et al., 1997; Suci-

Foca & Cortesini, 2007). Ihre Suppressoraktivität ist über die Sekretion von TGF- $\beta$  zytokinvermittelt (Chen et al., 1994; Weiner, 2001). Tr1-Lymphozyten werden *in vitro* und *in vivo* in Anwesenheit von IL-10 aus naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen bei Antigenexposition gebildet und produzieren IL-10, IFN- $\alpha$ , TGF- $\beta$  und IL-5 (Levings et al., 2001; Levings et al., 2002; Veldman et al., 2004; Roncarolo et al., 2006). Inwieweit der Zell-Zellkontakt oder die löslichen Faktoren für ihre suppressiven Eigenschaften gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Effektzellen wichtig sind, ist bisher noch ungeklärt (Suciu-Foca & Cortesini, 2007). Zu den iTregs gehören neben CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>, CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>3 und CD4<sup>+</sup> Tr1-Lymphozyten auch verschiedene CD4<sup>-</sup> Subpopulationen (Zhang et al., 2001; Gilliet & Liu, 2002; Chen et al., 2005; Thomson et al., 2006).

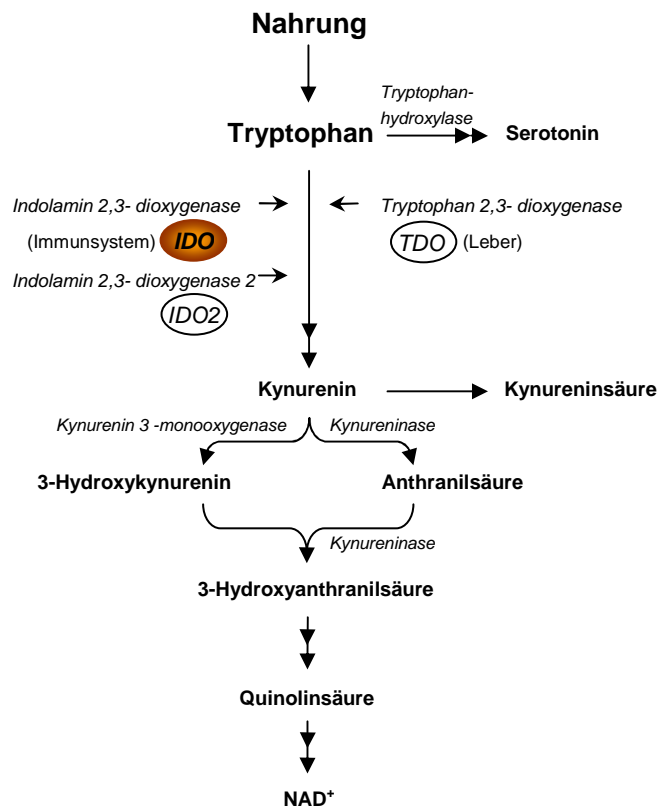
CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Suppressorzellen (T<sub>S</sub>) können *in vitro* durch wiederholte Alloantigenstimulation naiver CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T-Zellen induziert werden (Suciu-Foca & Cortesini, 2007). An Patienten konnte eine alloantigen-spezifische suppressive Funktion dieser Zellen gegenüber allogenen Transplantaten beobachtet werden (Manavalan et al., 2003; Manavalan et al., 2004). Des Weiteren können diese iTregs über einen Zell-Zellkontakt abhängigen, Zytokin-unabhängigen Mechanismus in DCs und Endothelzellen einen tolerogenen Phänotyp induzieren (siehe Kapitel 1.2.3), der sich durch die niedrigere Expression kostimulatorischer Moleküle und die Expression inhibitorischer Rezeptoren wie ILT3 und ILT4 auszeichnet (Chang et al., 2002; Manavalan et al., 2003; Manavalan et al., 2004). Zudem belegen zahlreiche Studien eine weitreichende Bedeutung von APCs bei der peripheren Toleranzinduktion in Zusammenhang mit dem induzierbaren Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), auf das im folgenden Kapitel näher eingegangen werden soll. So konnten in einige Arbeiten der letzten Jahre gezeigt werden, dass Tregs den IDO Mechanismus zur Expansion der eigenen Population nutzen d.h. weitere Tregs in der Peripherie induzieren (Belladonna et al., 2006; Fallarino et al., 2006b; Grohmann et al., 2007).

## 1.2 Tryptophan und Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)

Tryptophan (C<sub>11</sub>H<sub>12</sub>N<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) zählt zu den essentiellen Aminosäuren und stellt biochemisch die energiereichste Aminosäure dar. Definitionsgemäß kann diese nicht vom menschlichen Körper selbstständig synthetisiert werden und muss daher über die Nahrung zugeführt werden. Aufgenommenes Tryptophan (trp) wird dann über die Leber ins Serum des Blutes abgegeben und dient den Zellen des gesamten Organismus als Baustein für die Proteinbiosynthese (Moffett & Namboodiri, 2003). Im Zentralnervensystem wird aus trp der Neurotransmitter Serotonin, und in der Epiphyse (Zirbeldrüse) das für den Tag-Nacht-Rhythmus wichtige Hormon Melatonin synthetisiert (Branchey et al., 1982). Der größte Teil des aufgenommenen trp (ca. 70%) wird über den Kynurenin-Stoffwechselweg in der Leber abgebaut.

Im ersten Schritt des Kynureninweges wird trp in Anwesenheit von Sauerstoff durch Dioxygenasen zu N-Formylkynurenin oxidiert. Es existieren drei Isoenzyme die diese Reaktion katalysieren. In der Leber ist es die von Hepatozyten konstitutiv exprimierte

Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO), die für die Serumkonzentrationen der Aminosäure im Blut verantwortlich ist (Saito et al., 1991). Neben TDO konnte 1963 das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) erstmals beschrieben werden (Higuchi et al., 1963), welches insbesondere im Rahmen einer Immunantwort induziert wird. IDO gehört zu den Hämenzymen und stellt außerhalb der Leber das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Kynureninweges dar (siehe Abb. 1) (Moffett & Nambodiri, 2003). In Anwesenheit von Sauerstoff vermittelt IDO die oxidative Spaltung des Pyrrolringes von trp (Romani et al., 2008). In neueren Studien wurde ein drittes Enzym entdeckt, was aufgrund der genetischen Homologie zu IDO als IDO-2, INDOL1 oder auch proto-IDO (*indoleamine 2,3-dioxygenase-2, indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein, proto-indoleamine 2,3-dioxygenase*) bezeichnet wird (Ball et al., 2007; Yuasa et al., 2007; Metz et al., 2007). Im Maussystem wird IDO-2 in der Niere, der Leber sowie in männlichen und weiblichen Geschlechtsorganen exprimiert und zeigt eine ähnliche enzymatische Aktivität wie IDO. Die genaue biologische Funktion von IDO-2 ist jedoch bisher unbekannt (Ball et al., 2008).

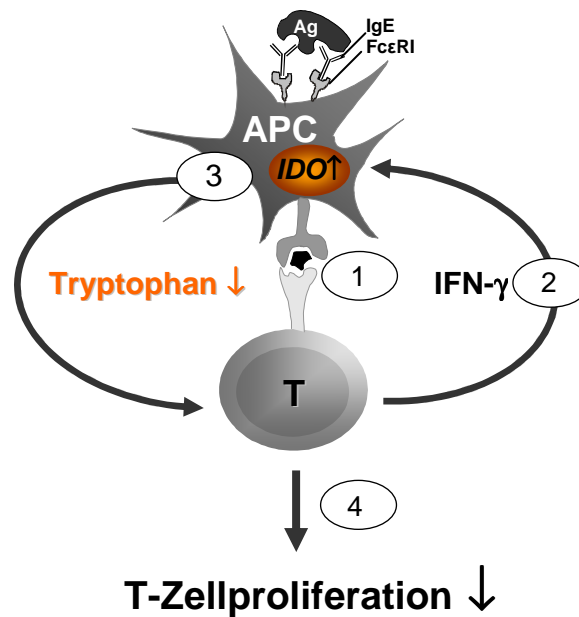


**Abb. 1: Metabolismus der mit der Nahrung aufgenommenen Aminosäure Tryptophan.** Tryptophan (trp) zählt zu den essentiellen Aminosäuren und kann in Vertebraten nur über die Nahrung aufgenommen werden. In der Leber ist die konstitutiv exprimierte Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) für den trp-Abbau verantwortlich und sorgt für die trp Homöostase im Blut. Die Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), wird dagegen im Rahmen einer Immunantwort induziert insbesondere durch das pro-inflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$ . IDO kann zudem beispielsweise durch TLR Stimulation (Poly(I:C), LPS) oder über die Stimulation des hochaffinen Rezeptors für IgE, Fc $\epsilon$ RI in APCs hochreguliert werden. Des Weiteren erfolgt durch Typ1 Interferone sowie durch TNF- $\alpha$  und CD40L die IDO Induktion in APCs. IDO-2 wird in der Niere, der Leber sowie in männlichen und weiblichen Geschlechtsorganen exprimiert und zeigt eine ähnliche enzymatische Aktivität wie IDO. Die genaue biologische Bedeutung von IDO-2 ist jedoch bisher unbekannt.

Während der Degradation von trp über den Kynurenin-Stoffwechselweg entstehen zahlreiche Intermediate wie 3-Hydroxykynurenin, 3-Hydroxyanthranilsäure oder Quinolinsäure mit unterschiedlichen Wirkungen und Funktionen sowie die Endprodukte Nicotinsäureamid-Adenin-Dinucleotid (NAD<sup>+</sup>), Adenosin-5'-triphosphat (ATP) und CO<sub>2</sub>. Auch humane Mikroglia können *in vitro* trp zu Quinolinsäure verstoffwechseln, was das Vorhandensein aller am Kynureninweg beteiligten Enzyme, demnach auch von IDO, voraussetzt (Heyes et al., 1996). Allerdings konnten *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass murine IDO<sup>-</sup> DCs trp-Metabolite aufnehmen und durch 'downstream'-Enzyme verstoffwechseln können (Belladonna et al., 2006). Letztlich führt die Induktion von IDO zu einem intrazellulären sowie extrazellulären Abbau von trp (Munn et al., 1998; Munn et al., 1999)

Da es sich um ein intrazelluläres Enzym handelt, muss die IDO exprimierende Zelle, trp aus dem extrazellulären Raum über einen sogenannte 'L amino acid transporter' (LAT) in die Zelle transportieren (Castagna et al., 1997; Verrey et al., 1999; Kim et al., 2001; Kudo & Boyd, 2001; Zegarra-Moran et al., 2004), was wiederum zu einer Verarmung der Extrazellulärräume an trp führt (Munn et al., 1998). Dieses trp-verminderte Mikromilieu wirkt sich inhibierend auf die Proliferation von T-Effektorzellen aus (Munn et al., 1999; Mellor & Munn, 1999). So konnten *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass der trp-Mangel den Eintritt aktivierter T-Zellen in die G1-Phase des Zellzyklus und somit die Proliferation verhindert. Zudem kommt es in Folge der IDO Aktivität zur Induktion von T-Zellenergie sowie zur Apoptoseinduktion aktivierter T-Zellen wodurch die T-Zell-vermittelte Immunantwort inhibiert wird (Munn et al., 1999; Lee et al., 2002; Fallarino et al., 2002a). Zahlreiche Studien belegen eine weitreichende Bedeutung von APCs bei der Abschaltung von Immunantworten in Zusammenhang mit der Induktion des trp-katabolisierenden Enzyms IDO. Im Mausmodell wurde gezeigt, dass dieser Mechanismus *in vivo* für die T-Zelltoleranz entscheidend ist und zu immunologischer Toleranz gegenüber allogenen Föten führt (Munn et al., 1998). Generell kommt es im Zuge einer Inflammation auch zur Induktion anti-inflammatorischer Mechanismen, um potenziell schädliche Immunantworten, die das Gewebe zerstören können, einzudämmen. So wird IDO insbesondere im Rahmen einer Infektion durch pro-inflammatorische Zytokine induziert (siehe Abb. 2). IFN- $\gamma$  stellt ein gutes Beispiel für die ambivalente Rolle eines pro-inflammatorischen Zytokins in der Toleranzinduktion dar (Takikawa et al., 1990).

IDO kann neben IFN- $\gamma$ , durch IFN- $\alpha/\beta$ , TNF- $\alpha$ , CD40L, Poly(I:C) oder LPS in Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen und DCs induziert werden (Hwu et al., 2000; Currier et al., 2000; Fallarino et al., 2002b; Robinson et al., 2005; Robinson et al., 2006; Scheler et al., 2007). Durch die Stimulation des hochaffinen Rezeptors für IgE, Fc $\epsilon$ RI, wurde in unserer Arbeitsgruppe zudem die Induktion von funktionellem IDO *in vitro* auf Monozyten nachgewiesen (von Bubnoff et al., 2002; von Bubnoff et al., 2003). Darüber hinaus führen anti-inflammatorische Signale wie beispielsweise Dexamethason, ein künstliches Glukokortikoid, über die systemische Induktion von GITR in CD4<sup>+</sup> T-Zellen und GITR Ligand in pDCs zur IDO Induktion. *In vivo* führt Dexamethason zur IDO bedingten Inhibition von T<sub>H</sub>2-Antworten und allergischen Reaktionen (Grohmann et al., 2007).



**Abb. 2: IDO Induktion in APCs am Beispiel der Stimulation des hochaffinen Rezeptors für IgE, FcεRI.** Die Induktion des trp katabolisierenden Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) erfolgt insbesondere im Rahmen einer Immunantwort. Beispielsweise führt die Stimulation des hochaffinen Rezeptors für IgE, FcεRI, auf APCs zur IDO Expression. (1+2) Aktivierte T-Zellen sezernieren daraufhin pro-inflammatorische Zytokin wie IFN-γ, was wiederum autokrin zur IDO Expression in APCs führt. (3+4) Durch die IDO-vermittelte trp-Depletion kommt es zu einer Hemmung der T-Zellproliferation *in vitro*.

Ferner zeigen Arbeiten der letzten Jahre, dass IDO über TLR9 Stimulation (Mellor et al., 2005; Wingender et al., 2006) sowie durch PGE<sub>2</sub> (von Bergwelt-Baildon et al., 2006) und CTLA-4 (Grohmann et al., 2002; Hayashi et al., 2004; Grohmann et al., 2007; Puccetti & Grohmann, 2007), in APCs aktiviert wird. Zudem ist das Zelloberflächen-Glykoprotein CD200 (OX-2) über die Interaktion mit seinem Rezeptor CD200R auf der APC in der Lage, die Expression von IDO in pDCs zu induzieren (Fallarino et al., 2004).

Anhand von *in vivo* Untersuchungen konnte die IDO Induktion durch die Interaktion von CD80/CD86 mit dem immunomodulatorischen Molekül CTLA-4-Ig bei DCs nachgewiesen werden, woraufhin IFN-γ, sezerniert wird was wiederum zur autokrinen Aktivierung von IDO führt (Grohmann et al., 2002; Fallarino et al., 2003). Folglich ist die Blockierung der Kostimulation nicht der einzige Toleranzmechanismus von CTLA-4. Zudem wird CTLA-4 wie bereits beschrieben von Tregs exprimiert. Konstitutiv CTLA-4 exprimierende CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs induzieren über die Interaktion mit CD80/CD86 die IDO Expression auf DCs, wodurch die T-Zellproliferation in Folge der trp-Depletion inhibiert wird (Fallarino et al., 2003). Darüber hinaus sezernieren aktivierte CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs IFN-γ, was zusätzlich zur IDO Expression in DCs führt. Einige Arbeiten der letzten Jahre kommen zu der Annahme, dass Tregs den IDO Mechanismus zur Expansion der eigenen Population nutzen d.h. neue Tregs aus CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen in der Peripherie entstehen (iTregs) (Belladonna et al., 2006; Fallarino et al., 2006b; Grohmann et al., 2007; Hill et al., 2007). Zudem konnte kürzlich gezeigt werden, dass IDO<sup>+</sup> pDCs bereits existierende Tregs aus den



benachbarten Tumor Lymphknoten direkt aktivieren und diese aktivierten Tregs PD-1 (*inhibitory programmed cell death 1*)/PD-Ligand abhängig T-Zellantworten supprimieren (Sharma et al., 2007). Insgesamt implizieren diese Daten einen weiteren Regulationsweg, indemIDO über die Kombination der regulatorischen Funktion von Tregs und DCs zur Toleranzinduktion beiträgt.

Die Aktivierung der Enzymaktivität vonIDO unterliegt verständlicherweise einer vielfältigen Kontrolle, da sie bei konstitutiver Aktivität großen Schaden durch den trp-Verbrauch oder die Unterdrückung einer erwünschten adaptiven Immunantwort anrichten könnte. Es existieren verschiedene Isoformen dieses Enzyms, die vermutlich durch post-translationale Modifikation entstehen. Dabei kommen alternatives Spleißen, die Regulation der Proteinstabilität und Inhibitoren als mögliche Mechanismen in Frage. Ebenso beeinflussen biochemische Faktoren in der Zelle, wie Stickoxide (NO), die Biosynthese des Enzymkofaktors Häm und das Redoxpotential, die Aktivität und Stabilität vonIDO (Mellor & Munn, 2004).

### 1.2.1 Biologische Bedeutung vonIDO: Immuntoleranz

Obwohl das induzierbare EnzymIDO erstmals von Higuchi et al., 1963 im Kaninchendarm beschrieben werden konnte, wurde erst in den letzten Jahren die biologische Bedeutung derIDO Induktion in einem breiteren Spektrum untersucht. Das reife funktionelle Enzym im Zytosol führt wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, zum intrazellulären Abbau der Aminosäure trp. Im Maussystem kommt es nach einer systemischen Inhibition vonIDO im Trophoblast der Plazenta durch den spezifischen Inhibitor 1-Methyl-Tryptophan (1-MT) zur T-Zell-vermittelten Abstoßung allogener Föten (Munn et al., 1998). Des Weiteren wird durch dieIDO Aktivität immunologische Toleranz gegenüber Tumoren, chronischen Infektionen, allergischen- sowie Autoimmunerkrankungen induziert (von Bubnoff et al., 2004; Popov et al., 2006; von Bergwelt-Baildon et al., 2006; Puccetti & Grohmann, 2007; Munn & Mellor, 2007; Scheler et al., 2007; Romani et al., 2008).

IDO<sup>+</sup> DCs wurden in verschiedenen Tumoren nachgewiesen wo sie für die Inhibition der T-Zell-vermittelten Immunantworten verantwortlich sind (von Bergwelt-Baildon et al., 2006). Die Expression vonIDO<sup>+</sup> Tumorzellen stellt ein weiteres Beispiel für die Toleranzinduktion dar und ist unter anderem für deren ungebremste Expansion verantwortlich (Uyttenhove et al., 2003). Dies setzt allerdings voraus, dass T-Zellen sensitiver gegenüber dem anti-proliferativenIDO Effekt sind, was die Daten von Uyttenhove und Mitarbeitern vermuten lassen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dassIDO<sup>+</sup> pDCs bereits existierende Tregs aus Tumor angrenzenden Lymphknoten direkt aktivieren und dieseIDO aktivierten Tregs über die PD-1/PD-Ligand Wechselwirkung T-Zellantworten supprimieren. Es wird daher angenommen, dass die Expression von PD-L eine wichtige Rolle bei der Tumoresistenz spielt (Sharma et al., 2007).

Zudem besteht die biologische Rolle vonIDO, neben der Inhibition von T-Zellproliferationen, in der Suppression mikrobieller Infektionen durch die Verminderung des

trp-Angebots in entzündeten Geweben. So konnte in zahlreichen *in vitro* Arbeiten gezeigt werden, dass die Vermehrung von mikrobiellen Organismen wie *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii* und *Staphylokokkus aureus* in Fibroblasten und Makrophagen in Folge derIDO Aktivität unterdrückt wird (Pfefferkorn & Guyre, 1984; Beatty et al., 1994; Nagineni et al., 1996; Nettelbreker et al., 1998; Däubener & MacKenzie, 1999; Däubener et al., 2001; Schroten et al., 2001). Da trp eine der wichtigsten Aminosäuren für die Vermehrung und Verbreitung von Krankheitserregern darstellt, wird dieser antiparasitäre Effekt zumeist auf die lokale Verarmung an trp zurückgeführt (Däubener & MacKenzie, 1999; Däubener et al., 2001; Chaves et al., 2001). Diese Hypothese wird bis heute kontrovers diskutiert, da einige Bakterien wie der intrazelluläre Parasit *Chlamydophila psittaci* in der Lage sind trp aus Kynurenin herzustellen (Xie et al., 2002). Ob die Induktion vonIDO eher dem Wirt oder dem Erreger Vorteile verschafft, ist zur Zeit Gegenstand wichtiger Diskussionen, denn die trp-Depletion führt gleichzeitig zur Suppression von T-Zellantworten die die potenziellen Krankheitserreger bekämpfen würden. In diesem Zusammenhang konnte am Beispiel der Listeriose erstmals gezeigt werden, dass DCs auch eine Rolle bei granulomatösen Infektionskrankheiten spielen können (Popov et al., 2006). Granulome werden in Folge einer Infektion, die nicht vollständig im Verlauf einer Immunantwort bewältigt werden, als Schutzmechanismus gegenüber den Bakterien vom Körper gebildet. So konnte eine starke TNF- $\alpha$  bedingteIDO Induktion bei den infizierten DCs der Granulome gezeigt werden. Die Hemmung vonIDO durch eine TNF- $\alpha$  Blockade in DCs führt zur T-Zell-vermittelten Zerstörung vom Granulom und zum Ausbruch der Listerien, was sich negativ auf den Wirt auswirkt.

Die Bildung von zytotoxischen Reaktionsprodukten als Folge derIDO Aktivität wird neben der trp-Verarmungstheorie als weiterer Regulationsweg diskutiert (Terness et al., 2002; Frumento et al., 2002; Fallarino et al., 2002a; Bauer et al., 2005). Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass der humane Immundefizienz Virus (HIV) denIDO Mechanismus nutzt um einer Immunantwort zu entgehen (Schroecksadel et al., 2007). Studien an HIV positiven AIDS (*acquired immuno deficiency syndrom*) - Patienten mit einer Enzephalopathie zeigten eine geringere trp-Konzentration in der Gehirnflüssigkeit (*Liquor cerebrospinalis*) als bei nicht infizierten Patienten. Gleichzeitig konnten erhöhte Konzentrationen an Kynurenin und Quinolinsäure nachgewiesen werden (Heyes et al., 1992; Sei et al., 1995; Heyes et al., 1998), wobeiIDO exprimierende Zellen als Mikroglia und Makrophagen identifiziert wurden (Depboylu et al., 2004). Es wird davon ausgegangen, dass durch das HIV-Virus der Kynureninweg über lange Zeit aktiv ist und daher für die hohen Konzentrationen von Quinolinsäure verantwortlich ist (Heyes et al., 2001). Im Mausystem konnte des weiteren gezeigt werden, dass tolerogeneIDO exprimierende DCs über trp-Metaboliten die Fähigkeit besitzen, Toleranz auf immunogeneIDO<sup>-</sup> DCs zu übertragen, indemIDO<sup>-</sup> DCs die trp-Metaboliten aufnehmen und diese zu Quinolinsäure verstoffwechseln (Belladonna et al., 2006). Demzufolge kommt den 'downstream' - Enzymen vonIDO eine wichtige Bedeutung in der peripheren Toleranzinduktion zu. Wie bereits erwähnt wird diese Übergabe der Toleranz von Zellen als infektiöse Toleranz bezeichnet (Roelofs-Haarhuis et al., 2003).

Des Weiteren spieltIDO eine wichtige Rolle bei der Polarisierung von T-Zellantworten. So konnte im Maussystem gezeigt werden, dass trp-Metaboliten in T<sub>H</sub>1 Zellen, jedoch nicht T<sub>H</sub>2 Zellen die Sensitivität gegenüber Apoptose erhöhen (Fallarino et al., 2002a). Daruch wird die Ausbildung einer zellvermittelten Immunantwort unterdrückt und eine T<sub>H</sub>2-Antwort begünstigt. Durch die Stimulation des hochaffinen Rezeptors für IgE, FcεRI, wurde in unserer Arbeitsgruppe zudem die Induktion von funktionellem IDO *in vitro* auf Monozyten nachgewiesen (von Bubnoff et al., 2002; von Bubnoff et al., 2003). Des Weiteren konnte während der Pollenflugzeit bei sogenannten asymptomatischen Atopikern (AA) d.h. mit erhöhtem spezifischen IgE gegenüber diversen Aeroallergenen im Blut, ohne klinische Zeichen einer Allergie, eine verstärkte IDO Aktivität im Blutplasma gegenüber symptomatischen Atopikern (SA) nachgewiesen werden. Der gezeigte Zusammenhang der erhöhten IDO Funktion und der Prävention einer Allergiesymptomatik spricht für einen immunmodulatorischen Effekt von IDO bei allergischen Erkrankungen (von Bubnoff et al., 2004). Darüber hinaus führen anti-inflammatorische Signale wie Dexamethason über die systemische Induktion von GITR in CD4<sup>+</sup> T-Zellen und GITR Ligand in pDCs zur IDO Induktion. *In vivo* führt Dexamethason zur IDO bedingten Inhibition von T<sub>H</sub>2-Antworten und zu Hemmung von allergischen Reaktionen (Grohmann et al., 2007).

Unter pathologischen Bedingungen kann es zu Autoimmunreaktionen gegen körpereigene Bestandteile kommen. Einige Arbeiten der letzten Jahre zeigen die Beteiligung von IDO bei Autoimmunerrankungen wie beispielsweise der Multiplen Sklerose (MS) bei der sich das Immunsystem gegen Bestandteile der Myelinschicht des ZNS richtet (Sakurai et al., 2002; Kwizinski et al., 2005). Durch die Infiltration des ZNS mit autoreaktiven T<sub>H</sub>1 Zellen wird über IFN-γ im ZNS die Expression von IDO in residenten Mikroglia oder infiltrierenden Makrophagen induziert (Heyes et al., 1996; Depboylu et al., 2004). Die auf die Infiltrate begrenzte IDO Expression induziert über den trp-Abbau immunregulatorische Mechanismen wie Apoptoseinduktion der infiltrierenden T-Zellen. Zudem konnte von unserer Arbeitsgruppe IDO in der klassischen papulösen Dermatose Lichen ruber planus auf myeloischen DCs nachgewiesen werden (Scheler et al., 2007). Da sich das entzündliche Infiltrat vor allem aus T-Zellen zusammensetzt, wird der Lichen ruber als Autoimmunerkrankung in der Literatur diskutiert. Vermutlich führt IFN-α durch pDCs und IFN-γ sezernierende T-Zellen zur IDO Induktion in myeloische DCs. Dieser selbstregulierende Mechanismus wirkt vermutlich einer chronisch fortschreitenden Entzündung entgegen. Ist die Expression von IDO jedoch gestört, kann es zum Ausbruch von Autoimmunkrankheiten kommen, wie im Fall von NOD (*non-obese diabetic*) Mäusen, die zur Ausbildung von Diabetes neigen. In diesen Tieren ist der intrazelluläre Stat1-Signalweg blockiert, was die Induktion von IDO verhindert (Grohmann et al., 2003).

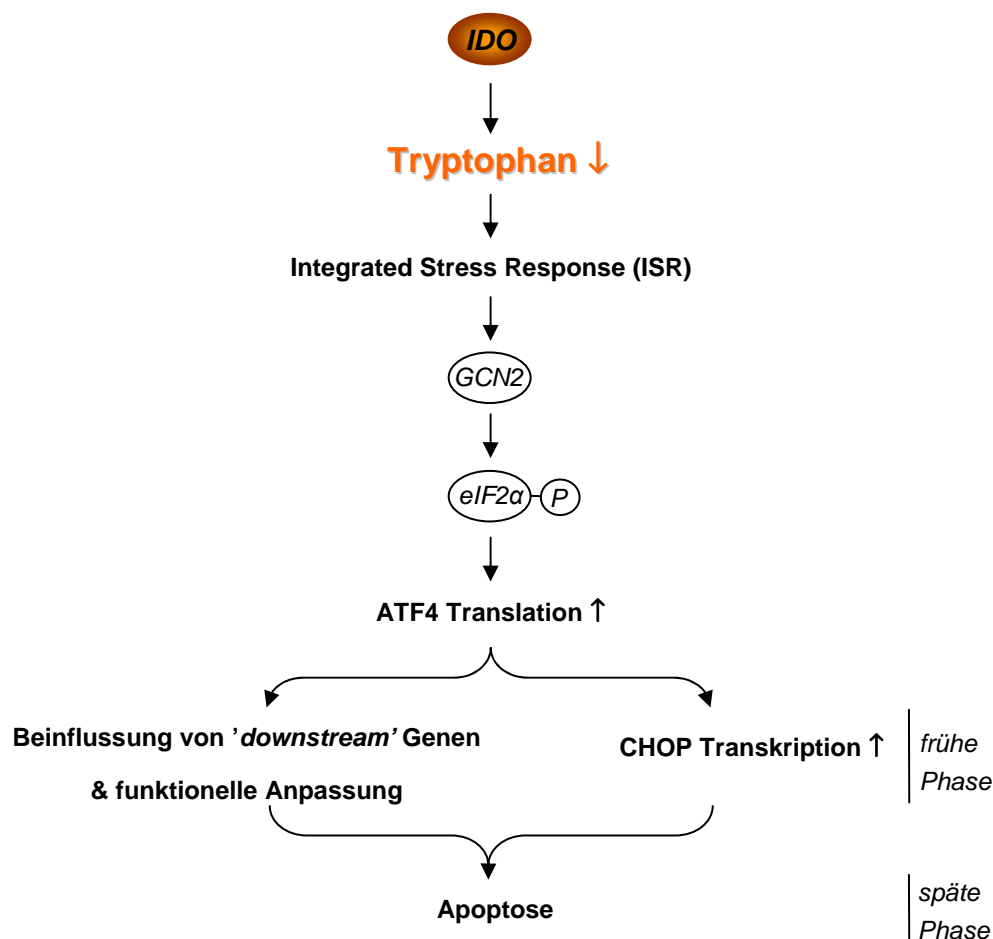
### 1.2.2 Induktion des aminosäuresensitiven Signalwegs und ER-Stress

Bei der 'Unfolded Protein Response' (UPR) und der 'Integrated Stress Response' (ISR) handelt es sich um hochkonservierte Signalwege, die für das Überleben und für die Adaption der Zelle unter Stressbedingungen essentiell sind. Während die UPR durch un- oder fehlgefaltete Proteine des ERs induziert wird, führt ein Aminosäure-Mangel wie nach der trp-Depletion in Folge derIDO Aktivität zur Induktion der ISR durch unbeladene tRNAs. Sowohl die UPR aktivierte PERK Kinsase (*PKR-like endoplasmic reticulum eIF2 $\alpha$  kinase*) als auch die aminosäuresensitive GCN2 Kinase (*general control non-depressing 2 protein kinase*) phosphorylieren den Initiationsfaktor eIF2 $\alpha$  (*eukaryotic translation initiation factor-2 $\alpha$* ). Dies führt zum allgemeinen Translationsstopp bei gleichzeitiger selektiver Translation diverser Gene wie dem Transkriptionsfaktor ATF4 (*activating transcription factor 4-mRNA*). Dieser induziert unter anderem Proteine, die am Aminosäure-Import beteiligt sind, so wie den Transkriptionsfaktor CHOP (*C/EBP homologous protein*) (Fafournoux et al., 2000; Wek et al., 2006; Zhang & Kaufman, 2006). In der frühen UPR werden vorwiegend Gene für ER-Chaperone transkribiert, deren Aufgabe darin besteht die un- oder fehlgefalteten Proteine zu erkennen und zu stabilisieren, sie zurückzufalten oder sie der Degradation zuzuführen. Ist dieser zelluläre Stress durch die ISR und UPR-vermittelten Gegenmaßnahmen nicht zu bewältigen, leitet die Zelle Signalwege ein, die den Zellzyklus arretieren oder zur Apoptose führen (Harding et al., 2003; Breckenridge et al., 2003; Oyadomari & Mori, 2004; Lopez-Lastra et al., 2005; Munn et al., 2005; Zhang & Kaufman, 2006). So wird gewährleistet, dass geschädigte Zellen den Organismus nicht gefährden.

Ein wichtiger Mediator stellt hierbei das CHOP Protein dar, das über verschiedene Mechanismen in die Apoptose führen kann, wobei seine Expression zum Zeitpunkt der frühen Stressantwort jedoch nicht zur Apoptose führt (Maytin et al., 2001; Gotoh et al., 2002; Jäättelä & Tschopp, 2003; Oyadomari & Mori, 2004). Welche zusätzlichen Faktoren in der späten Phase der Stressantwort verantwortlich für die CHOP-vermittelte Apoptose Induktion sind, ist weitgehend unklar. Obwohl CHOP neben dem Aminosäure-Mangel auch durch andere Stressfaktoren wie beispielsweise DNA-Schädigung oder ER-Stress induziert wird, ist seine verstärkte Expression in T-Zellen spezifisch für den GCN2 Signalweg. Durch die Entdeckung, dass der Ausfall der GCN2 Kinase im Mausmodell die trp-Mangel bedingte CHOP Induktion verhindert, wurde CHOP als *downstream* Marker für die GCN2 Aktivierung etabliert (Munn et al., 2005). Weitere Hinweise, dass der Aminosäure-Mangel unabhängig von ER-Stress die Genexpression modulieren kann, liefern Untersuchungen in denen gezeigt werden konnte, dass beide Signalwege unterschiedliche Promotorregionen von CHOP nutzen. Zudem korreliert die Aminosäure-Depletion nicht mit einer verstärkten Expression von ER Chaperonen (Fafournoux et al., 2000).

*In vivo* und *in vitro* wird in T-Zellen aufgrund des IDO bedingten trp-Mangels die aminosäuresensitive GCN2 Protein Kinase aktiviert, woraufhin der Zellzyklus und die Differenzierung von aktivierten T-Zellen beeinflusst wird (Harding et al., 2000; Narasimhan

et al., 2004; Munn et al., 2005). Dieser Stresssignalweg, als grundlegender Mechanismus für die Induktion der peripheren Toleranz von IDO, wird in der Literatur mehrfach diskutiert (siehe Abb. 3).



**Abb. 3: Induktion des GCN2 Stresssignalweges durch Aminosäuremangel verändert nach Munn und Mitarbeiter, 2005.** Unbeladene tRNAs führen zur Induktion eines aminosäuresensitiven Signalweges durch die Aktivierung von GCN2 (*general control non-depressing 2 protein kinase*). Die GCN2 Kinase phosphoryliert den Initiationsfaktor eIF2α (*eukaryotic translation initiation factor 2α*), bei gleichzeitiger selektiver Translation der ATF4 mRNA (*activating transcription factor 4-mRNA*). ATF4 induziert unter anderem den Transkriptionsfaktor CHOP (*C/EBP homologous protein*) und Proteine, die am Aminosäure-Import beteiligt sind. Wird die eingeleitete Stressantwort in Folge des Aminosäuremangels durch diese Gegenmaßnahmen nicht kompensiert, leitet die Zelle in einer späten Phase Signalwege ein, die den Zellzyklus arretieren und die Sensitivität gegenüber einer Apoptose Induktion erhöhen.

In antigen-aktivierten T-Zellen führen die Auswirkungen von funktionellem IDO in Abhängigkeit der GCN2 Aktivierung zur T-Zellangergie sowie zum arretieren des Zellzyklus und somit zur Proliferationsinhibition. Untersuchungen mit GCN2 *Knock-out* Mäusen konnten hingegen keine IDO-vermittelte Suppression der T-Zellantwort

nachweisen. Auch konnte gezeigt werden, dass durch die Kombination der trp-Depletion und der trp-Metaboliten über die Induktion des GCN2 Signalweges, die TCR  $\xi$ -Kette in CD8<sup>+</sup> T-Zellen herunterreguliert und ein regulatorischer Phänotyp in naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert wird. Eine verminderte oder fehlende Expression der TCR  $\xi$ -Kette inhibiert die zytotoxische Aktivität dieser Zellen und wird in diesem Zusammenhang bei verschiedenen malignen Erkrankungen wie Leukämien oder soliden Tumoren beobachtet und daher als ein zentraler Immunevasionsmechanismus diskutiert (Fallarino et al., 2006a).

### 1.2.3 Suppression durch tolerogene dendritische Zellen

Um die Balance der adaptiven Immunantwort zu gewährleisten, sind sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Mechanismen erforderlich. Einige Studien liefern Hinweise darauf, dass DCs neben der Induktion einer T-Zellantwort ebenfalls an der Aufrechterhaltung der peripheren Toleranz beteiligt sind (Banchereau & Steinman, 1998; Belz et al., 2002; Liu et al., 2002; Akbari & Umetsu, 2004). So können DCs Selbstantigene vom Ursprungsgewebe den T-Zellen im drainierenden Lymphknoten präsentieren und infolgedessen gewebsspezifische Toleranz induzieren (Förster, 1998; Belz et al., 2002). Zudem leisten DCs wichtige Beiträge zum Erhalt peripherer Toleranz, durch die Expression von IDO (Mellor & Munn, 2004), die Induktion von T-Zellanergie (Jenkins & Schwartz, 1987) und die Apoptose aktivierter T-Zellen (Rocha & von, 1991), die Verschiebung der Balance der Immunantwort (Akbari & Umetsu, 2004) sowie die Induktion von regulatorischen T-Zellen (Tregs) (Shevach, 2002).

Verantwortlich für die tolerogene (supprimierende) Wirkung sind mehrere Faktoren, so die Expression von FasL (Ju et al., 1995; Alderson et al., 1995; Süss & Shortman, 1996), das exprimierte Zytokinprofil, und die Induktion von Tregs (Mahnke et al., 2003). Insbesondere zeichnen sich die tolerogenen DCs, die auch als regulatorische DCs bezeichnet werden, durch die erhöhte Expression von inhibitorischen ILT (*Immunoglobulin-like transcript*) Rezeptoren aus (siehe Kapitel 1.2.3.1). Die inhibitorischen Vertreter dieser Rezeptoren sind für die Inhibition von Transkriptionsfaktoren wie NF- $\kappa$ B und für die reduzierte Expression kostimulatorischer Moleküle in DCs verantwortlich (Chang et al., 2002) und führen zur Induktion von Tregs (Suciu-Foca & Cortesini, 2007). An Patienten konnte beispielsweise gezeigt werden, dass tolerogene DCs und Tregs die Abstoßung allogener Transplantate verhindern und somit in der Lage sind gemeinsam die Regulation der Immunantwort zu übernehmen (Chang et al., 2002; Botturi et al., 2008).

Derzeit werden zwei Hypothesen bezüglich der Bedeutung von DCs in der Induktion peripherer Toleranz diskutiert. Zum einen wird postuliert, dass alle DCs die Fähigkeit zur Initialisierung von Toleranz und Immunität besitzen, abhängig von ihrem Reife- oder Aktivierungszustand (Lutz & Schuler, 2002), und zum anderen besteht die Hypothese eines spezialisierten regulatorischen DC-Subtyps, der auch im reifen Zustand Toleranz induziert (Suciu-Foca & Cortesini, 2007). In diesem Zusammenhang konnten einige Studien zeigen, dass reife DCs die Toleranz von CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzieren (Akbari et al.,

2001; Menges et al., 2002; McGuirk et al., 2002). Demnach ist die Funktion von DCs in Immunität und Toleranz von mehr als nur ihrem Reifezustand abhängig. Je nachdem, in welchen Subtyp sich DCs auf ihrer Wanderung differenzieren, verfügen sie über ein tolerogenes Potential (Clare-Salzler et al., 1992; Dhodapkar et al., 2001; Menges et al., 2002). Letztendlich ist der DC-Subtyp ausschlaggebend für ihre Wirkung auf die T-Zell-Effektorfunktion und das exprimierte Zytokinprofil (Rissoan et al., 1999; Liu, 2001; Pulendran et al., 2008). Die Entwicklung und Funktion von DCs ist nicht intrinsisch festgelegt und wird auch unabhängig von ihrer Abstammung durch exogene Faktoren bestimmt, denen die Zellen auf ihrer Wanderung begegnen (Banchereau et al., 2000; Morelli & Thomson, 2007). Dazu gehört auch die Ausbildung lokaler Zytokinmilieus, die durch ihren Charakter die Auslösung einer bestimmten Art von T-Zellantwort bestimmen, die entweder von Zellen des  $T_H1$ -Typs, des  $T_H2$ -Typs oder Tregs dominiert wird. Pro-inflammatorische Zytokine der  $T_H1$  Reaktionen fördern in erster Linie die immunogene Präsentation von Antigenen durch DCs (Grohmann et al., 1998; Frucht et al., 2001). Anti-inflammatorische oder immunsuppressive Zytokine hingegen begünstigen die  $T_H2$ -Antwort, welche die tolerogenen Eigenschaften der DCs unterstützen (Link & Xiao, 2001). Die chronische Expression pro-inflammatorischer Zytokine bei verschiedenen Autoimmunerkrankheiten bewirkt jedoch die Ausbildung regulatorischer Eigenschaften der DCs, welche die Autoimmunreaktionen vermindern können. Dies führt zu der Annahme, dass pro-inflammatorische Zytokine, abhängig vom Zeitpunkt, dem Ort und der Stärke ihrer Expression, sowohl verstärkend als auch inhibierend wirken können (Falcone & Sarvetnick, 1999). Generell kommt es im Zuge einer Inflammation zur Induktion anti-inflammatorischer Mechanismen, um potenziell schädliche Immunantworten, die das Gewebe zerstören können, einzudämmen. Die durch  $IFN-\gamma$ -induzierte Expression vonIDO in DCs ist ein gutes Beispiel für die ambivalente Rolle pro-inflammatorischer Zytokine. Indem DCs über die Expression vonIDO dem Mikromilieu die Aminosäure trp entziehen, kommt es zur Induktion von T-Zellanergie sowie zur Apoptose aktivierter T-Zellen und somit zur Toleranzinduktion (Munn et al., 1999; Lee et al., 2002).

Welchen Einfluss tolerogene DCs in einer lokalen Mikroumgebung haben, sei an dieser Stelle am Beispiel von immunprivilegierten Organen veranschaulicht. DCs in Geweben wie dem vorderen Abschnitt des Auges oder der Leber, agieren hier eher in tolerogener Weise (Streilein, 1999; Khanna et al., 2000; Niederkorn, 2007; Mellor & Munn, 2008). Diese Organe zeichnen sich durch die reduzierte Aktivierbarkeit des angeborenen- und adaptiven Immunsystems aus, was als Immunprivileg bezeichnet wird. Der Zustand lokaler Immunsuppression drückt sich in verzögerter oder gänzlich unterdrückter Abstoßung allogener Transplantate in diesen Organen aus (Mellor & Munn, 2008). Eine Sonderstellung kommt der Plazenta (die ein vom Fetus abstammendes Gewebe darstellt) als immunprivilegiertes Organ zu, da das mütterliche Immunsystem den, zur Hälfte aus väterlichen Genen bestehenden und somit immunologisch als allogenes Transplantat zu betrachtenden, Fötus toleriert. Die Theorie der supprimierenden Wirkung vonIDO in der Plazenta gegenüber maternalen T-Zellen ist allgemein in der Literatur akzeptiert (Munn et al., 1998). Weitere immunprivilegierte Organe wie das Gehirn und die Hoden

kennzeichnen sich durch hochgradig differenzierte Gewebe mit relativ geringer Regenerationsfähigkeit aus. Hier stellt die Toleranz gegenüber körperfremden Antigenen (z.B. Virus) einen notwendigen Mechanismus dar, um den Verlust von nicht ersetzbaren Zellen zu verhindern (Harris & Ryan, 1995). Darmassoziierte lymphoide Gewebe (GALT), die durch die lokale Produktion immunsuppressiver Faktoren wie dem tolerogenen Zytokin IL-10 charakterisiert sind, kommt zudem eine wichtige Beutung für die Aufrechterhaltung der Toleranz gegenüber der Darmflora zu (Duchmann, 1997; Duchmann, 1996; Iwasaki, 1999). DCs in der Mukosa fördern bevorzugt die Ausbildung von  $T_H2$ -Antworten, was auf die Interaktionen von T-Zellen und DCs in den mesenterischen Lymphknoten zurückzuführen ist (Alpan, 2001). Auch die DCs des Respirationstraktes zeigen diese Tendenz zur Induktion von  $T_H2$ -Antworten (Koch, 1996; Kalinski, 1997; Isler, 1999).

Es wird hierbei in zunehmendem Maße deutlich, dass APCs, die an der Immunität beteiligt sind, auch zur Aufrechterhaltung peripherer Toleranz beitragen, und ihnen demnach eine bedeutende Funktion zukommt, Immunantworten zu modulieren (Shortman & Heath, 2001; Adler & Steinbrink, 2007). DCs werden somit zu wichtigen Wächterzellen, die abhängig von tolerogenen oder immunogenen Signalen der lokalen Mikroumgebung entscheiden, ob und wie das Immunsystem auf präsentierende Antigenpeptide reagiert. Diese natürlichen Mechanismen werden jedoch von Tumorzellen oder in chronischen pathogenen Erkrankungen genutzt, um einer Immunreaktion zu entgehen (Popov et al., 2006; Munn & Mellor, 2007; Popov & Schultze, 2008). Demnach ist ein genaueres Verständnis bezüglich der Toleranzmechanismen dendritischer Zellen erforderlich, um neue immuntherapeutische Ansätze zu entwickeln; beispielsweise für die Tumor- und Transplantationsforschung oder zur Behandlung von allergischen- sowie von Autoimmunerkrankungen (Adler & Steinbrink, 2007).

### 1.2.3.1 ILT (Immunoglobulin-like transcript) Rezeptoren

Von einer strikten funktionalen Unterscheidung in tolerogene unreife DCs und immunogene reifen DCs kann nicht weiterhin ausgegangen werden, nachdem die Induktion von Tregs durch mDCs *in vivo* gezeigt wurde. Zahlreiche Studien unterstützen die Hypothese, dass mDCs neben immunstimulatorischen Signalen auch über immunsupprimierende Signale verfügen (Lutz & Schuler, 2002; Suci-Foca & Cortesini, 2007). So zeichnen sich tolerogene DCs durch die Expression der erst 1997 entdeckten ILT (*Immunoglobulin-like transcript*; CD85; LIR; MIR) Rezeptoren aus, deren Bindungspartner weitgehend unbekannt sind. Die Struktur der ILTs entspricht grundsätzlich dem Aufbau der Immunoglobulin (Ig)-like Rezeptoren. Die ILTs besitzen meist vier extrazytoplasmatische Ig-like Domänen, wobei ILT3 (CD85k) mit zwei Ig-like Domänen eine Ausnahme bildet. Vermutlich beinhalten diese Ig-like Domänen des ILT3 Rezeptors eine ILT3 Liganden Bindungsstelle, die für die Interaktion zwischen APCs und T-Zellen verantwortlich ist (Suci-Foca & Cortesini, 2007). In der ILT Familie wurden sowohl aktivierende als auch inhibitorische ILTs charakterisiert, die mit den zytoplasmatischen Regulationsmotiven ITAMs (*immunoreceptor tyrosine-based activator motifs*) bzw. ITIMs (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*) assoziiert sind



(Ravetch & Lanier, 2000). ITAMs finden sich unter anderem im zytosolischen Teil der CD3 Untereinheit und ITIMs sind beispielsweise Bestandteile des CTLA-4 Rezeptors. Zu den inhibitorischen ILTs zählen ILT2, ILT3, ILT4 und ILT5 und zu den aktivierenden Vertretern gehören ILT1, ILT7 und ILT8 sowie darüber hinaus ein löslicher ILT Rezeptor (ILT6) (Ravetch & Lanier, 2000). ILT9 und ILT10 sind vermutlich Pseudogene, da bisher keine Transkripte dieser Gene gefunden werden konnte (Torkar et al., 1998).

Alle ILT Rezeptoren werden neben DCs auch von Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen exprimiert und unter bestimmten Bedingungen hochreguliert. In DCs führt die Interaktion mit Tregs oder auch die Stimulation mit IL-10 in Kombination mit IFN- $\alpha$  oder Vitamin D3 zur Hochregulierung von ILT3 (Cella et al., 1997; Manavalan et al., 2003; Suci-Foca et al., 2003; Penna et al., 2005). ILT2 befindet sich zudem auf B-Zellen und Subpopulationen von T- und NK-Zellen. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass ILT2, ILT3 sowie ILT4 nach Stimulation mit HLA (*human leukocyte antigen*)-G auf APCs, T-Zellen und NK-Zellen verstärkt exprimiert wurde (LeMaout et al., 2005).

Die Funktion der inhibitorischen und aktivierenden Vertreter der ILTs ist noch nicht vollständig geklärt. Es wurde jedoch mehrfach in der Literatur beschrieben, dass inhibitorischen ILTs eine wichtige Bedeutung bei der Induktion der Antigentoleranz zukommt (Vlad et al., 2003; Penna et al., 2005). So konnte gezeigt werden, dass regulatorische CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T-Zellen auf Monozyten und DCs eine Hochregulierung der inhibitorischen Rezeptoren ILT3 und ILT4 (CD85j) induzieren, woraufhin diese APCs eine niedrige Expression kostimulatorischer Moleküle aufwiesen. Aufgrund der fehlenden Kostimulation konnten APCs durch die Induktion von T-Zellenergie die Toleranz gegenüber den CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>-Zellen etablieren. Gleichzeitig konnte an Patienten gezeigt werden, dass die Abstoßung eines Transplantats mit der fehlenden Hochregulierung von ILT3 und ILT4 in allogenen DCs einhergeht (Chang et al., 2002). Zudem wurden für ILT2 (CD85j) und ILT4 Interaktionen mit klassischen (HLA-A und -B) und nicht-klassischen (HLA-G, -E, und -F) Klasse-I Molekülen beschrieben. HLA-G und HLA-E werden unter anderem auf den Zellen der Plazenta exprimiert und verhindern vermutlich eine Immunantwort gegen den allogenen Fötus. Für die inhibitorischen ILTs wie ILT2 und ILT4 gibt es Hinweise für eine kompetitive Hemmung der Bindung zwischen MHC Klasse-I Molekülen und CD8, da sie verstärkt an CD8 $\alpha$  binden (Shiroishi et al., 2003). Des Weiteren wurde durch die Stimulation des inhibitorischen ILT2 Rezeptors die Hemmung von Fc $\epsilon$ R-induzierter Serotoninfreisetzung nachgewiesen (Bellón et al., 2002). Kürzlich konnte von Young und Mitarbeitern gezeigt werden, dass unter Einsatz eines anti-ILT2 Antikörpers während der Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten, diese DCs eine Resistenz gegenüber einer CD95L/CD95-vermittelte Apoptose entwickelten. Zudem zeigten diese DCs ein immunsupprimierendes Zytokinprofil und eine verminderte stimulatorische Kapazität gegenüber antigen-stimulierten T-Zellen (Young et al., 2008).

Durch die Aktivierung inhibitorischer ILTs kommt es meist zur Tyrosin-Phosphorylierung der ITIMs durch eine Kinase der Src Familie, wodurch eine Bindungsstelle für

Phosphatasen entsteht (Smith et al., 1998; Ravetch & Lanier, 2000). Inhibitorische Rezeptoren wie ILT2 und ILT3 vermitteln eine Hemmung der Zellaktivierung unter Einbeziehung der Tyrosin Phosphatase SHP-1 (*Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase 1*). Diese Phosphatasen dephosphorylieren ihrerseits Effektormoleküle, wodurch die Signalübertragung durch den NF- $\kappa$ B Signalweg gehemmt oder sogar verhindert wird. So wird aufgrund der ILT2 und ILT3 bedingten Inhibition des Transkriptionsfaktors NF- $\kappa$ B die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD80 und CD86 in APCs gehemmt (Li et al., 1999; Chang et al., 2002; Tone et al., 2002; Ju et al., 2004). Bei dieser negativen Signalleitung handelt es sich bei ILT3 um einen bidirektionalen Prozess, indem ILT3 einerseits über seine intrazelluläre Region APCs tolerogene Signale übermittelt und andererseits durch seine extrazelluläre Region via Ligand aktivierte T-Zellen beeinflusst. Durch die Interaktion mit tolerogenen APCs entwickeln sich *in vitro* aus CD4<sup>+</sup> sowie aus CD8<sup>+</sup> T-Zellen anerge T-Zellen mit regulatorischer Funktion, die wiederum auf anderen APCs ILT3 und ILT4 induzieren können (Manavalan et al., 2003; Suci-Foca et al., 2003; Manavalan et al., 2004; Kim-Schulze et al., 2006). Somit kann die Suppressionskaskade, die auch als infektiöse Toleranz bezeichnet wird, fortgesetzt werden und zum Erhalt der peripheren Toleranz beitragen (Suci-Foca & Cortesini, 2007). Dieser Zustand der T-Zellanergie konnte in Neutralisationsexperimenten partiell unter Verwendung spezifischer monoklonaler Antikörper gegen ILT3 und ILT4 aufgehoben werden, was auf ihre regulatorische Funktion in diesem Zusammenhang hinweist (Chang et al., 2002). Obwohl die Funktion der ILTs noch nicht vollständig geklärt ist, zeigen dennoch die in den letzten Jahren gewonnenen Daten, dass die inhibitorischen Vertreter der ILTs eine wichtige Bedeutung bei der Modulation von Immunantworten einnehmen.

#### 1.2.4 Biologische Relevanz: Tryptophangehalt im Körper

Zahlreiche Arbeiten belegen die Bedeutung von APCs in der Abschaltung von Immunantworten im Zusammenhang mit der Induktion des trp-katabolisierenden Enzyms IDO. In Folge der IDO Aktivität weisen Patienten bei chronischen Erkrankungen wie beispielsweise AIDS, einen geringeren trp-Spiegel in der Gehirnflüssigkeit auf als gesunde Probanden (Heyes et al., 1992; Sei et al., 1995; Heyes et al., 1998; Heyes et al., 2001; Neurauter et al., 2003). Ferner wurden bei Melanompatienten im Vergleich zu gesunden Patienten niedrigere trp-Serumkonzentrationen bei gleichzeitigem Konzentrationsanstieg von Kynurenin gemessen. Der Umstand, dass das Überleben innerhalb der Melanompatienten mit einer geringeren trp-Konzentration korreliert, jedoch nicht mit einem Konzentrationsanstieg von Kynurenin einhergeht, führt zu der Annahme der Autoren, dass eher der trp-Mangel als die Entstehung von Kynurenin für eine Hemmung des Tumorwachstums verantwortlich ist (Weinlich et al., 2007). Des Weiteren konnte in unserer Arbeitsgruppe während der Pollenflugzeit bei asymptomatischen Atopikern mit Sensibilisierung, ohne klinische Zeichen einer Allergie gegenüber symptomatischen Atopikern, ein erhöhter Kynurenin/trp Quotient, demnach eine verstärkte IDO Aktivität im Blutplasma nachgewiesen werden. Der nachgewiesene Zusammenhang der erhöhten

IDO Funktion und der Prävention einer Allergiesymptomatik spricht für einen immunmodulatorischen Effekt von IDO bei allergischen Erkrankungen (von Bubnoff et al., 2004). Der beobachtete Konzentrationsanstieg von Kynurenin bzw. der Abfall von trp im Blut war zwar relativ gering (von Bubnoff et al., 2004; Weinlich et al., 2007), jedoch besteht die Wahrscheinlichkeit, dass im lokalen inflammatorischen Gewebe oder in Organen, in denen Immunantworten reguliert werden (z.B. Milz, oder Lymphknoten), eine stärkere IDO Aktivität erreicht wird.

Da es sich bis heute schwierig gestaltet, das in der trp-Verarmungstheorie postulierte Mikromilieu im Gewebe nachzuweisen, kann diese Hypothese weder bestätigt noch widerlegt werden. Bei der Betrachtung der trp-Verarmungstheorie sollte berücksichtigt werden, dass die Serumkonzentrationen von trp *in vivo* zwischen 50 – 100  $\mu\text{M}$  liegen, so dass es trotz hoher IDO Aktivität fraglich erscheint, dass sich auch bei aktivem trp-Transport und Diffusion geringe trp-Konzentrationen aufrecht erhalten lassen (Moffett & Namboodiri, 2003). Bisher existieren nur wenige Arbeiten zur Bestimmung der trp-Konzentration im Gewebe. Im Mausmodell wurde in einer Studie von Fujigaki und Mitarbeitern die Gewebekonzentration von trp und Kynurenin analysiert. Durch die Infektion von Lungengewebe mit *Toxoplasma gondii* konnte ein erheblicher Konzentrationsabfall von trp bei gleichzeitigem Anstieg der Kynurenin-Konzentration in der Lunge mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) gemessen werden (Fujigaki et al., 2002). Diese *in vivo* Daten zur Konzentrationsbestimmung von trp, die einen im inflammatorischen Gewebe extrem niedrigen trp-Spiegel (ca. 2  $\mu\text{M}$  trp) im Gegensatz zum Kontrollgewebe (ca. 30  $\mu\text{M}$  trp) zeigten (Fujigaki et al., 2002), sprechen durchaus für das postulierte Mikromilieu. Die im Verlauf der letzten Jahre gewonnenen Daten deuten aus physiologischer Sicht ein trp-vermindertes Mikromilieu an und lassen die trp-Verarmungshypothese durchaus wahrscheinlich erscheinen. Insgesamt zeigen die Arbeiten der letzten Jahre, dass der Toleranz-induzierende Effekt von IDO nicht ausschließlich auf einer trp-Degradation beruhen muss. Vermutlich sind verschiedene, sich gegenseitig nicht ausschließende Regulationsmechanismen wie beispielsweise der Entstehung von zytotoxischen Metaboliten sowie der Induktion tolerogener DCs und Tregs, verantwortlich für die immunmodulatorische Wirkung von IDO.

### 1.3 Ziel und Fragestellung der Arbeit

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Auswirkung der IDO-vermittelte trp-Depletion als immunmodulatorischer Mechanismus auf APCs untersucht. APCs spielen eine maßgebliche Rolle beim Abschalten von Immunantworten und entscheiden abhängig von tolerogenen oder immunogenen Signalen der lokalen Mikroumgebung, ob und wie das Immunsystem auf präsentierende Antigenpeptide reagiert. In diesem Zusammenhang könnte eine tolerogene Umgebung, wie die eines trp verarmten Mikromilieus in Folge einer IDO Induktion, einwandernde APCs beeinflussen. Unsere Arbeitshypothese besagt, dass die IDO-vermittelte trp-Depletion zur Induktion tolerogener (suppressiver) DCs führt, die ihrerseits die Entwicklung von Tregs fördern. Diese Suppressorkaskade könnte ein Netzwerk bilden, in dem Tregs zusammen mit tolerogenen DCs interagieren und somit

eine Grundlage für einen effektiven inhibitorischen Rückkopplungsmechanismus der Toleranz schaffen um T-Zellantworten zu kontrollieren. Anhand von *in vitro* Untersuchungen besteht die Möglichkeit, gezielt wichtige Funktionen von DCs zu untersuchen und zu simulieren, wenn diese in Gewebe mit sehr niedriger trp-Konzentration in Folge hoher lokalerIDO Aktivität einwandern. *In vivo* Daten von Fujigaki und Mitarbeitern zeigen, dass dieses postulierte Mikromilieu durchaus möglich ist (Fujigaki et al., 2002).

Die suppressive Auswirkung desIDO bedingten trp-Mangels wurde bisher in der Literatur vorwiegend auf T-Zellen untersucht. Dahingegen existieren derzeit nur wenige Studien über einen Effekt vonIDO auf benachbarte DCs. Hinweise, über einen indirekten Effekt auf dieIDO<sup>+</sup> DCs selbst, geben Versuche im Maussystem, in denen gezeigt werden konnte, dass CD8<sup>+</sup> DCs nach IFN- $\gamma$ -induzierterIDO Expression die antigen-präsentierende Funktion der immunogenen CD8<sup>-</sup> DCs hemmen. Diese tolerogene Wirkung wurde nach einer systemischen Inhibition vonIDO durch den spezifischen Inhibitor 1-MT während der IFN- $\gamma$  Stimulation von CD8<sup>+</sup> DCs aufgehoben (Grohmann et al., 2000). Zudem wurde nachgewiesen, dass tolerogeneIDO exprimierende DCs Toleranz auf immunogeneIDO<sup>-</sup> DCs übertragen, indem diese die sezernierten trp-Metaboliten derIDO<sup>+</sup> DCs aufnehmen und zu Quinolinsäure verstoffwechseln (Belladonna et al., 2006). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass humane DCs nach LPS-induzierterIDO Expression *in vitro* die Expansion natürlicher Tregs stärker fördert, als DCs nach systemischer Inhibition vonIDO (Hill et al., 2007). Nach derzeitigen Kenntnissen liegen jedoch keine wissenschaftlichen Untersuchungen zur Differenzierung myeloischer DCs aus humanen Monozyten unter trp-Mangel vor. Der Schwerpunkt dieser Arbeit lag daher in der Bearbeitung der Frage, inwieweit die trp-Depletion als Suppressionsmechanismus die biologische Funktion von humanen DCs (DCs<sup>-trp</sup>) im Verlauf ihrer Differenzierung *in vitro* beeinflusst. Im Speziellen lassen sich folgende Fragen formulieren:

- a) Wird die Differenzierung der Monozyten zu DCs<sup>-trp</sup> und deren Reifung durch das verminderte trp-Angebot beeinflusst?
- b) Weisen DCs unter trp-Mangel eine stärkere Anfälligkeit gegenüber Apoptose auf?
- c) Wird der induzierbare aminosäuresensitive GCN2 Signalweg in Folge des geringeren trp-Angebots in DCs aktiviert?
- d) Führt der trp-Mangel während der Generierung zu einer phänotypischen Veränderung der DCs?
- e) Werden in Folge der trp-Depletion Antigenaufnahme Prozessierung und Präsentation von DCs beeinflusst?
- f) Ist die stimulatorische Funktion der DCs<sup>-trp</sup> gegenüber T-Zellen eingeschränkt?
- g) Führt die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Antigen durch DCs<sup>-trp</sup> zur Generierung von T-Zellen mit regulatorischer Funktion?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Puffer und Lösungen

**Tab. 2: Dextran 8 %.** Das durch Rühren bei 37°C in H<sub>2</sub>O gelöste Dextran wurde autoklaviert.

Reagenz	Volumen
Dextran	8,0 g
NaCl-Lsg. 0,9 %	ad 100 ml

**Tab. 3: NaCl-Lösung 0,9 %.** Die NaCl-Lösung wurde gerührt und anschließend autoklaviert.

Reagenz	Volumen
NaCl	9,0 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Tab. 4: EDTA 0,5 M, pH8.** Der pH-Wert wurde mit 10 N NaOH-Lösung eingestellt und die Lösung gerührt sowie autoklaviert.

Reagenz	Volumen
EDTA	186,1 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Tab. 5: Wasch-Puffer zur Monozyten-Isolierung (1-fach).** Der Puffer wurde gerührt und mit einem Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert.

Reagenz	Volumen
NaCl	9,0 g
BSA	10,0 g
0,5 M EDTA Lösung	3,4 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Tab. 6: Phosphatgepufferte Kochsalzlösung (PBS-Puffer 1-fach), pH 7,3.** Der pH-Wert wurde mit 1M NaOH und 1M HCL eingestellt, die Pufferlösung gerührt und autoklaviert.

Reagenz	Volumen
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (·2H <sub>2</sub> O)	1,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Tab. 7: MACS-Puffer (10-fach), pH 7,3.** Der Puffer wurde mit einem Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert.

Reagenz	Volumen
NaCl	8,0 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (·2H <sub>2</sub> O)	1,5 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,2 g
BSA	5,0 g
0,5 M EDTA-Lösung	10 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Tab. 8: FACS-Puffer (10-fach), pH 7,3.** Der pH-Wert wurde mit 1 M NaOH und 1M HCL eingestellt. Zur Herstellung des 1-fach FACS-Puffers wurden 100 ml 10-fach Puffer und 900 ml ddH<sub>2</sub>O mit einem Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert.

Reagenz	Volumen
NaCl	85,0 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10,7 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (*H <sub>2</sub> O)	4,5 g
NaN <sub>3</sub>	10,0 g
FKS inaktiviert	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Tab. 9: Formaldehyd/PBS-Lösung 4 %.** Die Formaldehyd/PBS-Lösung wurde mit einem Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert.

Reagenz	Volumen
PBS-Puffer	44,6 ml
37% Formaldehyd-Lsg	5,4 ml

**Tab. 10: Glycin 0,1 M/PBS-Lösung.** Die Glycin 0,1 M/PBS-Lösung wurde kurz vor der Färbung frisch angesetzt.

Reagenz	Volumen
PBS-Puffer	10,0 ml
Glycin	0,075 g

**Tab. 11: BSA-NaN<sub>3</sub>-Puffer.** Der Puffer wurde mit einem Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert.

Reagenz	Volumen
PBS-Puffer	200 ml
BSA	1 g
10 % NaN <sub>3</sub>	200 µl

**Tab. 12: Natriumazid-Lösung 10 %.** Die Natriumazid-Lösung wurde mit einem Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert.

Reagenz	Volumen
NaN <sub>3</sub>	1 g
PBS-Puffer	ad 10 ml

**Tab. 13: Saponin-Puffer 0,5 %.** Für die Färbung wurde 0,1 % Saponinpuffer verwendet.

Reagenz	Volumen
BSA-NaN <sub>3</sub> -Puffer	100 ml
Saponin	500 mg

**Tab. 14: Stopp-Puffer 0,5 %.** Nach der Auflösung des NaN<sub>3</sub> durch Rühren wurde der Puffer mit einem Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert.

Reagenz	Volumen
PBS-Puffer	99 ml
FKS inaktiviert	1 ml
NaN <sub>3</sub> 10 mM	65,01 mg

**Tab. 15: Gel Ladepuffer (6-fach).** Der Gel Ladepuffer wurde bei RT aufbewahrt.

Reagenz	Volumen
Bromphenolblau	0,025 g
Xylen Cyanol FF	0,025 g
Ficoll	1,5 g
ddH <sub>2</sub> O	10 ml

**Tab. 16: TAE-Puffer (50-fach).** Der Tris-Acetat-EDTA-Puffer wurde mit einem Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert und bei RT gelagert.

Reagenz	Volumen
Tris	242 g
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	57,1 ml
0,5 M EDTA-Lösung	100 ml
ddH <sub>2</sub> O	ad 1000 ml

**Tab. 17: Trisgepufferte Kochsalzlösung (Tris-Puffer), pH 7,6.** Der pH-Wert der 0,5 M Tris-Stamm-Lösung (60,5 g Tris in 1000 ml ddH<sub>2</sub>O) wurde mit 1 M NaOH und 1 M HCl eingestellt und autoklaviert.

Reagenz	Volumen
0,5 M Tris-Stamm-Lsg	50 ml
0,9 % NaCl-Lösung	950 ml

## 2.2 Chemikalien/Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Firma
Agarose	Invitrogen, Karlsruhe
7-Aminoactinomycin D (7AAD)	Sigma, Taufkirchen
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck, Darmstadt
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit	Invitrogen, Karlsruhe
Dextran 500	Sigma, Taufkirchen
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt
2,5-Diphenyloxazol (DPO)	Roth, Karlsruhe
dNTP	Invitrogen, Karlsruhe
DTT	Invitrogen, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Sigma, Taufkirchen
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma, Taufkirchen
Ficoll Typ 400	Pharmacia, Uppsala, Schweden
FCS (Fötales Kälber Serum)	Cambrex, Verviers, Belgien
Formaldehydlösung 37%	Merck, Darmstadt
Gentamycin	Sigma, Taufkirchen
Glycin	Serva, Heidelberg
Glyzerin	Sigma, Taufkirchen
GM-CSF	Pharma, Nürnberg; Leukine Sargramostim, Berlex Laboratories, Richmond, USA
IL-4	Strathmann Biotech, Hannover
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt
Lymphoprep	AXIS-SHIELD, Oslo, Norwegen
Mausserum	Dianova, Hamburg
2-Mercaptoethanol (Me)	Sigma, Taufkirchen
Methanol	Merck, Darmstadt
1094 Redivue L-[ <sup>35</sup> S] Methionine 5mCi	GE Healthcare AG, Schweiz
Minigel und Minigel-Twin	Biometra, Göttingen
Dinatriumhydrogenphosphat Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (·2H <sub>2</sub> O)	Merck, Darmstadt
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> )	Merck, Darmstadt
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma, Taufkirchen
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma, Taufkirchen
Nonidet P-40 (NP40)	Sigma, Germany
Nycoprep 1.068	AXIS-SHIELD, Oslo, Norwegen



Chemikalien/Reagenzien	Firma
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat (Tween 20)	Sigma, Taufkirchen
Protease-Inhibitoren. Cocktail, Rinderserumalbumin (BSA)	Roche Diagnostics, Mannheim Sigma, Taufkirchen
Random primers	Pharmacia, Uppsala, Schweden
RNasin	Promega, Mannheim
Roti-Block	Roth, Karlsruhe
RPMI 1640 -L-Glutamin, -Tryptophan	Cambrex (Lonza), Verviers, Belgien
RPMI 1640 -L-Glutamin	Cambrex (Lonza), Verviers, Belgien
RPMI 1640 -L-Glutamin	Biochrom, Berlin,
RPMI 1640 -L-Glutamin, -Methionin	Biochrom, Berlin
Salzsäure (37 %)	Merck, Darmstadt
Scintillationsflüssigkeit, Ready Protein	Perkin Elmer, Wellesby, USA
Scintillationswachs, MeltiLex A	Perkin Elmer, Wellesby, USA
Sepharose 4B NJ, USA	Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway
Taq-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Tetanus Toxoid (TT)	Chiron Behring, Marburg,
Tetra-Methyl-Benzidin (TMB)	BioSource, Solingen
N,N,N',N',-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma, Taufkirchen
[ <sup>3</sup> H]-Thymidin, 37 MBq/ml, 1 mCi/ml, 4,0 Ci/mmol	MP-Biomedicals, Heidelberg
Tris-(hydroxymethyl)aminomethan (Tris)	Sigma, Taufkirchen
Trizol	Invitrogen, Karlsruhe
Trypanblau	Biochrom AG, Berlin
Ziegenserum	Dianova, Hamburg

### 2.3 Geräte und Verbrauchsmaterial

Geräte und Verbrauchsmaterial	Firma
Autoklav Varioklav 500 H+P	Labortechnik AG, Oberschleißheim
Autoklavierbeutel (200 x 300)	VWR International, Langenfeld
AutoMACS <sup>®</sup>	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Liquid Scintillation & Luminescence Counter 1450 MicroBeta <sup>™</sup> Trilux	Perkin Elmer (Wallac), Wellesby, USA

Geräte und Verbrauchsmaterial	Firma
Durchflusszytometer FACSCanto	Becton Dickinson, Heidelberg
Eagle-Eye II	Stratagene, Amsterdam, Niederlande
Eismaschine	Ziegra EisMaschinen, Isernhagen
ELISA-Reader (EL800)	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
ELISA-Washer (ELx50)	Bio-Tek Instruments, Bad Friedrichshall
FACS-Röhrchen	Falcon Becton Dickinson, Heidelberg
Fastblot-System	Biometra, Göttingen
FilterMate™ Harvester	Packard, Canberra, Australien
-70°C Gefrierschrank Herafreeze	Heraeus (Kendro), Hanau
Gelkammer	Bio-Rad, München
Glass Fiber Filters	Packard, Canberra, Australien
Easy Tab™ -C Self-Aligning Filters	
Heizblock Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Sample Bag	Perkin Elmer, Wellesby, USA
Scintillationsflüssigkeit, Ready Protein	Perkin Elmer, Wellesby, USA
Scintillationswachs, MeltiLex A	Perkin Elmer, Wellesby, USA
Inkubator	Heraeus (Kendro), Hanau
Kamerasystem Hitachi HV-(20A)	Hitachi
Kryo-Einfriergefäße (1 ml)	Brand, Wertheim
Kühlschrank	AEG, Stockholm
Mikroskop	DMIRD Leica, Bensheim
Mikroskop	Wilovert, Will Wetzlar
Mikrotiterplatten Nunc MaxiSorb	Nunc International, USA
für ELISA (96 Well, Flachboden)	
Mikrotiterplatten (96 Well, Flachboden)	Nunc International, USA
Mikrotiterplatten (96 Well, Rundboden)	Nunc International, USA
Monovetten EDTA (9 ml Volumen)	Sarstedt, Nümbrecht
Monovetten Heparin (9 ml Volumen)	Sarstedt, Nümbrecht
Multi Adapter für S-Monovette®	Sarstedt, Nümbrecht
pH-Meter pH526	WTW, Weilheim
Photometer GeneQuant RNA/DNA	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Pipetten P2 P10, P100, P1000	Gilson, Bad Camberg
Automatische Pipetierhilfen	Hirschman-Laborgeräte, Eberstadt
	Integra Biosciences, Fernwald
Serologische Pipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Falcon Becton Dickinson, Heidelberg
Pipettenspitzen (2 µl, 10 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-one, Essen
	Sarstedt, Nümbrecht
Parafilm "M"	Pechiney Plastic Packaging, Chicago
Präseparationsfilter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml)	Eppendorf, Hamburg

Geräte und Verbrauchsmaterial	Firma
Reaktionsgefäße 15 ml, 50 ml	Corning Incorporated, USA Greiner Bio-one, Essen Falcon, BD, Heidelberg
Reinstwasseranlage	Millipore, Schwalbach
Schüttler, Vortex MS2 Minishaker	IKA, Staufen
Spritze 50 ml	BBraun, Melsungen
Schweißgerät	Hawa
Spritze 5 ml, 10 ml, 20 ml	Falcon BD, Heidelberg
Sterilbank HeraSafe	Heraeus (Kendro), Hanau
Sterilfilter 0,2 µm	Rotrand Schleicher & Schuell, Dassel
Sterilfilter Millex GP	Millipore, Bedford, USA
Sterilfilter (150 ml, 250 ml)	Nalgene Nunc International, USA
Stimulationsgefäße PP-Röhrchen (5 ml)	Greiner Bio-one, Essen
Tischschüttler Rocky	Schultheiss, München
Thermocycler: Mastercycler-Gradient	Perkin Elmer, Wellesby, USA
Gene Amp <sup>®</sup> PCR-System 9600	ABI Applied Biosystems, Weiterstadt
Venenpunktsbesteck Butterfly 21G	Hospira Venisystems <sup>™</sup> , Philippines
Waagen BP 6100, BP 110, BP211	D Sartorius, Göttingen
Wasserbad	GFL, Großburgwedel
Zellkulturplatte (24 Well, Flachboden)	Falcon BD, Heidelberg Corning Incorporated, USA
Zentrifugen: Allegra 6R	Beckman Coulter, Krefeld
Biofuge fresco	Heraeus (Kendro), Hanau
Centivac	Heraeus (Kendro), Hanau

## 2.4 Probanden

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen wurden in der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie (Direktor: Prof. Dr. med. Dr. ès sci. Thomas Bieber) getätigt. Die analysierten Zellen stammen aus Vollblut freiwilliger Probanden. Bei allen Untersuchungen mit menschlichem Material wurden die Empfehlungen des Weltärztebundes (Deklaration von Helsinki, in der vom Weltärztebund bei seiner 52. Generalversammlung im Oktober 2000 in Edinburgh/Schottland beschlossenen revidierten Fassung) beachtet. Ein entsprechender Antrag wurde bei der Ethikkommission eingereicht und genehmigt.

## 2.5 Zellen, Zellkultur-Medien und Seren

### 2.5.1 Generierung dendritischer Zellen aus Monozyten des peripheren Blutes

Dieser Abschnitt beschreibt die Präparation humaner Monozyten aus peripherem Blut, mittels einer kombinierten Reinigungsmethode mit Vorseparation über 8 % Dextran und Nycoprep Dichtegradientenzentrifugation. Das zugesetzte Dextran führt zu einer veränderten Osmolarität der Blutzellen. Aufgrund der höheren osmotischen Resistenz von Monozyten gegenüber Lymphozyten wird die Trennung dieser Zellarten ermöglicht (BOYUM, 1984). Die im Folgenden beschriebene Methode zur Isolierung von Monozyten bietet gegenüber der klassischen Gewinnung mittels Adhärenz den Vorteil, dass die Zellen nicht durch einen Adhäsionsprozess aktiviert werden und in einem höheren Reinheitsgrad zu Verfügung stehen. Um jedoch eine größere Anzahl von Monozyten zu isolieren, wurde das MACS<sup>®</sup> System (*Magnetic cell sorting*) verwendet, welches Zellen aus Leukozytenkonzentrat 'Buffy-Coats' separiert (Kapitel 2.5.3).

Frisch abgenommenes, mit Kalium-EDTA versetztes peripheres Blut (MONOVETTEN, SARSTEDT) wurde in 50 ml Reaktionsgefäße überführt, anschließend im Verhältnis 1:10 mit 8 %-igem Dextran (siehe Tab. 2) resuspendiert und bei Raumtemperatur (RT) 45-60 min. inkubiert. Das monozytenreiche Plasma wurde mit einer sterilen Pipette abgenommen in 50 ml Röhrchen vorsichtig auf ½ Plasmavolumen NYCOPREP<sup>®</sup> (AXIS-SHIELD, OSLO, NORWEGEN) überschichtet und ohne Bremse zentrifugiert (1750 UpM  $\pm$  700 x g, 20 min., RT). Interphasering sowie das darunter liegende Nycoprep<sup>®</sup> wurden abgenommen, mit Monozyten-Waschpuffer (siehe Tab. 5) auf 50 ml aufgefüllt und bei 800-850 UpM 10 min. zentrifugiert. Darauf folgten zwei weitere Waschschrte mit jeweils 20 ml und 10 ml Monozyten-Waschpuffer. Der Reinheitsgrad der Monozyten wurde anhand der CD14 Expression durchflusszytometrisch mit einem FACSCANTO der Firma BD bestimmt. Anschließend wurde mittels Neubauerzählkammer die Zellen gezählt und in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Monozyten/ml zu gleichen Teilen in Tryptophanmangel (-trp)-Kulturmedium (5  $\mu$ M trp) und in normalem Kulturmedium (30  $\mu$ M trp) aufgenommen (siehe Tab. 18).

**Tab. 18: Monozyten Kulturmedium.** Das Monozytenkulturmedium wurde mit einem Einmalfiltrationssystem (0,2  $\mu$ m) sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Kulturmedium	DCs <sup>-trp</sup>	DCs <sup>+trp</sup>	Volumen
	RPMI 1640 <sup>-Tryptophan/-L-Glutamin</sup>	RPMI 1640 <sup>-Tryptophan/-L-Glutamin</sup>	88 ml
	10 % FKS inaktiviert	10 % FKS inaktiviert	10 ml
	1 % L-Glutamin	1 % L-Glutamin	1 ml
	1 % AB/AM	1 % AB/AM	1 ml
			100 ml

Die Generierung dendritischer Zellen (DCs) aus Monozyten erfolgte bei 37°C, 5 % CO<sub>2</sub> unter Zugabe von 500 U/ml GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor)

und 500 U/ml IL-4 an Tag 0 (Marks & Kopf, 1995). Die Zellen wurden in RPMI 1640 supplementiert mit hitzeinaktiviertem FKS (Fötales Kälber Serum), 2 mM L-Glutamin und 100 µg/ml Antibiotika/Antimykotika (AB/AM) in 24-Well-Platten ausgesät. Die Hitzeinaktivierung des FKS diente der Komplement-, Fibrinogen- und Enzymzerstörung neben der Vermeidung allgemein störender Einflüsse des Serums (Viren, Mykoplasmen, Vitamine). Um DCs unter trp-Mangelbedingungen zu generieren, wurden trp-freies RPMI 1640 (CAMBREX), GM-CSF und IL-4 verwendet. Nach 2 Tagen Kultivierung wurden 250 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4 hinzu gegeben. Am 4. Tag wurde die Hälfte des Mediums durch frisches Kulturmedium mit 500 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 ersetzt (siehe Tab. 19).

**Tab. 19: Kulturbedingungen.**

Reagenz	Tag 0	Tag 2	Tag 4
GM-CSF	500 U/ml	250 U/ml	500 U/ml
IL-4	500 U/ml	250 U/ml	500 U/ml
Kulturmedium	1ml	-	0,5/ml

Unreife (immature) DCs (iDCs) wurden an Tag 6 geerntet, die Zellzahl bestimmt und in Kulturmedium in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml und 500 U GM-CSF/ml aufgenommen, wobei sie anschließend zur Ausreifung in Stimulationsröhrchen überführt wurden. Die Maturierung der DCs wurde durch die Zugabe von 25 µg/ml Polyinosin-Polycytidylsäure (Poly(I:C), SIGMA) für 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> erreicht. Poly(I:C) stellt ein synthetisches Analogon zur doppelsträngigen RNA von Viren dar und wird durch den Toll-like Rezeptor 3 (TLR3) detektiert (Alexopoulou et al., 2001). Wenn nicht anders beschrieben erfolgte die Reifung der DCs (mDCs) entsprechend in normalem- bzw. in trp-Mangel Kulturmedium.

### 2.5.2 Isolierung von T-Zellen aus peripheren Blut

Die Isolierung von T-Zellen erfolgte über eine Lymphoprep-Dichtegradientenzentrifugation. Dafür wurde humanes heparinisieretes Vollblut mit dem gleichen Volumen PBS verdünnt (siehe Tab. 6). LYMPHOPREP® (Dichte = 1,077g/ml) wurde anschließend vorsichtig mit der Hälfte des Blut-PBS-Volumens überschichtet und 30 min. bei 2150 UpM (1000 x g) bei RT ohne Bremse zentrifugiert. Lymphoprep ist ein Gemisch aus hochpolymeren Zuckern, deren Dichte so gewählt ist, dass Zentrifugation bei der angegebenen UpM die Erythrozyten und Granulozyten sedimentiert, während die mononukleären Zellen (PBMCs, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) und die Thrombozyten als Interphase zwischen Plasma und der Lymphoprep-Phase zurückgehalten werden. Der Interphasering mit den enthaltenden PBMCs wurde abgenommen und dreimal mit PBS (50 ml, 20 ml und 10 ml) bei 900 UpM 5 min. gewaschen.

Zur weiteren Aufreinigung der T-Zellen wurde im nächsten Schritt eine sterile Nylonwollensäule verwendet. Das Aufreinigungsprinzip beruht auf der Adhärenz vieler Leukozytenarten (B-Zellen, Makrophagen und DCs) sowie von Zelltrümmern an der

Oberfläche der Nylonwolle (Eisen et al., 1972). CD3<sup>+</sup> T-Zellen adhären jedoch nicht an Nylonwolle und können somit effizient aus einem heterogenen Leukozyten-Zellgemisch angereichert werden (Corrigan et al., 1979). Zur Vorbereitung wurde zunächst eine Nylonwollsäule hergestellt. Dazu wurden 0,6 mg Nylonwolle mit einer Pinzette auseinandergezupft bis keine Stränge mehr zu erkennen sind, die feingezupfte Nylonwolle in eine 5 ml Spritze gegeben, diese mit Alufolie abgedeckt und autoklaviert. Kurz vor dem Versuch wurde die sterile Säule mit 15 ml PBS/FKS (10:1) blasenfrei gefüllt und für 40 min. bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 5 ml T-Zellmedium (siehe Tab. 20) resuspendiert, auf die Nylonsäule gegeben und 40 min. zur Anhaftung von Makrophagen, DCs und Granulozyten an den Nylonfasern bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach der Inkubation wurden die T-Zellen aus der Säule mit 15 ml T-Zellmedium eluiert und die Zellzahl bestimmt. In einer anschließenden durchflusszytometrischen Untersuchung lässt sich der Anteil an CD3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> Zellen und CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> Zellen quantifizieren.

**Tab. 20: T-Zell-Kulturmedium.** Das T-Zell-Kulturmedium wurde mit einem Einmalfiltrationssystem (0,2 µm) sterilfiltriert und bei 4°C gelagert.

Kulturmedium	T-Zellen	Volumen
	RPMI 1640 <sup>-L-Glutamin</sup>	87 ml
	10 % FKS inaktiviert	10 ml
	1 % L-Glutamin	1 ml
	1 % AB/AM	1 ml
	1% 2-Me, 4M	1 ml
		100 ml

### 2.5.3 Isolierung von Monozyten und T-Zellen aus Leukozytenkonzentrat

Die in dieser Arbeit verwendeten Monozyten und T-Zellen wurden mit Hilfe unterschiedlicher Methoden aufgereinigt. Um eine größere Zellzahl aus Leukozytenkonzentrat (*Buffy-Coats*) zu separieren, wurde das MACS<sup>®</sup> System (*Magnetic cell sorting*) eingesetzt. Für geringe Zellmengen wurden die Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation aus peripherem Blut isoliert (siehe Kapitel 2.5.1 und 2.5.2). Zur negativen Monozyten- bzw. T-Zellen-Separation mittels MACS<sup>®</sup> wurde der HUMAN MONOCYTE ISOLATION KIT II bzw. HUMAN CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> REGULATORY T CELL ISOLATION KIT (MILTENYI BIOTEC, BERGISCHE-GLADBACH) unter Anleitung des beigefügten Protokolls verwendet.

Das Prinzip der Aufreinigung über das MACS<sup>®</sup> System beruht auf der indirekten Kopplung der Zelle an magnetische Partikel (*Beads*), wobei in positiv- und negativ-Selektion (Depletion) unterschieden wird. Die Separation der Monozyten bzw. T-Zellen erfolgte über Depletion aller CD14 bzw. CD4 negativen Zellen durch das Anlegen eines Magneten an eine Säule, durch welche die PBMCs gespült wurden. Dabei werden Zellen, die keine Partikel gebunden haben, durch die Säule geleitet, wohingegen die gekoppelten Zellen in der Säule zurück bleiben. Durch Entfernen des Magneten werden die so sortierten Zellen eluiert.

Zunächst wurde das Leukozytenkonzentrat 1:1,5 mit PBS verdünnt. Das PBS-Blut-Gemisch wurde vorsichtig 1:1 auf vorgelegtes Lymphoprep<sup>®</sup> überschichtet und ohne Bremse zentrifugiert (2150 UpM  $\pm$  1000 x g, 30 min., RT). Die Interphase wurde vorsichtig entnommen und in 50 ml MACS-Puffer in einem 50 ml Röhrchen resuspendiert. Die PBMCs wurden zentrifugiert (1000 UpM  $\pm$  250 x g, 10 min., 4°C) und das Pellet anschließend erneut mit 20 ml kaltem MACS-Puffer gewaschen, wobei der erste abgenommene Überstand nochmals zentrifugiert wurde. Die Überstände wurden anschließend verworfen. Bei der Aufreinigung mehrerer Gradienten wurden die PBMCs in einer gesamten Zellsuspension vereinigt und anschließend die Zellzahl bestimmt.

Für Monozyten und T-Zellisolierung wurden die PMBC in zwei Ansätze gesplittet und nach Zentrifugation (1000 UpM, 4°C) die Zellen zur Monozytenaufreinigung in 30  $\mu$ l bzw. zur T-Zellaufreinigung in 45  $\mu$ l kaltem MACS-Puffer/  $1 \times 10^7$  Zellen resuspendiert. Um freie FcR Bindungsstellen zu blockieren, wurde zum Monozytenansatz zusätzlich 10  $\mu$ l 'FcR Blocking Reagent'/  $1 \times 10^7$  Zellen gegeben. Anschließend erfolgte die Zugabe des biotinylierten Antikörper-Cocktails (Monozyten: anti- CD3, -CD7, -CD16, -CD19, -CD56, -CD123, -CD235a bzw. T-Zellen: anti- CD8, -CD14, -CD16, -CD19, -CD56, -CD123, -TCR $\gamma/\delta$ , -CD235a) in einer Konzentration von 10  $\mu$ l zur Monozytenisolierung bzw. 5  $\mu$ l zur T-Zellisolierung /  $1 \times 10^7$  Zellen. Nach 15 min. Inkubationszeit bei 4°C wurden die Zellen in 20 ml MACS-Puffer resuspendiert und zentrifugiert (1000 UpM 10 min., 4°C). Der Überstand wurde verworfen und der Monozytenansatz bzw. der T-Zellansatz in 30  $\mu$ l bzw. 45  $\mu$ l kaltem MACS-Puffer/ $1 \times 10^7$  Zellen aufgenommen sowie 20  $\mu$ l bzw. 10  $\mu$ l anti-Biotin MicroBeads zu den Ansätzen gegeben. Nach einer Inkubation von 15 min. bei 4°C erfolgte ein weiterer Waschschriff mit 20 ml MACS-Puffer (Zentrifugation: 1000 UpM, 10 min., 4°C). Der Überstand wurde verworfen und  $1 \times 10^8$  Zellen in 0,5 ml kaltem MACS-Puffer aufgenommen. Aus diesen beiden Zellsuspensionen wurden im AUTOMACS<sup>®</sup> die CD14<sup>+</sup> Zellen bzw. CD4<sup>+</sup> Zellen unter der Anleitung des beigefügten Protokolls negativ separiert und danach die Zellzahl bestimmt. Die anschließende durchflusszytometrische Untersuchung erlaubte die Bestimmung des Reinheitsgrades der Monozyten anhand der CD14 Expression bzw. der T-Zellen anhand der CD3 und CD4 Expression. Die aufgereinigten Monozyten wurden in Kultur genommen (siehe Kapitel 2.5.1), wobei die T-Zellen, wie im nachfolgenden Kapitel beschrieben, bei -70°C eingefroren wurden.

#### 2.5.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Aus logistischen Gründen (z.B. Verfügbarkeit des Vollblutes und Versuchsablauf) mussten die DCs und T-Zellen oftmals nach der Isolierung eingefroren werden. Zur längerfristigen Aufbewahrung wurden die Zellen abzentrifugiert (850 bzw. 900 UpM, 10 min., RT) und in 1 ml Einfriermedium (10 % DMSO, 90 % FKS) aufgenommen. Das zugegebene DMSO (Dimethylsulfoxid) senkt zum einen den Gefrierpunkt des Mediums und zum anderen verhindert es die Kristallbildung in den Zellen. Nach der Überführung in Kryo-Einfriergefäße wurden die Zellen schrittweise (1°C/min.) in einer mit Isopropanol gefüllten Kühlbox auf -70°C abgekühlt und nach 24 h in flüssigen Stickstoff transferiert. Um die eingefrorenen

Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden sie in 10 ml vorgewärmten Zellkulturmedium (37°C) überführt und abzentrifugiert (850 bzw. 900 UpM, 10 min., RT). Um alle DMSO Rückstände zu entfernen wurden 2 weitere Waschschrte mit 10 ml Kulturmedium durchgeführt. Schließlich erfolgte die Aufnahme der Zellen in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$ /ml in Zellkulturmedium und eine Kultivierung im Brutschrank.

## 2.6 Immunologische Methoden

### 2.6.1 Durchflusszytometrische Analyse

FACS steht für '*Fluorescence activated cell sorting*' und beschreibt eine Methode, bei der eine Sortierung von Zellen vorgenommen wird sowie Eigenschaften der Zellen gemessen werden können. Die Bezeichnung FACS ist eigentlich irreführend, da meist das Verfahren zur Charakterisierung von Zellen eingesetzt wird, so auch in dieser Arbeit. Das Prinzip der Untersuchung beruht auf der Emission von optischen Signalen der Zelle, während sie einen Laserstrahl passiert. Hierbei werden in einer Lösung befindliche Zellen durch eine Kapillare gesaugt. Anschließend passieren sie einzeln im Sensormodul einen Laserstrahl. Die Zelle emittiert dabei Streulicht und, wenn entsprechend markierte Antikörper gebunden sind, Fluoreszenzimpulse, die durch Fotodetektoren erfasst werden. So kann die Expressionsrate verschiedener Moleküle der Zelle gemessen werden. Das Streulicht wird durch Zellgröße, Struktur der Zellmembran sowie intrazelluläre Bestandteile beeinflusst, so dass die Zellen in unterschiedliche Fraktionen sortiert und gezählt werden können. Das Vorwärtsstreulicht FSC (*Forward scatter*) dient als Maß für die Zellgröße, wobei das Seitwärtsstreulicht SSC (*Sideward scatter*) als Maß für die Granularität (Granula, Membranen und Struktur des Zellkerns etc.) dient. Mit diesen beiden Parametern lassen sich Zellpopulationen des Blutes bereits gut auftrennen. Zudem werden die Zellen vorher mit fluoreszierenden Farbstoffen inkubiert, die an Antikörpern gebunden sein können oder, wie z.B. bei den Farbstoffen Propidiumiodid (PI) oder 7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD), die direkt mit Zellbestandteilen reagieren. Antikörper sind meist gegen bestimmte Oberflächenmerkmale (z.B. CD = *Cluster of differentiation*) gerichtet. Die zur Immunphänotypisierung der DCs in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper waren indirekt oder direkt an die Fluoreszenzfarbstoffe PE- (Phycoerythrin), FITC- (Fluorescein-Isothiocyanat) und APC- (Allophycocyanin) ALEXA-647- gekoppelt und sind im Anhang aufgelistet (Kapitel 6.2).

Die gefärbten Zellen wurden mit einem FACSCALIBUR und später mit dem Nachfolgemodell FACSCANTO Durchflusszytometer der Firma BECTON DICKINSON, (BD, Heidelberg) analysiert. Die Proben wurden bis zum Einmessen bei 4°C lichtgeschützt aufbewahrt und in einer Geschwindigkeit 'high' eingemessen. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CELL QUEST Software bzw. dem FACSDIVA-Programm (BD, Heidelberg) und sei im folgendem am Beispiel von DCs dargestellt. Die vitale Zellpopulation wurde in einem Punktdiagramm durch eine Kombination von FSC/SSC und CD1a-PE/7-AAD Parametern zur Analyse von vitalen, CD1a positiven Einzelzellen eingegrenzt bzw. '*gated*'. Zu weiteren Charakterisierung der vitalen CD1a positiven Zellpopulation mit FITC-markierten mAk wurde die PE-Fluoreszenz (CD1a) gegen die FITC-Fluoreszenz (entsprechende



Antigene) aufgetragen. Mit Hilfe der Kontrollantikörper gleichen Isotypes wurden die Marker auf 1% gesetzt, um die positive Färbung der Antigene zu definieren bzw. eine mögliche unspezifische Bindung des Antikörpers zu berücksichtigen. Mit Hilfe der Software wurde die prozentuale Verteilung und die Intensität der FITC-Färbung in einem Histogramm berechnet. Die Intensität einer Fluoreszenzfärbung wurde durch den Median der Fluoreszenzintensität (MFI) definiert. Um Antigenexpression unterschiedlicher Experimente vergleichen zu können, wurde eine Normalisierung der MFI-Werte der jeweils untersuchten Moleküle anhand der MFI-Werte des zugehörigen irrelevanten Kontrollantikörpers vorgenommen. Der relative Fluoreszenzindex (rFI) wurde nach folgender Formel berechnet:

$$rFI = ( MFI (\text{spezifische Färbung}) - MFI (\text{Kontrolle}) ) / MFI (\text{Kontrolle})$$

Im Gegensatz zu der älteren, häufig verwendeten Angabe 'Prozent positiver Zellen' lassen sich mit Berechnung der rFI-Werte auch größere Unterschiede zwischen den Fluoreszenzintensitäten zuverlässig wiedergeben. Ein rFI-Wert von null entspricht in der grafischen Darstellung zwei übereinander liegenden Histogrammkurven, ein rFI-Wert von zehn einer Verschiebung der Histogrammkurven um eine logarithmische Dekade. Liegen in der zweidimensionalen graphischen Darstellung mehrere Subpopulationen vor, kann durch elektronisches Eingrenzen der Zellpopulationen, dem Setzen der 'Gates', eine für jede Subpopulation getrennte Bestimmung der rFI-Werte durchgeführt werden.

## 2.6.2 Immunologische Färbungen zur Phänotypisierung der Zellen

Durchflusszytometrische Untersuchungen ermöglichen bei geringem Materialverbrauch und Färbeaufwand die hochsensitive, quantitative Analyse membranständiger Oberflächenantigene mit Hilfe von monoklonalen (mAk), die direkt oder indirekt mit Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelt sind. Die Methodik ist daher zur Untersuchung von aufwendig zu gewinnenden Material mit geringer Zellzahl geeignet. Durch entsprechende Permeabilisierungsschritte sind auch zytoplasmatische Antigene einer quantitativen Analyse zugänglich. Im Folgenden sind extrazelluläre als auch intrazelluläre Färbeprotokolle am Beispiel der Phänotypisierung von Monozyten und DCs aufgeführt.

### 2.6.2.1 Extrazelluläre Immunfärbung

Das Färbeprotokoll der Monozyten und DCs beschreibt eine Dreifarbenfluoreszenzfärbung vitaler Zellen. Alle Inkubationsschritte wurden in 100 µl Volumen FACS-Puffer bei 4°C und unter lichtgeschützten Bedingungen durchgeführt. Zur Färbung wurden je 5 - 7,5 x 10<sup>4</sup> Zellen auf FACS-Röhrchen (FALCON BECTON DICKINSON, HEIDELBERG) gleichmäßig verteilt, mit FACS-Puffer (siehe Tab. 8) gewaschen (Zentrifugation: 1300 UpM, 3 min., 4°C), wobei der Überstand verworfen wurde. Zunächst erfolgte für 20 min. die Inkubation mit dem unkonjugierten monoklonalen Primärantikörper bzw. der entsprechenden irrelevanten Isotypkontrolle (IgG1<sub>k</sub>, IgG2<sub>k</sub>a, IgG2<sub>k</sub>b, SIGMA, TAUFKIRCHEN) in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml. Anschließend wurde einmal in 100 µl FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 1300 UpM, 3 min., 4°C) und der Überstand verworfen. Es folgte eine Inkubation für 15 min.

mit dem FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG (F(ab)<sub>2</sub>-Fragment)-Sekundärantikörper (DIANOVA, HAMBURG). Dann wurde erneut in 100 µl FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 1300 UpM, 3 min., 4°C), der Überstand verworfen und die freien Bindungsstellen des Sekundärantikörpers für 10 min. in normalem Mausserum (DIANOVA, HAMBURG) mit einer Endverdünnung von 1:20 geblockt. Bei der Immunphäotypisierung der DCs erfolgte anschließend die Gegenfärbung des membranständigen DC-Markers CD1a für 20 min. mit dem RD1- (entspricht dem Farbstoff Phycoerythrin) markierten Antikörper T6RD1 (BECKMAN COULTER, KREFELD) bzw. mit der irrelevanten Isotypkontrolle IgG1-RD1 (BECKMAN COULTER). Monozyten wurden über die CD14 Expression mit dem mAk CD14-PE (BD, HEIDELBERG) und der entsprechenden Isotypkontrolle IgG2a-PE (BD HEIDELBERG) charakterisiert. Gleichzeitig wurde eine Vitalfärbung mit dem DNA-Farbstoff 7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD, SIGMA, TAUFKIRCHEN) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml durchgeführt. Nur bei Zellen, deren Zellmembran alteriert ist, werden intrazelluläre Proteine und DNA für 7-AAD zugänglich, so dass tote Zellen in der Zellsuspension detektiert werden können. Nach einem letzten Waschschrift in 100 µl FACS-Puffer erfolgte die Einmessung der Zellen am Durchflusszytometer. Eine genaue Auflistung der eingesetzten Antikörper befindet sich im Anhang (siehe Kapitel 6.2).

### 2.6.2.2 Intrazelluläre Saponinfärbung 0,1 %

Die intrazelluläre Färbung der Zellen erforderte eine Stabilisierung der Zellen. Eine Fixierung der Zellen mit Formaldehyd erhält die Membranstabilität und die Zellmorphologie. Die Permeabilisierung von Zellen mit dem glykosidischen Detergens Saponin und die anschließende Färbung sowie durchflusszytometrische Analyse wurden zur Detektion von zytoplasmatischen Antigenen verwendet (Jung et al., 1993; Assenmacher et al., 1994). Saponin ist ein pflanzliches Glykosid, das sich aufgrund seiner hohen Affinität zu Cholesterol in die Zellmembran einfügt. Dort führt es zu einer reversiblen Erhöhung der Durchlässigkeit für größere Moleküle, was für die Einschleusung von Antikörpern in die Zelle genutzt werden kann (Seeman, 1974). Das Saponin muss während der gesamten intrazellulären Färbeschritte präsent sein, da es sich um eine reversible Erhöhung der Durchlässigkeit handelt. Im folgenden Abschnitt sind einzelnen Färbeschritte aufgeführt.

Alle Inkubationsschritte wurden, wenn nicht anders angegeben, in 100 µl Volumen in einer 96-Well-Platte unter lichtgeschützten Bedingungen durchgeführt. Zur Färbung wurden pro Well 7,5-10 x 10<sup>4</sup> Zellen gleichmäßig verteilt, mit FACS-Puffer (siehe Tab. 8) gewaschen (Zentrifugation: 1300 UpM, 3 min., RT) und zur Vitalfärbung mit dem DNA-Farbstoff 7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD, SIGMA, TAUFKIERCHEN) in einer Endkonzentration von 1 µg/ml für 5 min. inkubiert. Anschließend wurde zweimal in 100 µl PBS-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 1300 UpM, 3 min., RT) und der Überstand verworfen. Zur Fixierung der Zellen wurden nach dem letzten Waschschrift 100 µl PBS und 100 µl 4 % Formaldehyd/PBS-Lösung (siehe Tab. 9) dazugegeben und für 20 min. bei RT inkubiert. Die fixierten Zellen wurden nach zweimaligem Waschen für 10 min. mit 0,1 M Glyclin/PBS-Lösung (siehe Tab. 10) inkubiert, um noch freie Formaldehydrückstände aufzufangen. Daraufhin erfolgte ein weiterer Waschschrift mit PBS-Puffer mit anschließender Zugabe von BSA-

NaN<sub>3</sub>-Puffer (siehe Tab. 11), um die Absättigung von unspezifisch bindenden Oberflächenmolekülen zu gewährleisten (Inkubation: 10 min). Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt (1300 UpM, 3 min., RT) wurde das Zellpellet für 30 min. mit 100 µl 0,1 % Saponin-Puffer (siehe Tab. 13) und Ziegenserum (DIANOVA, HAMBURG) in einer Endkonzentration von 10 % inkubiert, um die Zellen zu permeabilisieren sowie den hohen intrazellulären Hintergrund zu blocken.

Nachfolgend wurden die Zellen für 20 min. mit dem unkonjugierten Primärantikörper bzw. der irrelevanten Isotypkontrolle in einer Endkonzentration von 2,5 µg/ml inkubiert. Anschließend wurde zweimal in 0,1 % Saponin-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 1300 UpM, 3 min., RT) und der Überstand verworfen. Es folgte eine Inkubation für 20 min. mit dem FITC-konjugierten Ziege-anti-Maus-IgG Sekundärantikörper (F(ab)<sub>2</sub>-Fragment; DIANOVA, HAMBURG). Dann wurde erneut in 0,1 % Saponin-Puffer gewaschen (Zentrifugation: 1300 UpM, 3 min., RT) und der Überstand verworfen. Freie Bindungsstellen des Sekundärantikörpers wurden für 10 min. in Mausserum (DIANOVA, HAMBURG) mit einer Endverdünnung 1:20 bei RT geblockt. Zur Immunphänotypisierung der DCs erfolgte die Zugabe des direkt gekoppelten Antikörpers CD1a-RD1, wobei in parallelen Ansätzen Kontrollfärbungen mit der irrelevanten Isotypkontrolle IgG1-RD1 (COULTER, KREFELD) durchgeführt wurden. Monozyten wurden über die Gegenfärbung des CD14 Oberflächenmoleküls mit einem direkt gekoppelten CD14-PE mAk (BD, HEIDELBERG) und entsprechender Isotypkontrolle IgG2a-PE (BD, HEIDELBERG) charakterisiert. Nach der Inkubation für 20 min. bei 4°C erfolgte in einem letzten Waschschrift mit FACS-Puffer (Zentrifugation: 1300 UpM, 3 min., 4°C) die Einmessung der Zellen am Durchflusszytometer. Eine Zusammenstellung der eingesetzten Antikörper sich im Anhang (Kapitel 6.2).

### 2.6.3 Pinozytoseaktivität unreifer dendritischer Zellen

Für den Nachweis der aktiven Pinozytose wurden unreife DCs (iDCs) in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml entsprechend in normalem bzw. in Tryptophanmangel-Kulturmedium aufgenommen, 100 µl der Zellsuspension auf FACS-Röhrchen verteilt und für 15 min. bei 4°C (Negativkontrolle) oder 37°C inkubiert. Dann wurde FITC-konjugiertes BSA (Bovine Serum Albumin, SIGMA) zugegeben (Endkonzentrationen 50 µg/ml). Nach 30 min. Inkubation bei 4°C bzw. 37°C erfolgten 2 Waschschriftte mit kaltem Stopp-Puffer (siehe Tab. 14) (Zentrifugation: 850 UpM, 10 min., 4°C), wobei der Überstand verworfen wurde. Anschließend erfolgte eine durchflusszytometrische Analyse. Als Maß für die Pinozytoseaktivität wurde die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) an BSA-FITC bestimmt.

### 2.6.4 Apoptosetest

Für die Messung der Apoptose wurde ein kommerzieller ANNEXIN V-FITC KIT (BD) unter Anleitung des beigefügten Protokolls verwendet. Die Methode kombiniert die Eigenschaft von Annexin V, an Phosphatidylserin (PS) der Zellmembran zu binden, mit der Gegenfärbung durch 7-Amino-Actinomycin-D (7-AAD), das zwischen Basenpaare doppelsträngiger Nukleinsäuren interkaliert. Nur bei Zellen, deren Zellmembran alteriert ist, werden

intrazelluläre Proteine und DNA für 7-AAD zugänglich. In der frühen Phase der Apoptose ist die Integrität der Zellmembran noch erhalten, so dass 7-AAD nicht in die Zelle gelangen kann. Die Zellen verlieren jedoch die asymmetrische Anordnung ihrer membranständigen Phospholipide und PS wird von der Innen- auf die Außenseite der Zytoplasmamembran verschoben. Dort verbleibt es für den Rest der Apoptosekaskade. Annexin V ist ein Phospholipid-bindendes Protein der Annexin-Familie, welches in Gegenwart von  $\text{Ca}^{2+}$  mit hoher selektiver Affinität an PS bindet, bevor es zu morphologischen Veränderungen und zur Hydrolyse von DNA kommt. *In vitro* kommt es in einer späten Phase der Apoptose zu einem Verlust der Integrität der Plasmamembran und zu einer sekundären Nekrose der Zelle. Um die apoptotischen von den nekrotischen Zellen zu differenzieren, wird mit 7-AAD im gleichen Messansatz gegengefärbt. Werden die Zellen durch eine Kombination von FSC/SSC morphologisch und CD1a-PE Parametern 'gegatet', können im FITC/7-AAD Punktdiagramm drei Zellpopulationen unterschieden werden: 1) vitale Population 2) apoptotische Population und 3) sekundär-nekrotische Population (Tab. 21).

**Tab. 21: Zellpopulationen in der Durchflusszytometrie nach Doppelfärbung mit FITC konjugiertem Annexin V und PI.**

Kulturmedium	Annexin V Färbung	7-AAD Färbung
Intakte Zellen	-	-
Apoptotische Zellen	+	-
Sekundär-nekrotische Zellen	+	+

Die wie unter Kapitel 2.5.1 und 2.5.3 beschriebenen generierten DCs wurden in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml PBS aufgenommen und 100  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension auf FACS-Röhrchen gleichmäßig aufgeteilt. Die Zellsuspension wurde dann in zwei Waschschrritten mit PBS jeweils für 10 min. bei 850 UpM und 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 100  $\mu\text{l}$  vorgekühltem Bindungspuffer (1x) resuspendiert. Zur Färbung wurden 5  $\mu\text{l}$  Annexin V -FITC-Lösung, 7-AAD (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) sowie der mAk CD1a-PE (2,5  $\mu\text{g/ml}$ ) zugegeben und die Zellen für 15 min. bei RT lichtgeschützt inkubiert. Innerhalb einer Stunde wurden die Zellen durchflusszytometrisch analysiert.

### 2.6.5 ELISA (Enzyme Linked Immunosorbent Assay)

In dieser Arbeit wurde zur Quantifizierung der Zytokinkonzentration eine der ELISA Techniken (*Sandwich-ELISA*) verwendet, bei der zwei Antikörper spezifisch an unterschiedliche Epitope des nachzuweisenden Antigens binden und somit ein Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex entsteht. Die gebundene Proteinmenge wird in einer enzymatisch katalysierten Farbreaktion nachgewiesen und als Farbintensität photometrisch gemessen. Als Enzym setzt man die Meerrettich-Peroxidase (*Horse-Raddish Peroxidase*, HRP) ein, welche das Substrat TMB (Tetra-Methyl-Benzidin) umsetzt. Die Stärke des Umsatzes wird nach Abstoppen der Reaktion mit Schwefelsäure ( $\text{H}_2\text{SO}_4$ ) am ELISA-Reader photometrisch bestimmt. Um eine quantitative Aussage zu treffen, werden die Werte in einer Messung mit einer Standardkurve verglichen.

Mit Hilfe des Sandwich-ELISA wurden die sezernierten Zytokine (IL-6, IL-10 und IL-12p40) von unreifen DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> sowie nach Stimulation mit LPS (50 ng/ml) für 24 h nachgewiesen. Die Zellen wurden an d6 geerntet und entsprechend ihrer Bedingungen in frischem trp-Mangel Kulturmedium bzw. in normalem Kulturmedium in einer Konzentration von  $0,5 \times 10^6$  Zellen/ml aufgenommen. Unter Zugabe von 500 U/ml GM-CSF wurden die Zellen für 24 h in Stimulationsröhrchen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellkulturüberstände der iDCs und LPS-stimulierten DCs wurden an d7 nach einem Zentrifugationsschritt (850 UpM, 10 min., RT) abgenommen, bei -20°C gelagert. Zur Untersuchung der sezernierten Zytokine von unstimulierten sowie stimulierten DCs wurden folgende ELISA der Firma BIOSOURCE (Solingen) verwendet: Human IL-6-, Human IL-10- und Human IL-12p40 CYTOSETS™.

Zur Quantifizierung der Zytokinkonzentration wurde eine 96-Well-Flachbodenplatte (NUNC MAXISORB, Wiesbaden) mit 50 µl Fänger-Antikörpern (*Capture Antibodies*) über Nacht bei 4°C beschichtet. Alle verwendeten Antikörper wurden in 1 x PBS verdünnt, wobei die Konzentrationen jeweils den Vorgaben des Herstellers entsprachen. Am nächsten Tag wurden die Platten dreimal mit Waschpuffer (0,1 % Tween in 1 x PBS) mit einem ELISA-Washer (Modell: ELX50, BIO-TEK INSTRUMENTS, Bad Friedrichshall) gewaschen. Um mögliche Pufferreste zu entfernen, wurde die Platte nach jedem Waschschrift gründlich auf Papiertüchern ausgeklopft. Zur Blockierung freier Bindungsstellen wurden 250 µl Blockierpuffer (1 % BSA in 1 x PBS) eingesetzt und die Platte bei Raumtemperatur 1 bis 2 h inkubiert. Danach folgte erneut ein dreimaliges Waschen mit Waschpuffer. Anschließend wurden 50 µl der zu bestimmenden Überstände sowie die Reinstprobe (Standard) mit bekannter Konzentrationsangabe auf die Platte aufgetragen, um später eine photometrische Quantifizierung zu ermöglichen. Aus dieser wurde eine 1:2 Verdünnungsreihe des jeweiligen rekombinanten Zytokins erstellt und im Anschluss der Fänger-Antikörper hinzupipettiert. Dieser Ansatz wurde 2 h schüttelnd bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend dreimal gewaschen. Durch die Zugabe eines zweiten, über das Biotin-Streptavidin-System an das HRP-Enzym gekoppelten Detektions-Antikörpers (*Detection Antibody*) kann das an den Fänger-Antikörper gebundene Antigen nachgewiesen werden. Demnach wurden 50 µl Streptavidin-HRP Lösung aufgetragen und die Platte abgedeckt bei Raumtemperatur schüttelnd 45 min. inkubiert. Nach 6 Waschschriften erfolgte die Zugabe des HRP-Substrates TMB (BIOSOURCE, Solingen), welches von der Peroxidase umgesetzt wird. Diese enzymatische Reaktion wurde zu einem Zeitpunkt guter farblicher Kontraste (Inkubationszeit: 10 bis 15 min.) durch Zerstörung des Enzyms mit 50 µl 15 % Schwefelsäure (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) gestoppt. Bei der Enzymreaktion wird das farblose TMB in einen blauen Farbstoff umgewandelt, der durch die Schwefelsäure ins Gelbe umschlägt.

Die Quantifizierung (490 nm) erfolgte mit Hilfe eines ELISA-Readers (Modell: EL800, BIO-TEK INSTRUMENTS, Bad Friedrichshall). Zur Auswertung wurde die KC JUNIOR Software (BIO-TEK INSTRUMENTS) benutzt. Aus der optischen Dichte (OD) der Verdünnungsreihe und der bekannten Antigenkonzentration kann eine Eichgerade erstellt werden. Anhand dieser Standardkurve werden die Antigenkonzentrationen in den unbekanntenen Proben aufgrund ihrer photometrischen Absorption quantifiziert.

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 Isolierung und Quantifizierung von RNA

Für die RNA-Isolierung wurden  $1 - 2 \times 10^6$  Zellen dreimal mit eiskaltem PBS (10 ml, 10 ml und 5 ml; Zentrifugation: 1000 UpM, 5 min., 4°C) gewaschen und der Überstand verworfen. Anschließend erfolgte ein zusätzlicher Zentrifugationsschritt, um überschüssigen Puffer zu entfernen. Nach den Waschschritten wurde das Zellpellet (*dry pellet*) bis zur RNA-Extraktion bei -70°C gelagert. Die Isolierung von RNA erfolgte mit Hilfe eines RNA-Extraktionskits (RNEASY MINI KIT, QIAGEN) unter Anleitung des beigefügten Protokolls 'Purification of Total RNA'. Zur Quantifizierung der Nukleotide wurde die Absorption der Proben im Photometer bestimmt. Die Absorption von 1 OD bei 260 nm entspricht dabei 40 µg RNA/ml. Der Quotient aus Nukleinsäureabsorption (A<sub>260</sub> nm) und Proteinabsorption (A<sub>280</sub> nm) gibt dabei den Reinheitsgrad der Proben an. Er sollte ungefähr 1,8 betragen. Bei sehr geringen RNA Konzentrationen wurde die RNA-Probe mit Hilfe einer Speedvac-Zentrifuge (CENTIVAC; HERAEUS, HANAU) konzentriert. Der Erfolg der RNA-Extraktion erlaubte nachfolgende Arbeitsschritte.

### 2.7.2 Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion

Mit Hilfe der Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) wurde die Gen Expression des inhibitorischen Rezeptors ILT3 und des Markers CHOP für die Aktivierung des GCN2 Signalweges auf mRNA Ebene semiquantitativ nachgewiesen. Um Unterschiede in der Transkription eines Gens zwischen beiden Zellkulturen (DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup>) nachzuweisen, musste zunächst mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT) die RNA in cDNA umgeschrieben werden. Die RT ist ein Enzym, das die Umschreibung von RNA in DNA katalysiert und von Retroviren dazu verwendet wird, ihr Genom in DNA umzuschreiben. Die cDNA (*complementary DNA*) wurde im Anschluss als Ausgangsprodukt in einer klassischen PCR verwendet.

#### 2.7.2.1 cDNA-Synthese

Zunächst wurde 1 µg RNA in 15,5 µl ddH<sub>2</sub>O für 3 min. bei 65°C erhitzt und dann direkt auf Eis gestellt. Ebenfalls wurde dann der RT-Reaktions-Mix auf Eis pipetiert. Pro RNA-Aufreinigung wurde folgender Master-Mix mit einem Gesamt-Volumen von 34,5 µl hergestellt:

**Tab. 22: RT-Protokoll.** Volumen in µl; Gesamtvolumen 34,5µl.

Reagenz	Volumen	Konzentration
5 x RT-Puffer	10	
Random-Primer	2	60 ng/µl
dNTPs	16	1,25 mM
MoMLV-RT	1	
RNasin	0,5	
DTT	5	0,1 M

Zu den 15,5 µl RNA wurden jeweils 34,5 µl Reaktion-Mix hinzugegeben, die RT-Reaktion erfolgte während der Inkubation bei 37°C für 1h in einem Heizblock-Thermomixer (EPPENDORF, HAMBURG). Die Denaturierung der cDNA wurde durch 3 min. Inkubation bei 95°C und anschließende Abschreckung auf 4°C erreicht. Die cDNA wurde mit 500 µl ddH<sub>2</sub>O verdünnt und bei -20°C aufbewahrt.

### 2.7.2.2 PCR

Durch die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR), von (Saiki et al., 1988) entwickelt, können spezifische DNA-Fragmente in hohen Konzentrationen amplifiziert werden. Die Amplifikationsreaktion erfolgt in mehreren Schritten. Das Grundprinzip geht von der doppelsträngigen DNA aus, die das spezifische Fragment enthält und als Matrize dient. Der Doppelstrang wird im ersten Schritt durch Hitzebehandlung denaturiert. Die dabei entstehenden Einzelstränge hybridisieren dann nach Abkühlung mit den Primern (Annealing), die meist 18 bis 25 bp lang und komplementär zum Plus- bzw. zum Minus-Strang sind. Diese Oligonukleotide fungieren als Starter für die Polymerisationsreaktion, der eigentlichen DNA-Synthese (Extension): Dabei erfolgt in Gegenwart der hitzestabilen *Taq*-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*) die Verlängerung der Primer in 5'→3'-Richtung. Die beiden neusynthetisierten Stränge dienen wiederum als Matrize für den jeweils anderen Primer. Ein mehrmaliges Wiederholen der Schritte Denaturierung, Annealing, Extension führt zu einer exponentiellen Vermehrung des spezifischen Fragments. Zur Quantifizierung der Genexpression wurden für die jeweiligen Gene diejenigen Zyklusanzahlen bestimmt, bei denen die DNA-Zunahme im linearen Bereich verläuft. Zur Normierung des untersuchten Gens wurde β-Actin als 'House keeping-Gen' herangezogen.

### 2.7.2.3 Primer

Die in der vorliegenden Arbeit für die Amplifikation verwendeten Primer (Tab. 23) waren identisch zu den von (Manavalan et al., 2004) und (Xia et al., 2002) verwendeten. Zusätzlich wurden Primer für β-Actin konstruiert, die zuverlässige Ergebnisse lieferten.

Tab. 23: Verwendete Primer.

Name	Primersequenz	Genabschnitt	Länge (bp)	Herkunft
hILT3b+	5'- ACGTATGCCAAGGTGAAACACT	ILT3	493	Manavalan et al., 2004
hILT3b-	3'- CATTGTGAATTGAGAGGTCTGC			
CHOP 10+	5'- GAAACGGAAACAGAGTGGTCATTCCCC	CHOP	309	Xia et al., 2002
CHOP 10-	3'- GTGGGATTGAGGGTCACATCATTGGCA			
β-actin-new+	5'- GAGCGGGAAATCGTCCGTGACATT	β-Actin	240	
β-actin-new-	3'- GATGGAGTTGAAGGTAGTTTCGTG			

### 2.7.2.4 PCR-Reaktionsprofile

Die Temperaturprofile und Protokolle der PCR sind den Tabellen 24 und 25 zu entnehmen. Die Amplifikations-Reaktionen erfolgten mit Thermocyclern der Firmen ABI APPLIED BIOSYSTEMS (Modell: GENE AMP<sup>®</sup> PCR-SYSTEM 9600) und EPPENDORF (Modell: MASTER-CYCLER-GRADIENT).

**Tab. 24: Temperaturprofil der RT-PCR.**

	Temperatur [°C]	Zeit [sec.]	Zyklenzahl
Startdenaturierung	94	300	
Denaturierung	94	30	} 26 - 32
Annealing	55	30	
Extension	72	30	
Endextension	72	300	

**Tab. 25: PCR-Protokoll.** Volumen in µl; Gesamtvolumen 50µl.

Reagenz	Volumen	Konzentration
10 x PCR-Puffer	10,0	
MgCl <sub>2</sub>	3,0	50 mM
Primer 1	0,5	40 pm/µl
Primer 2	0,5	40 pm/µl
dNTPs	16,0	1,25 mM
cDNA	10	
Taq-Polymerase	0,5	5 U/µl
ddH <sub>2</sub> O	variabel	

### 2.7.3 DNA-Nachweis durch Agarose-Gelelektrophorese

Zum Nachweis des PCR-Produkts wurden 15 µl des Amplikons und 2 µl 6 x Ladepuffer (Bromphenolblau/Xylecyanol, siehe Tab. 15) in eine Tasche eines 2 %-igen Agarosegels geladen, welches mit 50 µM EtBr (SIGMA, Taufkirchen) versehen wurde. Die negativ geladene DNA wandert durch das Agarosegel von der Anode zur Kathode, wobei kürzere DNA-Fragmente das Gel schneller durchlaufen als längere. Zur Größenbestimmung wurden zusätzlich 15 µl 5:1 verdünnter Längenstandard 100 bp Lamda-Marker (ROTH, Karlsruhe) mit 2 µl Ladepuffer auf eine Spur aufgetragen. Die Gelelektrophorese erfolgte in 1 x TBE-Puffer (siehe Tab. 16) bei 100 V. Nach ca. 60 min. Laufzeit wurde das Gel unter UV-Bestrahlung von 312 nm Wellenlänge betrachtet. Das in der DNA-Doppelhelix eingelagerte EtBr wird durch das UV-Licht zur Fluoreszenz angeregt und dadurch sichtbar gemacht.



## 2.8 Proteinchemische Methoden

Um zu testen, ob DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> einen Unterschied in der Proteinbiosynthese in Bezug auf MHC Klasse-II Moleküle (MHC-II Moleküle) und der MHC-II-assoziierten invarianten Kette (Ii) aufweisen, wurden Pulse Chase- und Westernblot-Analysen durchgeführt. Die Pulse Chase-Methodik ermöglicht eine zusätzliche Aussage über die Proteinbiosynthese in einem definierten Zeitfenster.

### 2.8.1 Pulse Chase-Analyse

Das Prinzip der Pulse Chase-Analyse besteht darin, dass radioaktive Moleküle als 'Pulse' zu einer biologischen Probe dazugegeben werden und die Fähigkeit über die Markierung in verschiedenen Zeitintervallen zu verfolgen, was die Zelle an radioaktiven Material umsetzt.

DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> wurden geerntet, anschließend gezählt und in  $1 \times 10^6$ /ml Methionin-freies RPMI, (1x F1245, BIOCHROM) aufgenommen. Nach dem Resuspendieren wurden die Zellen in Methionin-freiem RPMI gewaschen (850 UpM, 10 min, RT) und der Überstand verworfen. Für das radioaktive Markieren mit 50  $\mu$ Ci [<sup>35</sup>S]-Methionin (GE HEALTHCARE AG, Schweiz) wurden  $5 \times 10^6$  DCs<sup>-trp</sup> und  $5 \times 10^6$  DCs<sup>+trp</sup> eingesetzt. Die Zellen wurden auf 4 Eppendorfgefäße aufgeteilt und 30 min. in  $0,5 \times 10^6$ /ml Methionin-freiem RPMI bei 37°C inkubiert. Anschließend erfolgte die Markierung für 10 min. mit 50  $\mu$ Ci [<sup>35</sup>S]-Methionin. Ungebundenes [<sup>35</sup>S]-Methionin wurde nach einem Zentrifugationsschritt (4000 UpM, 3 min., RT) verworfen und das Zellpellet mit 1 ml PBS gewaschen (4000 UpM, 3 min., RT). Der Überstand wurde abpipettiert und die Zellen anschließend in 150 mg/ml Methionin-haltigem Kulturmedium (0,5 ml) aufgenommen. Die Zellen wurde nach unterschiedlichen Zeitintervallen bei -70°C eingefroren (0 h, 1 h, 2 h und 3 h). Während der Inkubationszeit wird das unmarkierte (kalte) Methionin durch die Zelle verstoffwechselt und kann durch Immunpräzipitation (siehe Kapitel 2.8.3) mit Hilfe spezifischer mAk nachgewiesen werden.

### 2.8.2 Herstellung der Zell-Lysate

Zur Lyse der Zellen wurden DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> in 100  $\mu$ l vorgekühltem Lysepuffer (siehe Tab. 26) mit Protease-Inhibitoren-Cocktail (ROCHE DIAGNOSTICS, Mannheim) resuspendiert und für 30 min. auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 10  $\mu$ l der Lysate als Lysekontrolle verwendet (siehe Kapitel 2.8.4), wobei der Rest der Zell-Lysate zentrifugiert (14000 UpM, 3 min., 4°C) wurde. Nachfolgend wurden die Überstände in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 400  $\mu$ l Lysepuffer aufgefüllt.

**Tab. 26: Lyse-Puffer.** Ansatz für 8 Proben

Reagenz	Volumen	Konzentration
ST-Puffer (Saline Tris)	4,5 ml	
10 % NP40	0,5 ml	1 %
Complete	100 $\mu$ l	

### 2.8.3 Immunpräzipitation

Die Technik der Immunpräzipitation ermöglicht die Isolierung von Proteinen aus komplexen Gemischen, wie z.B. Zell-Lysaten, mit Hilfe von spezifischen Antikörpern. Um die Spezifität der Präzipitation zu gewährleisten, wurden Proteinaggregate, die zu unspezifischen Interaktionen neigen, vorher aus den hergestellten Lysaten (siehe Kapitel 2.8.2) entfernt (Präadsorption). Dazu wurde Protein A aus der Zellwand von *Staphylococcus aureus* genutzt, das an die Fc-Abschnitte vieler Immunglobulinklassen bindet. Protein A ist kovalent an eine Sepharose 4B Matrix 'Beads' (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, PISCATAWAY, NJ) gekoppelt und wurde mit 50 µl pro Zell-Lysat 1 h rotierend bei 4°C präinkubiert. Zum Schutz vor Proteasen, und aufgrund der Eigenschaft, dass viele Proteine in Zell-Lysaten bei Erwärmung aggregieren, wurden alle Arbeitsschritte bei 0°C - 4°C durchgeführt.

Die für die Immunpräzipitation und Westernblot-Analysen verwendeten Antikörper wurden von Norbert Koch & Jürgen Neumann, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn, zur Verfügung gestellt (Neumann & Koch, 2006). li Moleküle wurde mit 2 µl Bu45 Antikörper (Wraight et al., 1990) immunpräzipitiert. Anschließend wurde zum Lysat (400 µl) 1 µl des Sekundärantikörpers (Maus-anti-Ratte) und 20 µl Protein A-Sepharose (AMERSHAM PHARMACIA BIOTECH, Piscataway, NJ), welche mit 200 µl ST-Puffer (Saline Tris Puffer, siehe Tab. 27) gewaschen wurde (Zentrifugation: 4000 UpM, 2 min.), hinzugegeben und über Nacht bei 4°C rotierend inkubiert. Anschließend wurden die Protein A-Sepharosebeads-Immunkomplexe durch Zentrifugation (4000 UpM, 2 min.) abgetrennt. Zur Nachdetektion (Nach IP) von MHC Klasse-II Molekülen wurde dieser Überstand mit 25 µl des SCR3 Antikörpers (Watanabe et al., 1983) über Nacht bei 4°C inkubiert. Die Präzipitate und die Nach-Präzipitate wurden drei Mal mit Waschpuffer (siehe Tab. 28) gewaschen, um adhärierende Lysatreste von der Matrix zu entfernen. Die immunpräzipitierten Proteine wurden dann durch Inkubation mit 25 µl SDS-Probenpuffer (Lämmli-Puffer) von der Matrix abgelöst und 5 min. bei 95°C aufgeköcht. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (14000 UpM, 1 min.) und mittels SDS-PAGE (siehe Kapitel 2.8.4) aufgetrennt.

**Tab. 27: ST-Puffer (1 x), pH 7,5.** Gesamtvolumen 1 l

Reagenz	Volumen	Konzentration
NaCL	8,18 g	140 mM
Tris-Base	1,21 g	10 mM
dd H2O	ad 1 l	

**Tab. 28: Waschpuffer.**

Reagenz	Volumen	Konzentration
1 x ST-Puffer	8,4 ml	
2,5 % NP40	3,6 ml	1 %
Complete	0,24 ml	

#### 2.8.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Westernblot-Analyse

Die Westernblot-Analyse stellt eine Methode zur Detektion des immunpräzipitierten Proteins dar. Im Prinzip werden die Proteine im Lysat in der SDS-PAGE separiert und können anschließend durch die starke negative Ladung der SDS-Proteinkomplexe auf eine Membran (Nitrozellulose oder PVDF) elektrotransferiert werden. Das Proteinmuster des Gels bleibt dabei auf der Membran erhalten. Auf dieser Membran lassen sich die transferierten Proteine mit geeigneten Antikörpern nachweisen. Die Bindung dieser spezifischen Primärantikörper wird durch enzymgekoppelte Sekundärantikörper und einer Farb- oder Lumineszenzreaktion sichtbar gemacht.

Die Auftrennung der Proteine nach (Laemmli, 1970) erfolgte nach der Vorschrift 'MINIGEL und MINIGEL-TWIN' (BIOMETRA, Göttingen) auf 10 %-igen Polyacrylamid-Gelen (Spannung 12 V/cm<sup>2</sup>), die anschließend mit Hilfe des semi-trockenen Fastblot-Systems (BIOMETRA) auf Nitrocellulosemembranen geblottet wurden. Das Gel der Pulse Chase-Experimente wurde jedoch nach Beendigung der Elektrophorese 30 min. lang zur Verstärkung und Verschärfung der Gelbanden in DMSO, DPO (ROTH, KARLSRUHE) entwässert. Im Anschluss wurde das Gel in ddH<sub>2</sub>O 30 min. unter Schwenken gewaschen. Zur qualitativen Auswertung des Gels wurden die radioaktiven Banden auf Röntgenfilmen sichtbar gemacht. Je nach Markierungsintensität wurde der Röntgenfilm bei -70°C 4 - 48 h mit dem Gel belichtet und dann entwickelt.

Der Transfer der nicht radioaktiv markierten Immunpräzipitate erfolgte bei einer konstanten Stromstärke von 1mA/cm<sup>2</sup> für 60 - 90 min. Um unspezifische Bindungen zu blocken, wurde die Membran mit ROTI-BLOCK (1x, ROTH, KARLSRUHE) für 1 h bei RT inkubiert. Folgende Antikörper wurden verwendet: mAk 1B5 (anti-DR- $\alpha$ -Kette der MHC Klasse-II Moleküle, Adams et al., 1993) und mAk Bu43 (anti-I $\beta$ 33), (Wraight et al., 1990), mAk DM.K8 (anti-DM $\beta$ ) und mAk 5C1 (anti-DM $\alpha$ , (Adams et al., 1983). Der mAk AC40 (SIGMA, TAUFKIRCHEN, GERMANY), welcher  $\beta$ -Actin bindet, wurde zur Lysekontrolle verwendet (siehe Kapitel 2.8.2). Die Membran wurde anschließend mit einem Peroxidase (POD)-gekoppelten anti-Maus Sekundärantikörper (SIGMA, TAUFKIRCHEN) 45 min. inkubiert und dreimal für 10 min. mit PBS + 0,2 % Tween20 gewaschen. Anschließend wurde die Membran in einen Transparentbeutel eingeschweißt und überschüssiger Waschpuffer entfernt. Die Detektion des gebundenen POD-markierten Sekundärantikörpers erfolgte mit dem 'ECL WESTERNBLOT DETECTION KIT' (AMERSHAM, BIOSCIENCE, USA). Demnach wurde Reagenz A und B in einem Verhältnis 1:1 gemischt und die Membran für 1 min. inkubiert. Anschließend wurde ECL-Lösung entfernt und der Beutel vollständig verschweißt und in eine Röntgenkassette gelegt. Die Messung des Substratumsatzes erfolgte autoradiographisch in der Dunkelkammer (Entwicklungsdauer des Röntgenfilms betrug 5 min.).

**Tab. 29: Trenngel.** Ansatz für 4 Gele (10 x 8 cm).

Reagenz	Volumen	Konzentration
1 x ST-Puffer	8,4 ml	
2,5 % NP40	3,6 ml	1 %
PMSF		1 mM
Aprotinin		7 mU/ml

## 2.9 Funktionelle Untersuchungen zur Induktion proliferativer T-Zellantworten

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die beiden zentralen Zelltypen der primären Immunantwort eingesetzt: In autologen und allogenen Testsystemen sollte, wie nachfolgend beschrieben, die immunstimulatorische Kapazität der DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup> als stimulierende Zellen gegenüber T-Zellen als Responderzellen untersucht werden.

### 2.9.1 T-Zell-Proliferationsversuche

Mit Hilfe von Proliferationsversuchen wurde die antigen-präsentierende Funktion der *in vitro* generierten DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup> gegenüber autologen bzw. allogenen T-Zellen untersucht. Dabei handelt es sich um eine Methode, bei der die proliferative T-Zellantwort als Maß für die immunstimulatorische Kapazität von APCs eingesetzt wird. Das Prinzip dieser Methode besteht darin, dass radioaktives Material zur Kokultur hinzugegeben wird und über die Markierung zu verfolgt werden kann, was die Zelle an radioaktiven Material bei der Zellteilung umsetzt. Zudem lässt sich die Wirksamkeit von immunsupprimierenden Faktoren oder die Rolle einzelner Moleküle durch *in vitro* Tests mit Hilfe dieser Kokultorexperimenten untersuchen.

In einem allogenen *in vitro* Modell stammen die T-Zellen von verschiedenen Donoren. Sind die DCs in ihren HLA-Antigenen unterschiedlich, werden CD4<sup>+</sup> - und CD8<sup>+</sup> T-Zellen in der Kokultur zur Proliferation angeregt, weil sie die fremden oder allogenen HLA- Moleküle erkennen, worauf sie durch Zellteilung reagieren und zu T-Effektorzellen ausdifferenzieren. Während bei allogenen Kokultorexperimenten die Stimulatoren und die Effektoren von verschiedenen Donoren stammen, werden in autologen Proliferationsversuchen antigen-beladenen DCs und T-Zellen eines Spenders verwendet.

#### 2.9.1.1 Induktion antigen-spezifischer und polyklonaler T-Zellantworten

T-Zellen wurden in 96-Well Rundbodenplatten mit reifen DCs an Tag 7 (mDCs) oder unreifen DCs an Tag 7 (iDCs) in T-Zellmedium kokultiviert. Die DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> wurden sorgfältig auf die entsprechende Zell-Konzentration eingestellt. Dabei wurde zunächst die Quantität der CD1a<sup>+</sup> DCs durchflusszytometrisch ermittelt. Bei autologen Kokultorexperimenten wurden anschließend die DCs für 4 h bei 37°C mit 50 Lf/ml (*Limes flocculationis*) des Antigens Tetanus Toxoid (TT, CHIRON BEHRING, Marburg) inkubiert, wobei zur Kontrolle für eine antigen-spezifische Immunantwort der Ansatz mit ungepulsten

DCs diente, d.h. ohne exogene Beladung mit Antigen. Die Lf-Einheiten oder Flockungseinheit des Antigens geben den Gehalt an spezifischem Protein an und sind ein Maß für die Immunreaktivität des Toxoids. Im Gegensatz zu autologen Proliferationsversuchen wurden in allogenen Kokultorexperimenten ungepulste DCs verwendet. Die Reifung der DCs wurde im Anschluss mit Hilfe von Poly (I:C) (25 µg/ml) für weitere 24 h erreicht. Sowohl die Antigenaufnahme als auch die Maturation der DCs erfolgte, wenn nicht anders beschrieben, in den entsprechenden Kulturbedingungen, d.h. im trp-Mangelmedium bzw. normalen Kulturmedium. T-Zellen wurden auf eine Konzentration von  $0,5 \times 10^6$ /ml T-Zell-Kulturmedium eingestellt und im Verhältnis 1 : 100 entsprechend mit DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> in einem Endvolumen von 200 µl/Well kultiviert ( $1 \times 10^3$  DCs :  $1 \times 10^5$  T-Zellen/Well). Pro Bedingung wurden 5 Wells angesetzt, wobei T-Zellen sowie DCs alleine als negative Kontrolle dienten.

Bedingung/Well:	Medium	+ $1 \times 10^5$ T-Zellen	+ $1 \times 10^3$ mDCs	+TT
Kontrollbed./Well:	Medium			
	Medium	+ $1 \times 10^5$ T-Zellen		
	Medium		+ $1 \times 10^3$ mDCs	
	Medium	+ $1 \times 10^5$ T-Zellen	+ $1 \times 10^3$ mDCs	

Nach 6 Tagen Kultur bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> wurde 1 µCi von [<sup>3</sup>H]-Thymidin hinzupipettiert und für weitere 24 h inkubiert. Nur sich replizierende T-Zellen können das [<sup>3</sup>H]-Thymidin in ihre DNA einbauen. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die [<sup>3</sup>H]-Thymidin-markierten Zellen bei -20°C gelagert und anschließend durch einen FILTERMATE™ Harvester (PACKARD, CANBERRA, Australien) auf 'Glass Fiber' Filter (PACKARD) transferiert. Die Aufnahme des Thymidins wurde als emittierende beta-Strahlung im Liquid-Scintillations-Verfahren mit Hilfe eines LSC Counters (Liquid Scintillation & Luminescence Counters, Modell: 1450 MICROBETA™ TRILUX) von der Firma PERKIN ELMER quantifiziert. Als Maß für die Proliferation wurden 'counts per minute' (cpm) angegeben, welche die Menge des eingebauten Thymidins repräsentieren. Zur Auswertung der antigen-spezifischen T-Zellantwort wurde der cpm Mittelwert (MW) der fünf Wells gebildet. Wie nachstehend beschrieben, wurden im ähnlichen Versuchsaufbau zusätzlich Blockierungsexperimente durchgeführt. Die proliferierenden autologen T-Zellen wurden zudem durchflusszytometrisch phänotypisiert sowie über autoMACS® Separation für nachfolgende Experimente aufgereinigt (siehe Kapitel 2.9.1.3).

### 2.9.1.2 Blockierungsexperimente mit anti-ILT3

Um die Wirkung des inhibitorischen Rezeptors ILT3 auf die Induktion von Foxp3<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu untersuchen, erfolgten autologe Kokultorexperimente, wie im vorigem Kapitel beschrieben, in einer 96-Well Rundbodenplatte, wobei in einem zusätzlichen Ansatz der Blockierungsantikörper anti-ILT3 (R&D SYSTEMS, Wiesbaden) in einer Endkonzentration von 10 µg/ml eingesetzt wurde. Zunächst wurden die DCs<sup>-trp</sup> bzw. DCs<sup>+trp</sup> ( $1 \times 10^3$  Zellen/Well)

30 min. bei 37°C in T-Zellmedium und dem anti-ILT3 mAk inkubiert bevor sie mit den T-Zellen ( $1 \times 10^5$  Zellen/Well) kokultiviert wurden. Pro Bedingung wurden 3 Wells angesetzt:

Bedingung/Well:	Medium	+ $1 \times 10^5$ T-Zellen	+ $1 \times 10^3$ mDCs +TT	
	Medium	+ $1 \times 10^5$ T-Zellen	+ $1 \times 10^3$ mDCs +TT	+ anti-ILT3
Kontrollbed./Well:	Medium			
	Medium	+ $1 \times 10^5$ T-Zellen		
	Medium	+ $1 \times 10^5$ T-Zellen		+ anti-ILT3
	Medium		+ $1 \times 10^3$ mDCs	
	Medium	+ $1 \times 10^5$ T-Zellen	+ $1 \times 10^3$ mDCs	

Ebenfalls erfolgte nach 6 Tagen MLR die Markierung der Zellen mit [ $^3$ H]-Thymidin. Zusätzlich wurden proliferierende autologe CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 7 Tagen Kultur in einem Parallelansatz durchflusszytometrisch analysiert. Aufgrund der Übersichtlichkeit wurden die

### 2.9.1.3 Immunphäotypisierung antigen-stimulierter T-Zellen

Um die Bedeutung von DC<sup>-trp</sup> in der Induktion des Treg-Markers Foxp3 in antigen-stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup>) in Hinblick auf eine immunmodulatorische Wirkung auf T-Zellen zu klären, wurden durchflusszytometrische Untersuchungen vorgenommen. Zur Immunphäotypisierung wurden autologe Proliferations-Ansätze durchgeführt (Kapitel 2.9.1.1), denen nicht [ $^3$ H]-Thymidin zugesetzt wurde.

Um T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> und T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup> immunphäotypisch zu charakterisieren, wurden die Wells der Kokulturen an d7 geerntet und die Oberflächenexpression von CD4 und dem Aktivierungsmarkern CD25 als Teil des IL-2 Rezeptors analysiert. In der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Populationen der einfach-positiven und doppel-positiven T<sub>DCs</sub> getrennt betrachtet. Bei den CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>DCs</sub> erfolgte eine zusätzliche Unterteilung in eine CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Zellpopulation, die CD25 stark exprimierte (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>) und eine Population, welche CD25 intermediär exprimierte (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>int</sup>) und die für CD25 negativ war (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>).

Neben der Bestimmung der Oberflächenexpression von CD25 und CD45RO auf T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> und T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup> erfolgte die positive Separation der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellpopulation mit Hilfe des MACS<sup>®</sup> Systems über magnetische *Beads* gegen CD25 (siehe Kapitel 2.9.2.1). In der anschließenden intrazellulären FACS-Analyse wurde die Expression von Foxp3 untersucht. Zur Bestimmung der Expression spezifischer T-Zellmarker und Treg-Marker wurden antigen-spezifischen T-Effektorzellen mit verschiedenen Kombinationen von FITC-, APC-, Alexa Fluor<sup>®</sup> 647 oder PE-konjugierten mAk inkubiert und anschließend mittels Durchflusszytometrie ausgewertet (siehe Kapitel 2.6.1). Eingesetzt wurden dazu folgende mAk: CD4, CD25, CD45RO und Foxp3. Eine genaue Auflistung der eingesetzten Antikörper befindet sich im Anhang (Kapitel 6.2).

## 2.9.2 Suppressions-Assays

Um die regulatorische Funktion der  $T_{DCs}^{-trp}$  und  $T_{DCs}^{+trp}$  nachzuweisen, wurden zusätzlich zur Bestimmung des typischen Treg-Marker FoxP3 auch funktionelle Untersuchungen durchgeführt, bei denen die suppressive Aktivität der Zellen gezeigt werden sollte.

### 2.9.2.1 Suppression antigen-stimulierter T-Zellen

Die Anreicherung der  $CD4^+ CD25^+ T_{DCs}^{-trp}$  bzw.  $T_{DCs}^{+trp}$  über den autoMACS<sup>®</sup> Separator erfolgte nach 7-tägiger autologer MLR in einem Ansatz mit mindestens 90 Wells ( $2 \times 10^3$  DCs :  $2 \times 10^5$  T-Zellen/Well) für die entsprechenden Kulturbedingungen (siehe Kapitel 2.9.1.1). Die Zellen wurden mit Hilfe des HUMAN  $CD4^+ CD25^+$  REGULATORY T CELL ISOLATION KIT (MILTENYI BIOTEC) aufgereinigt unter Anleitung des beigefügten Protokolls. Die angereicherten  $CD4^+ CD25^{high}$  T-Zellen wurden weitere 7 Tage mit autologen  $CD4^+$  T-Zellen und mit TT beladenen  $mDCs^{+trp}$  in einem Endvolumen von 200  $\mu$ l T-Zellmedium/Well kultiviert ( $1 \times 10^5 T_{DCs} : 1 \times 10^3 DCs : 1 \times 10^5$  T-Zellen/Well). Aufgrund der begrenzten Zellzahl wurden pro Bedingung 3 Wells angesetzt, wobei T-Zellen,  $mDCs^{+trp}$  sowie  $CD4^+ CD25^+ T_{DCs}$  alleine als Kontrollen dienten.

Bedingung/Well:	Medium	+ 1 x10 <sup>5</sup> T-Zellen	+ 1 x10 <sup>3</sup> mDCs <sup>+trp</sup> +TT	+ 1x10 <sup>5</sup> T <sub>DCs</sub>
	Medium	+ 1 x10 <sup>5</sup> T-Zellen	+ 1 x10 <sup>3</sup> mDCs <sup>+trp</sup> +TT	
Kontrollbed./Well:	Medium			
	Medium	+ 1 x10 <sup>5</sup> T-Zellen		
	Medium		+ 1 x10 <sup>3</sup> mDCs <sup>+trp</sup> +TT	
	Medium		+ 1 x10 <sup>3</sup> mDCs <sup>+trp</sup> +TT	+ 1x10 <sup>5</sup> T <sub>DCs</sub>
	Medium			+ 1x10 <sup>5</sup> T <sub>DCs</sub>

Nach 6 Tagen Kultur wurde 1  $\mu$ Ci von [<sup>3</sup>H]-Thymidin zugegeben und für weitere 24 h inkubiert. Nach Ende der Inkubationszeit wurden die [<sup>3</sup>H]-Thymidin-markierten Zellen bei -20°C gelagert und, wie bereits in Kapitel 2.9.1.1 beschrieben, die Aufnahme des Thymidins gemessen. Zur Auswertung wurde der Mittelwert der jeweiligen Triplikate gebildet.

### 2.9.2.2 Suppression polyklonal-stimulierter T-Zellen

Die Markierung der T-Zellen erfolgte mit Hilfe des intrazellulären Farbstoffes Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester (CFSE), wobei das CELLTRACE<sup>™</sup> CFSE CELL PROLIFERATION KIT (INVITROGEN, KARLSRUHE) verwendet wurde. Bei CFSE handelt sich um einen Fluoreszenzfarbstoff, der intrazellulär kovalent an Makromoleküle in der Zellmembran bindet. Bei jeder Zellteilung verteilt sich der Farbstoff auf die beiden Tochterzellen und wird somit verdünnt, d.h. seine Intensität im Durchflusszytometer nimmt mit jeder Zellteilung kontinuierlich ab. Mit Hilfe dieser Methode kann man die Anzahl der Zellzyklen, die eine Zelle durchläuft, nachweisen. Da es sich bei CFSE um ein gegenüber Licht instabiles Molekül handelt, wurden alle Versuchsschritte lichtgeschützt durchgeführt.

Die mittels Dichtezentrifugation und MACS-Separation isolierten T-Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und auf eine Zellzahl von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt. Pro ml Zellsuspension wurden 10  $\mu$ l CFSE (50  $\mu$ M/ml Stock-Lösung) in einer Endkonzentration von 0,5  $\mu$ M/ml zugegeben und die Zellen lichtgeschützt bei RT für 12 min. inkubiert. Um den Färbevorgang zu stoppen, wurde zu den Zellen das 5-fache Volumen eiskaltes T-Zell-Kulturmedium hinzugegeben. Nach 5 min. Inkubation auf Eis erfolgte ein Zentrifugationsschritt (900 UpM, 10 min., 4°C). Anschließend wurden die Zellen zweimal mit dem 5-fachen Volumen T-Zell-Kulturmedium gewaschen und erneut die Zellzahl bestimmt.

Die über MACS-Separation isolierten  $CD4^+ CD25^+ T_{DCs}^{-trp}$  bzw.  $T_{DCs}^{+trp}$  der autologen MLR (siehe Kapitel 2.9.2.1) wurden mit CFSE-markierten  $CD4^+$  T-Zellen in einem Endvolumen von 200  $\mu$ l T-Zell-Medium kultiviert und mit platten-gebundenem anti-CD3 (10  $\mu$ g/ml; R&D SYSTEMS, Wiesbaden) polykonal in einer 96-Well Flachbodenplatten stimuliert ( $1 \times 10^5 T_{DCs}^- : 1 \times 10^5$  T-Zellen/Well). Zur Bestimmung der Zellteilungsaktivität wurden die T-Zellen nach 40 h, 68 h, und 92 h durchflusszytometrisch analysiert. Aufgrund der begrenzten Zellzahl wurden in diesem Ansatz pro Bedingung 3 Wells angesetzt, wobei unstimulierte T-Zellen und stimulierten T-Zellen alleine als Kontrollen dienten.

## 2.10 Statistik

Für die statistische Analyse wurde die SPSS+™ 12.0 Software verwendet, wobei die grafische Darstellung mit Hilfe von MICROSOFT® EXCEL 2003 erfolgte. Soweit nicht anders angegeben, sind alle Daten als Mittelwert (MW)  $\pm$  Standardfehler (SEM, Standard Error of the Mean) aufgeführt. Für die Analyse nicht normalverteilter Daten wurde der WILCOXON Test und für normalverteilte Daten STUDENT'S t-Test für gepaarte Stichproben verwendet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0,05$  wurde als signifikant gewertet.



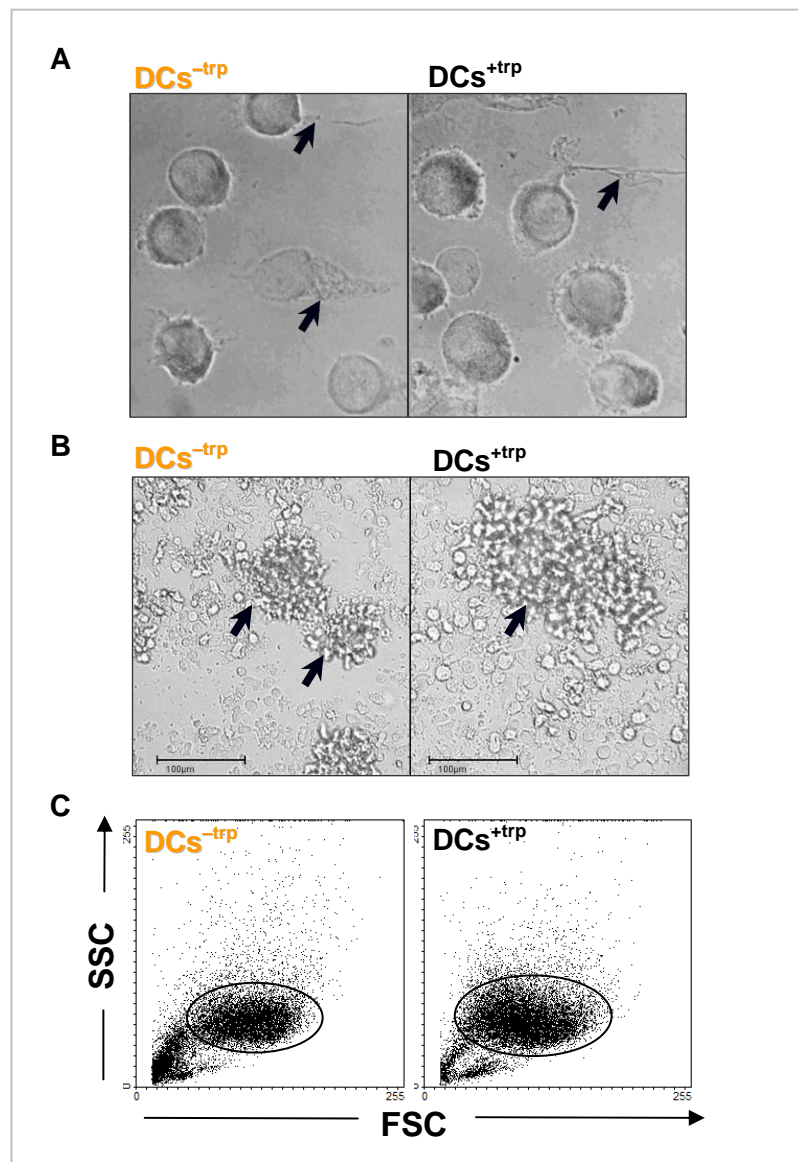
### 3 ERGEBNISSE

Die Bedeutung derIDO bedingten Tryptophan (trp) - Degradation und ihr tolerogener Effekt auf T-Zellen ist mehrfach in der Literatur beschrieben worden und von aktuellem Interesse, insbesondere im Bereich der Tumor- und Transplantationsforschung, bei der Steuerung allergischer Immunantworten sowie bei Autoimmunerkrankungen (von Bubnoff et al., 2004; Popov et al., 2006; von Bergwelt-Baildon et al., 2006; Puccetti & Grohmann, 2007; Munn & Mellor, 2007; Scheler et al., 2007; Romani et al., 2008). Es ist denkbar, dass die lokale Expression von IDO im Gewebe bzw. ein trp-verarmtes Mikromilieu nicht ausschließlich zur Proliferationsinhibition von T-Effektorzellen führt, sondern auch die APCs selbst beeinflusst. Um dies zu klären, wurde im Rahmen dieser Arbeit die Auswirkung des trp-Mangels auf myeloischen DCs untersucht. Zu diesem Zweck wurden humane DCs aus Monozyten während ihrer 6-tägigen Differenzierung sowohl unter trp-Mangel (DCs<sup>-trp</sup>) als auch unter normalen Zellkulturbedingungen (DCs<sup>+trp</sup>) generiert. Die in dieser Arbeit verwendete Methode der Gradientenzentrifugation erlaubt ein relativ einfaches Anreichern von Monozyten aus dem peripheren Blut. Durch die Kombination von GM-CSF und IL-4 lassen sich *in vitro* ausreichende Mengen an unreifen DCs aus Monozyten differenzieren (Akagawa et al., 1996). Die so generierten myeloischen DCs wurden in der vorliegenden Arbeit über den membranständigen DC-Marker CD1a durchflusszytometrisch charakterisiert. Sowohl Langerhans Zellen als auch dermale DCs exprimieren den Lipid-präsentierenden Didehydroxymycobactin Rezeptor CD1a (Hunger et al., 2004; Koch et al., 2006). Die Ausreifung der DCs erfolgte an d6 TLR3-vermittelt, in den entsprechenden Medien (DCs<sup>-trp</sup> = 5 µM trp; DCs<sup>+trp</sup> = 30 µM trp). Mit Hilfe von immunologischen, molekularbiologischen und proteinchemischen Methoden wurden unreife (immature) (iDCs) und reife (mature) DCs (mDCs) aus beiden Kulturbedingungen auf ihre Differenzierung, ihre Reifung, ihre Vitalität sowie ihre Sensitivität gegenüber Apoptoseinduktion untersucht. Zudem sollte überprüft werden, ob durch trp-Mangel die Induktion einer Stressantwort in DCs eingeleitet wird. Nach der immunphänotypischen Analyse der DCs wurde des Weiteren getestet, ob der trp-Mangel die Antigenaufnahme und die immunstimulatorische Funktion dendritischer Zellen beeinflusst. Ferner wurde die Frage bearbeitet, inwieweit DCs<sup>-trp</sup> dazu beitragen, die Generierung von regulatorische T-Zellen zu fördern. Die resultierenden Ergebnisse werden in den folgenden Kapiteln vergleichend beschrieben.

#### 3.1 Morphologie der DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup>

Die Monozyten wurden aus frischem peripheren Blut oder aus Leukozytenkonzentrat isoliert und mit trp-Mangelmedium (5 µM trp), das mit 500 U/ml GM-CSF und 500 U/ml IL-4 supplementiert war, kultiviert und mit DCs verglichen, die unter normalen Zellkulturbedingungen (30 µM trp) generiert wurden. Nach 6 Tagen konnte in beiden Versuchsansätzen lichtmikroskopisch der typische Phänotyp unreifer DCs (Abb. 4A) mit großen Zellkörpern und feinen zytoplasmatischen Ausläufern, den Dendriten, detektiert werden. Wie in Abb. 4B deutlich zu erkennen, zeigten DCs kleinere bis größere Cluster auf dem

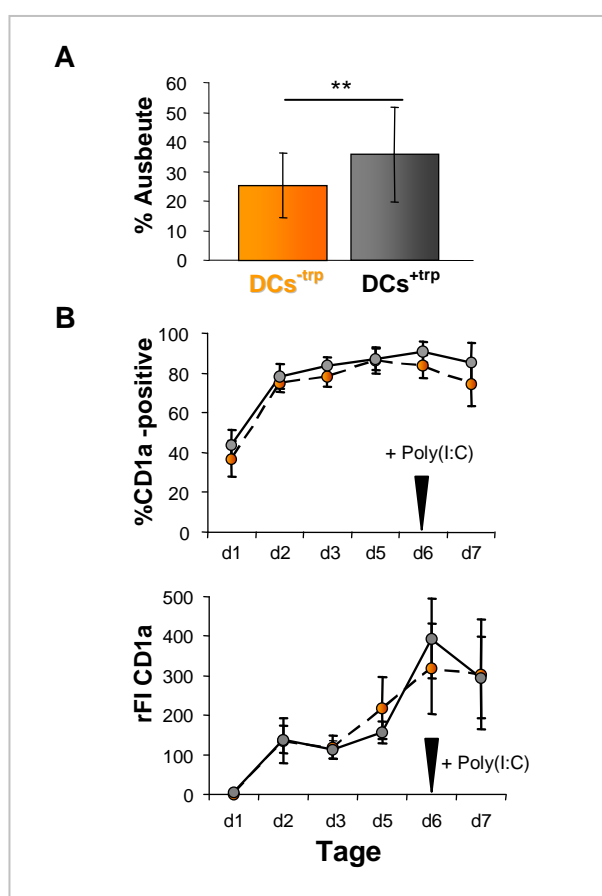
Zellkulturplattenboden, auf dem sie nur leicht anhafteten. Da DCs keinen konfluenten Zellrasen bilden und sie leicht von der Platte abzulösen sind, werden sie als semi-adhären bezeichnet. Im Gegensatz zu DCs<sup>+trp</sup> wiesen DCs<sup>-trp</sup> jedoch eine geringere Zell- und Clustergröße auf. Ferner bestätigte die durchflusszytometrische Analyse im FSC (Vorwärtsstreulicht) den Unterschied in der Einzelzellgröße. Auch konnte, dargestellt durch den niedrigeren SSC (Seitwärtsstreulicht), eine geringere Granularität bei DCs<sup>-trp</sup> im Vergleich zu DCs<sup>+trp</sup> beobachtet werden (Abb. 4C).



**Abb. 4A: Morphologie humaner DCs unter trp-Depletion (DCs<sup>-trp</sup>) und unter normalen Kulturbedingungen (DCs<sup>+trp</sup>).** (A) Dargestellt sind unreife DCs in einer Zellkulturplatte (Vergrößerung: 400x) an d6: Zellen aus beiden Kulturbedingungen zeigen die charakteristischen zytoplasmatischen Ausläufer. (B) Die Zellen aggregieren und bilden Clustern (Vergrößerung 100x). Im Gegensatz zu DCs<sup>+trp</sup> (r) weisen DCs<sup>-trp</sup> (l) jedoch eine geringere Zell- und Clustergröße auf. (C) Die Punktdiagramme stellen die durchflusszytometrisch analysierten DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup> im Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht (FSC/SSC) dar. Die Markierung grenzt die entsprechenden Zellpopulationen im physikalischen 'Gate' morphologisch ein. Auch hier zeigt sich anhand des FSCs eine geringere Zellgröße bei DCs<sup>-trp</sup> (l) vs. DCs<sup>+trp</sup> (r) sowie eine verminderte Granularität durch den SSC. Gezeigt sind repräsentative Daten der getesteten Donoren (n ≥ 22).

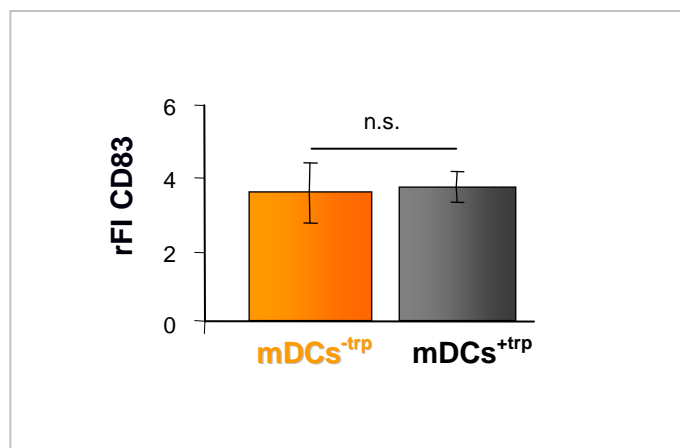
### 3.2 Generierung und Reifung myeloischer DCs unter *trp*-Mangel ist nicht eingeschränkt

Die quantitative Auswertung der Zellpopulationen der an d6 geernteten DCs<sup>+trp</sup> ergab spenderabhängig eine Ausbeute von 35 ± 15 %. Dagegen war die Ausbeute der DCs<sup>-trp</sup> im Mittel 10 % geringer und betrug 25 ± 15 %. Die Abb. 5A zeigt den signifikanten Unterschied der quantitativen Ausbeute der Zellen an d6, das heisst den prozentualen Anteil der aus Monozyten differenzierten DCs. Trotz geringerer Zell-Ausbeute unter *trp*-Mangel ergaben sich nach der Zellernte keine signifikanten Unterschiede im prozentualen Anteil CD1a exprimierender Zellen während der 6-tägigen Differenzierung aus beiden Kulturbedingungen (Abb. 5B; oberes Diagramm).



**Abb. 5: Generierung von DCs unter *trp*-Mangel (DCs<sup>-trp</sup>) vs. DCs<sup>+trp</sup>:** (A) Quantitative Ausbeute der Zellen. Das Balkendiagramm zeigt die Ausbeute, d.h. den prozentualen Anteil der aus Monozyten differenzierten DCs. Die Zellzahl aus beiden Kulturbedingungen wurde an d6 mit Hilfe einer Neubauerzählkammer ermittelt, die Zellen anschließend mit 7-AAD und dem mAk gegen CD1a gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Der prozentuale Anteil der zu DCs differenzierten Zellen unter *trp*-Mangel (DCs<sup>-trp</sup> ■) ist signifikant geringer im Vergleich zu der Ausbeute der unter normalen Kulturbedingungen generierten Zellen (DCs<sup>+trp</sup> ■) (n = 25). (B) Die beiden Verlaufsdigramme zeigen die Oberflächenexpression von CD1a während ihrer Differenzierung von Monozyten zu DCs<sup>-trp</sup> (●) und DCs<sup>+trp</sup> (●). Sowohl der prozentuale Anteil der CD1a exprimierenden Zellen (oberes Diagramm) als auch der rFI-Wert von CD1a (unteres Diagramm) weisen keinen signifikanten Unterschied auf (n = 6). Auch nach TLR3 Stimulation durch 25 µg/ml Poly(I:C) an d6 für 24 h konnte kein Unterschied in der CD1a Expression festgestellt werden. Dargestellt sind die MW ± SEM. \*P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\*P = 0,001.

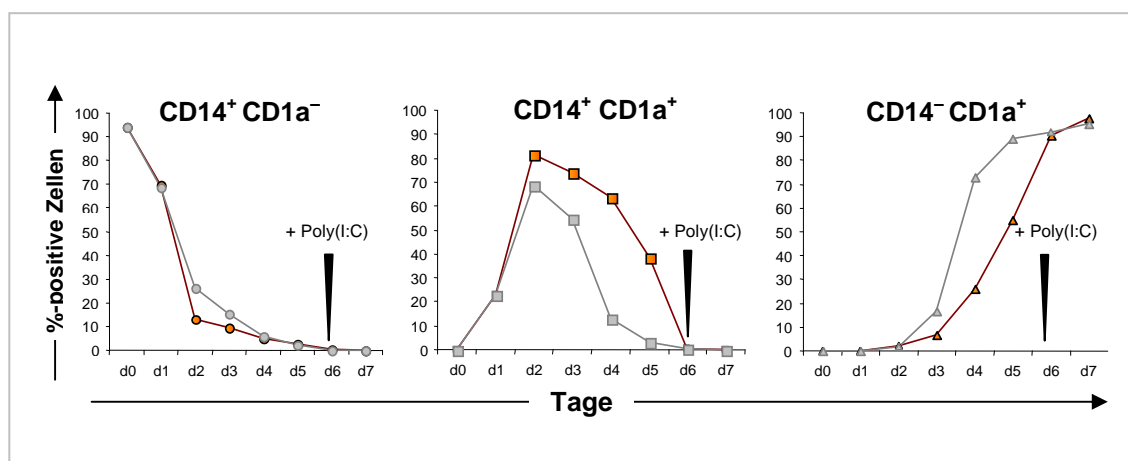
Auch nach TLR3 Stimulation durch Poly(I:C) für 24 h konnten an d7 annähernd gleiche prozentuale Werte von CD1a<sup>+</sup> DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> festgestellt werden. Des Weiteren zeigt die CD1a Kinetik, dass bereits an d3 nahezu 80 % der Zellen und an d6 80 - 90 % der Zellen aus beiden Kulturbedingungen CD1a positiv waren. Im unteren Diagramm der Abb. 5B wird der relative Fluoreszenzindex (rFI) der CD1a Färbung im Verlauf der Differenzierung dargestellt. Der rFI gibt das Verhältnis der spezifischen Bindung des Antikörpers zu der unspezifischen Bindung eines äquivalenten irrelevanten Antikörpers mit passendem Isotyp an und spiegelt somit die relative Fluoreszenzintensität des Antikörpers wieder. Neben den prozentualen Werten zeigte der rFI von CD1a auf den Zellen aus beiden Kulturbedingungen ebenfalls keinen signifikanten Unterschied auf. Die Ausreifung der DCs erfolgte an d6 mit Hilfe von Poly(I:C) für 24 h und wurde anhand des Reifungsmarkers CD83 gemessen. Die Expressionsintensität von CD83 (Abb. 6) sowie der prozentuale Anteil CD83 positiver Zellen (nicht gezeigt) zeigte in DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> keinen signifikanten Unterschied.



**Abb. 6: Reifung unter trp-Depletion (DCs<sup>-trp</sup>) vs. DCs<sup>+trp</sup>: (C)** Das Balkendiagramm zeigt die Oberflächenexpression von CD83 der durchflusszytometrisch analysierten vitalen CD1a<sup>+</sup> DCs an d7. Die Reifung durch TLR3 Stimulation erfolgte an d6 mit Hilfe von 25 µg/ml Poly(I:C) für 24 h und wurde anhand des Reifungsmarkers CD83 gemessen. Die CD83 exprimierenden mDCs<sup>-trp</sup> (■) und mDCs<sup>+trp</sup> (■) zeigen keinen signifikanten Unterschied im rFI-Wert (n = 22). Dargestellt sind die MW ± SEM. \*P <0,05; \*\* P <0,01; \*\*\*P = 0,001.

In einer weiteren Kinetik wurde auf den Zellen neben dem DC-Marker CD1a die Oberflächenexpression des monozytären Markers CD14 während der Differenzierung (d0-d7) von Monozyten zu DCs durchflusszytometrisch gemessen. Dabei ließen sich drei Subpopulationen unterscheiden: CD14 einfach-positive (EP), CD14/CD1a doppelt-positive (DP) und CD1a EP Zellen. Hierbei zeigte sich, dass ab d2 die Anteile von CD14 EP und CD14/CD1a DP Zellen sowie ab d3 der Anteil CD1a EP Zellen im Verlauf ihrer Differenzierung prozentuale Unterschiede aufwiesen (siehe Abb. 7): (i) Bei DCs<sup>-trp</sup> waren im Vergleich zu DCs<sup>+trp</sup> an d2 prozentual weniger Zellen EP für CD14 und an d2 - d5 mehr Zellen DP für CD14/CD1a (linkes und mittleres Diagramm), (ii) parallel wurde die DCs<sup>-trp</sup> zu einem späteren Zeitpunkt ihrer Differenzierung EP für CD1a im Gegensatz zu der

DCs<sup>+trp</sup> Population (rechtes Diagramm d3 - d5), d.h. länger doppelt-positiv für CD14 und CD1a (mittleres Diagramm). Insgesamt zeigen die Ergebnisse, dass die CD14 Expression auf DCs<sup>-trp</sup> gegenüber DCs<sup>+trp</sup> über einen längeren Zeitraum im Verlauf ihrer Differenzierung von Monozyten zu DCs erfolgt. Ab d6 konnte kein Unterschied in der CD14 und CD1a Expression der Zellen beider Kulturbedingungen festgestellt werden. Die Expressionsintensität von CD14 war im Gegensatz zu Monozyten bei den DP DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> sehr schwach (Monozyten rFI = 36,1; DCs<sup>-trp</sup> rFI = 2,2; DCs<sup>+trp</sup> rFI = 2,9).



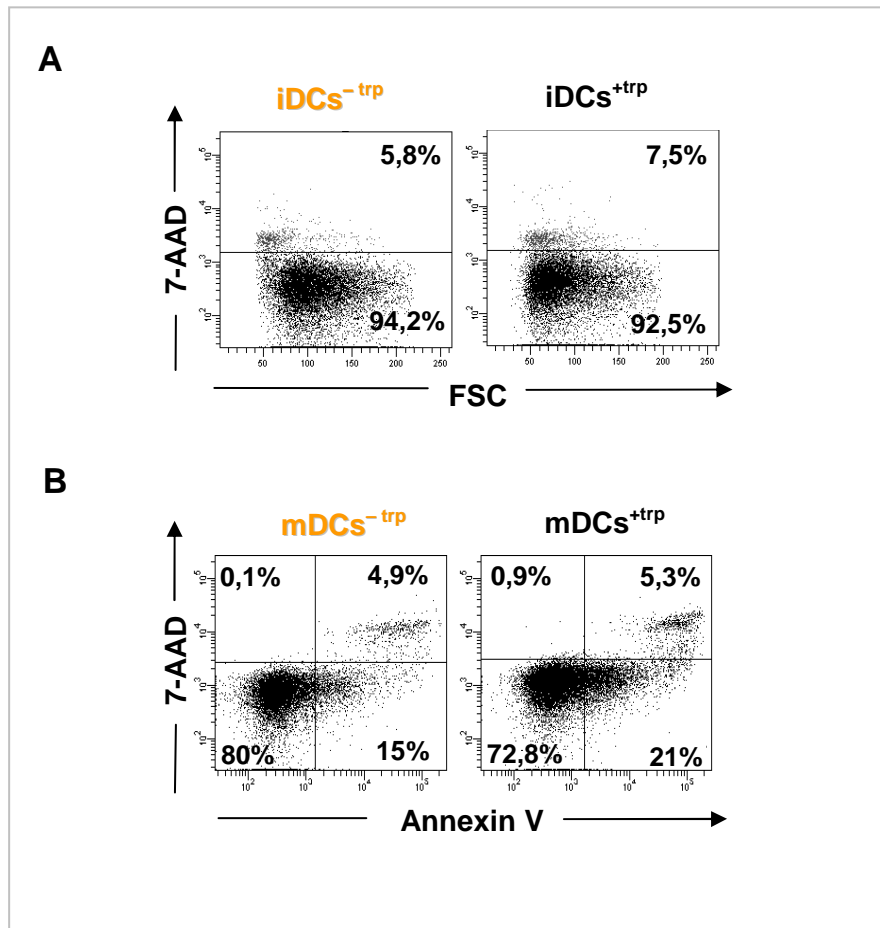
**Abb. 7: CD14 und CD1a Expression bei DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup>:** Die drei Verlaufsdiagramme zeigen die Oberflächenexpression von CD14 und CD1a während der Differenzierung von Monozyten zu DCs. Monozyten wurden unter Zugabe von IL-4 und GM-CSF sieben Tage unter trp-Mangel und normalen Kulturbedingungen zu DCs differenziert. Anschließend erfolgte zu den angegebenen Zeitpunkten eine durchflusszytometrische Analyse der CD14 und CD1a Expression. Angegeben ist die prozentuale Verteilung der vitalen CD14<sup>+</sup> CD1a<sup>-</sup> Zellen<sup>-trp</sup> (●) bzw. Zellen<sup>+trp</sup> (○), der CD14<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup> Zellen<sup>-trp</sup> (■) bzw. Zellen<sup>+trp</sup> (□) und CD14<sup>-</sup> CD1a<sup>+</sup> Zellen<sup>-trp</sup> (▲) bzw. Zellen<sup>+trp</sup> (△) Zellenpopulationen. Dargestellt sind repräsentative Daten (n = 2).

### 3.3 Vitalität und Apoptose der DCs werden nicht durch ein vermindertes trp-Angebot beeinflusst

Apoptose und primäre Nekrose stellen die Hauptformen des Zelltodes dar. Aufgrund der in der Literatur gezeigten Ergebnisse, dass trp-Mangel *in vitro* zu Apoptose in aktivierten T-Zellen führt (Munn et al., 1999; Lee et al., 2002), wurde die Auswirkung der trp-Depletion auf DCs im Verlauf ihrer Differenzierung, im Hinblick auf ihre Vitalität sowie ihre Apoptoseinduktion untersucht.

Im Rahmen der Phänotypisierung der DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> mittels durchflusszytometrischer Analysen (siehe Kapitel 3.5) erfolgte grundsätzlich eine Vitalitätsbestimmung unreifer sowie reifer DCs durch eine 7-AAD Färbung. Nur bei Zellen, deren Zellmembran verändert ist, werden intrazelluläre Proteine und DNA für 7-AAD zugänglich, so dass nekrotische Zellen in der Zellsuspension detektiert werden können. Die Auswertung der Lebend/Tod Färbung der unreifen DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> ergab im Mittel 94 - 97% vitale

Zellen in beiden Kulturen. Die im Punktdiagramm dargestellte 7-AAD Färbung am Beispiel unreifer DCs (Abb. 8A) zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen  $iDCs^{-trp}$  und  $iDCs^{+trp}$ . Auch nach TLR3 Stimulation durch Poly(I:C) für 24 h waren die Zellen vital, und es konnte kein Unterschied zwischen beiden Zellkulturen festgestellt werden.



**Abb. 8: Vitalität und Apoptoserate dendritischer Zellen unter  $trp$ -Depletion ( $DCs^{-trp}$ ) und unter normalen Kulturbedingungen ( $DCs^{+trp}$ ) (A) Vitalität: iDCs wurden mit 7-AAD gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Das Punktdiagramm zeigt durch die negative 7-AAD Färbung die vitalen Zellen aus beiden Kulturbedingungen. Dargestellt sind repräsentative Daten ( $n \geq 25$ ). (B) Apoptoserate: mDCs wurden mit FITC-gekoppeltem Annexin V, 7-AAD und anti-CD1a mAk in der PE-Fluoreszenz gefärbt, wobei der Quadrant mit Hilfe der Kontrollen gesetzt wurde. Die EP Zellen für Annexin stellen DCs dar, die sich in der frühen Phase der Apoptose befinden, während die DP Zellen für Annexin V und 7-AAD sich in der späten Phase der Apoptose (sekundär nekrotisch) befinden bzw. es sich hierbei um primär nekrotische Zellen handelt. Der Apoptosetest zeigt keinen erheblichen Unterschied in der Apoptoserate der Zellen beider Kulturbedingungen. Dargestellt sind repräsentative Daten ( $n = 4$ ).**

Ferner wurde die Apoptoserate der  $DCs^{-trp}$  und  $DCs^{+trp}$  mit Hilfe eines Annexin V-Tests bestimmt. Die Methode kombiniert die Eigenschaft von Annexin V, an Phosphatidylserin (PS) der Zellmembran zu binden, mit der Gegenfärbung durch 7-AAD, das zwischen Basenpaaren doppelsträngiger Nukleinsäuren interkaliert. In der frühen Phase der Apoptose kann 7-AAD nicht in die Zelle gelangen, da die Integrität der Zellmembran noch erhalten ist. Die Zellen verlieren jedoch die asymmetrische Anordnung ihrer membran-

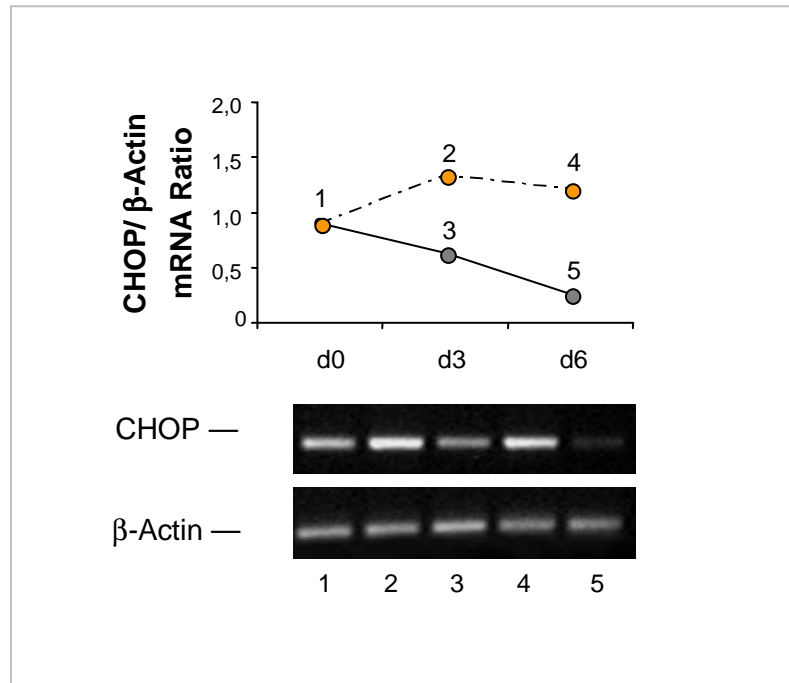
ständigen Phospholipide und PS wird von der Innen- auf die Außenseite der Zytoplasmamembran verschoben. Annexin V bindet mit hoher Affinität an PS, bevor die Hydrolyse der DNA stattfindet. Daher sind die Zellen in der frühen Phase der Apoptose 7-AAD negativ und für Annexin V einfach-positiv (EP). *In vitro* kommt es in einer späten Phase der Apoptose zu einem Verlust der Integrität der Plasmamembran und zu einer sekundären Nekrose der Zelle, so dass 7-AAD in die Zelle gelangt und diese demnach doppelt-positiv (DP) für 7-AAD und Annexin V wird. Mit dieser verwendeten Methode zum Nachweis apoptotischer Zellen ist daher kein Unterschied von primär nekrotischen und sekundär nekrotischen Zellen möglich. Wird die DC-Population im FSC/SSC morphologisch 'gegatet', können im Annexin V-FITC/7-AAD Punktdiagramm drei Zellpopulationen unterschieden werden (Abb. 8B): (i) die doppelt-negative (DN) vitale Population, (ii) die Population in der frühen Phase der Apoptose, die EP für Annexin V ist und (iii) die DP nekrotische bzw. sekundär-nekrotische Population. Die im Punktdiagramm dargestellte Annexin V-FITC/7-AAD Färbung am Beispiel reifer DCs (Abb. 8B) zeigt in den drei Zellenpopulationen keinen erheblichen Unterschied zwischen DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> sowohl bei den unreifen als auch den reifen DCs. Somit konnte die in der Literatur beschriebene apoptotische Wirkung des trp-Mangels auf aktivierte T-Zellen in DCs nicht gezeigt werden.

### 3.4 Induktion stressabhängiger Signalwege in DCs unter trp-Mangel

In Folge von ER-Stress und Aminosäure-Mangel kommt es zur Induktion von hochkonservierten Signalwegen, die für das Überleben und für die Adaption der Zelle unter Stressbedingungen essentiell sind. Während die '*Unfolded Protein Response*' (UPR) durch un- oder fehlgefaltete Proteine des ERs induziert wird, kommt es zur Aktivierung der '*Integrated Stress Response*' (ISR) in Folge von Aminosäure-Mangel durch unbeladene tRNAs. Sowohl die UPR aktivierte PERK Kinase (*PKR-like endoplasmic reticulum eIF2 $\alpha$  kinase*) als auch die Aktivierung der aminosäuresensitiven GCN2 Kinase (*general control non-depressing 2 protein kinase*) durch die ISR führen zum allgemeinen Translationsstopp bei gleichzeitiger selektiver Translation diverser Gene wie beispielsweise von Proteinen, die am Aminosäure-Import beteiligt sind, sowie dem Transkriptionsfaktor CHOP (*C/EBP homologous protein*) (Fafournoux et al., 2000; Wek et al., 2006; Zhang & Kaufman, 2006).

*In vivo* und *in vitro* wird in T-Zellen aufgrund des IDO bedingten trp-Mangels die aminosäuresensitive GCN2 Proteinkinase aktiviert, wodurch wiederum der Zellzyklus und die Differenzierung von aktivierten T-Zellen beeinflusst werden (Harding et al., 2000; Narasimhan et al., 2004; Munn et al., 2005). Um zu testen, ob die UPR und/oder die ISR Stressantwort auch in DCs durch trp-Mangel aktiviert wird und für ihre metabolische Adaption verantwortlich sein könnte, wurde die CHOP Induktion, die für die GCN2 Aktivierung in T-Zellen spezifisch ist (Munn et al., 2005), in DCs gemessen. Zu diesem Zweck wurde die CHOP Expression in Monozyten während ihrer Differenzierung zu myeloischen DCs an d0, d3 und d6 untersucht. Die Ergebnisse der semi-quantitativen RT-

PCR zeigten an d3 und d6 eine erhöhte Transkriptionsrate der CHOP mRNA in DCs<sup>-trp</sup>, während die DCs<sup>+trp</sup> die CHOP mRNA relativ zur  $\beta$ -Actin mRNA Expression herunterregulierten (Abb. 9).



**Abb. 9: Quantifizierung der CHOP RNA Transkription auf DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup>.** Semi-quantitative RT-PCR zeigt eine erhöhte Kopienzahl von CHOP mRNA bei DCs<sup>-trp</sup> (●) gegenüber DCs<sup>+trp</sup> (●) im Verlauf der Differenzierung von Monozyten zu DCs zu den angegebenen Zeitpunkten. Gezeigt ist die CHOP Kopienzahl relativ zur  $\beta$ -Actin Kopienzahl. Dargestellt sind repräsentative Daten (n = 3).

### 3.5 DCs<sup>-trp</sup> zeigen einen tolerogenen Phänotyp

Ergänzend zu den oben beschriebenen Experimenten wurden die Zellen, die im Verlauf ihrer Generierung von Monozyten zu DCs unter trp-Mangel Bedingungen bzw. unter normalen Bedingungen kultiviert wurden, immunphänotypisch charakterisiert. Die Reifung der DCs erfolgte an d6 mit Hilfe von Poly(I:C) für 24 h. Mittels spezifischer monoklonaler Antikörpern (mAk) wurden die für die Funktion der DCs wichtigen Oberflächenmoleküle auf unreifen und reifen DCs aus beiden Kulturbedingungen durchflusszytometrisch an d6 bzw. an d7 untersucht (Abb. 10).

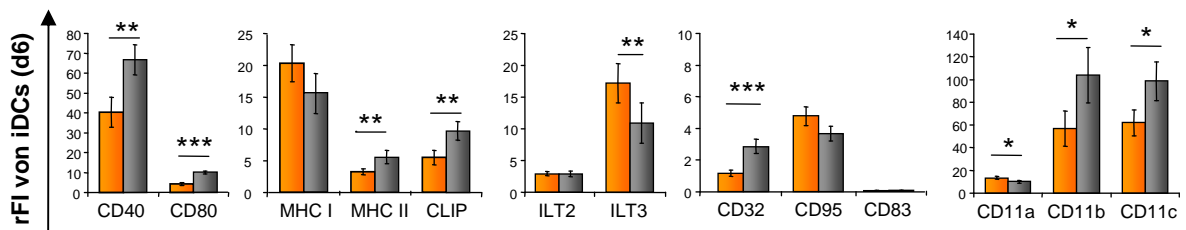
Es zeigte sich, dass sowohl auf unreifen DCs<sup>-trp</sup> als auch auf reifen DCs<sup>-trp</sup> die kostimulatorischen Moleküle wie CD40 und CD80 sowie der IgG Fc-Rezeptor Typ II (Fc $\gamma$ RII; CD32) signifikant schwächer exprimiert wurden im Vergleich zu unreifen und reifen DCs<sup>+trp</sup>. Des Weiteren erfolgte eine Immunphänotypisierung von Oberflächenmolekülen, die wichtig sind für die Antigenpräsentation. MHC Klasse-II Moleküle (MHC-II) und CLIP (*class II invariant chain peptides*) zeigten eine signifikant niedrigere



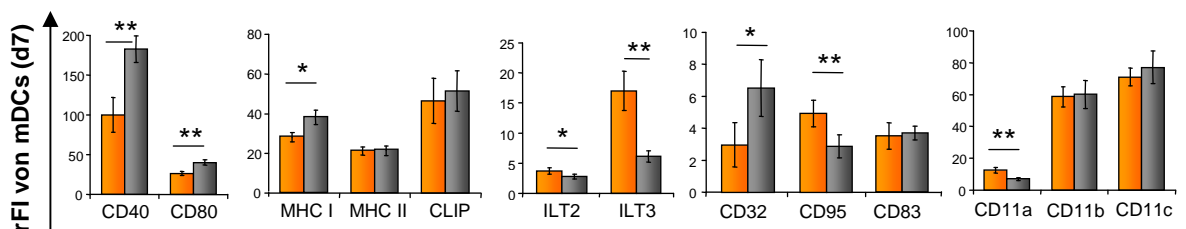
Oberflächenexpression auf unreifen DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup>. Dagegen exprimierten reife DCs<sup>-trp</sup> signifikant weniger MHC Klasse-I Moleküle (MHC-I) als DCs<sup>+trp</sup>.

Im Gegensatz zu den immunstimulatorischen Molekülen war die relative Expressionsintensität des inhibitorischen Rezeptors ILT3 (*Immunoglobulin-like transcript 3*) auf iDCs<sup>-trp</sup> signifikant stärker exprimiert als auf iDCs<sup>+trp</sup>. Zusätzlich konnte eine signifikante Hochregulierung beider inhibitorischen Rezeptoren ILT2 und ILT3 im Zuge der Reifung der DCs<sup>-trp</sup> beobachtet werden. Der Todesrezeptor FAS (CD95) zeigte ebenfalls eine signifikant stärkere Expression auf mDCs<sup>-trp</sup> gegenüber mDCs<sup>+trp</sup>, was die Wahrscheinlichkeit einer CD95/CD95L induzierten Apoptose dieser Zellen erhöht. Die Expression des klassischen Reifungsmarkers CD83 für DCs zeigte in beiden Kulturbedingungen nach der Reifung keinen signifikanten Unterschied. Insgesamt führte die Reifung der Zellen beider Kulturbedingungen grundsätzlich zur Hochregulierung von CD40, CD80, CD83, MHC Klasse-I- und MHC Klasse-II Molekülen.

**A**



**B**

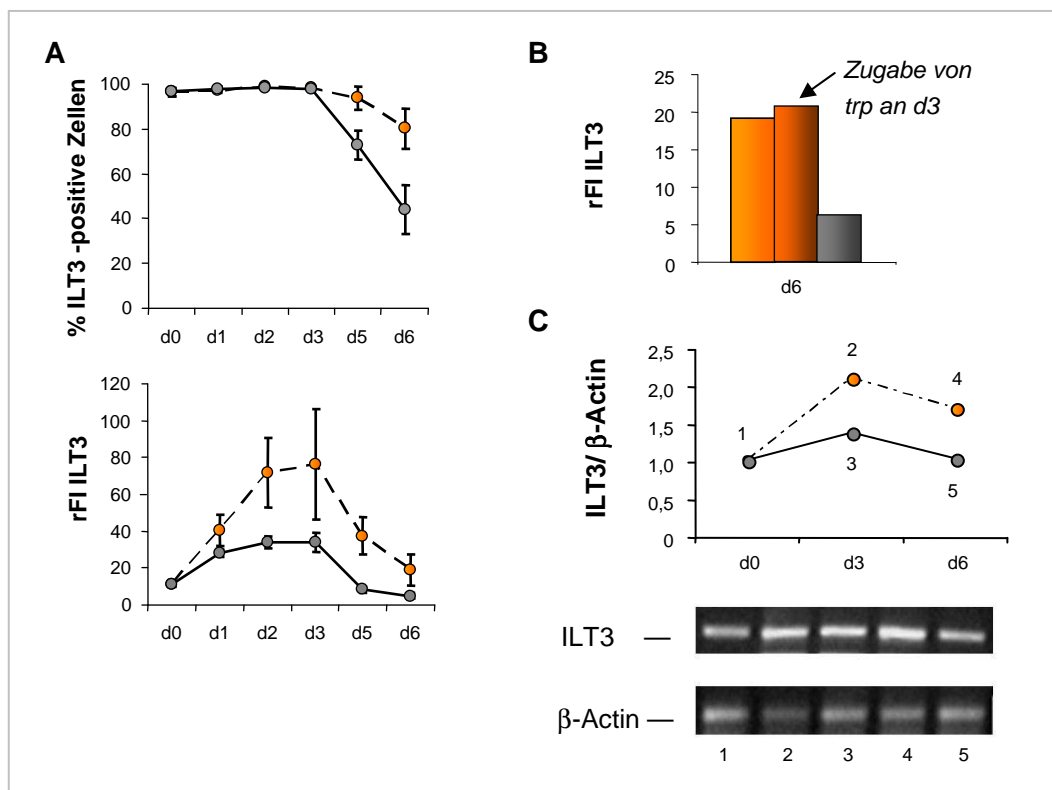


**Abb. 10: Oberflächenexpression der Antigene von reifen und unreifen DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup>.** DCs wurden 6 Tage unter trp-Mangelbedingungen (DCs<sup>-trp</sup> (■)) und unter normalen Kulturbedingungen (DCs<sup>+trp</sup> (■)) generiert. Unreife DCs (iDCs) wurden an d6 (A) und reife DCs (mDCs) an d7 (B) durchflusszytometrisch untersucht. Als Reifungsstimulus diente Poly(I:C) in einer Konzentration von 25 µg/ml für 24h. Dargestellt sind Dreifachfärbungen mit 7-AAD, anti-CD11a mAk in der PE-Fluoreszenz und verschiedene Antigene in der FITC-Fluoreszenz. Die vitale CD11a<sup>+</sup> Zellpopulation wurde mit den angegebenen Oberflächenantigenen näher charakterisiert. Dargestellt ist der rFI-Wert entsprechender Oberflächenmoleküle, welcher die jeweilige Fluoreszenzintensität (MFI) unter Berücksichtigung der unspezifischen Färbung der mAk angibt. Angegeben sind MW ± SEM von n ≥ 9. \*P <0,05; \*\*P <0,01; \*\*\*P = 0,001.

Die DCs wurden weiterhin durchflusszytometrisch auf die Expression von Adhäsionsmolekülen untersucht. Die DCs aus beiden Kulturbedingungen exprimierten zu 98 % die α-Integrine CD11a, CD11b und CD11c (nicht gezeigt). Die signifikanten Unterschiede ergaben sich in der Expressionsintensität der α-Integrine auf den Zellen (Abb.10). So

konnte festgestellt werden, dass CD11a signifikant stärker sowohl auf unreifen als auch auf reifen DCs<sup>-trp</sup> exprimiert wurde verglichen mit DCs<sup>+trp</sup>. Zudem konnte eine signifikant geringere Expression von CD11b und CD11c bei iDCs<sup>-trp</sup> gegenüber iDCs<sup>+trp</sup> nachgewiesen werden. Während mDCs<sup>+trp</sup> CD11b sowie CD11c im Verlauf ihrer Reifung herabregulierten, blieb die Expression dieser Integrine bei den mDCs<sup>-trp</sup> annähernd auf gleichem Niveau. Im Zuge der Reifung konnte der auf den unreifen DCs festgestellte Unterschied in der Expressionsintensität von CD11b und CD11c nicht mehr gezeigt werden.

Nachdem die Immunphänotypisierung der DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> eine stärkere Expression von ILT3 in Folge des trp-Mangels ergab, wurde die Oberflächenexpression des inhibitorischen ILT3 Rezeptors im Verlauf der Differenzierung von Monozyten zu DCs näher untersucht (Abb. 11A).



**Abb. 11: ILT3 Expression von DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> während der Differenzierung von Monozyten zu DCs.** (A) Durchflusszytometrische Analyse der ILT3<sup>+</sup> Zellen (d0 – d6). Die ILT3 Kinetik der Oberflächenexpression von DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> zeigt den Höchstwert der ILT3 Expression an d3 ihrer Differenzierung, wobei die DCs<sup>-trp</sup> (●) ILT3 konstant signifikant stärker exprimieren als DCs<sup>+trp</sup> (○). Angegeben sind MW ± SEM von n = 5. (B) Durchflusszytometrische Analyse der ILT3<sup>+</sup> Zellen an d6. An d3 der Zellkultur erfolgte die Zugabe von trp in einer Endkonzentration von 30 µM zu DCs<sup>-trp</sup> (■). Als Kontrolle wurden DCs<sup>-trp</sup> (□) und DCs<sup>+trp</sup> (■) ohne Gabe von trp mitgeführt. Die ILT3 Expression auf DCs<sup>-trp</sup> zeigt keinen Unterschied zu DCs<sup>-trp</sup> deren trp-Mangel Medium (5 µM trp) an d3 mit trp supplementiert wurde. Dargestellt sind die rFI-Werte eines repräsentativen Experiments (n = 2). (C) Quantifizierung der RNA Expression von ILT3 auf DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup>. Die semi-quantitative RT-PCR zeigt eine verstärkte Induktion der ILT3 mRNA in DCs<sup>-trp</sup> (●) gegenüber DCs<sup>+trp</sup> (○) im Verlauf der Differenzierung von Monozyten zu DCs zu den angegebenen Zeitpunkten. Gezeigt ist die ILT3 Kopienzahl relativ zur β-Actin Kopienzahl. Dargestellt sind repräsentative Daten (n = 3).

Die ILT3 Kinetik (Abb. 11A oberes Diagramm) zeigte, dass in den ersten 4 Tagen ihrer Differenzierung 98 % der DCs aus beiden Kulturbedingungen ILT3 auf der Zelloberfläche exprimierten. Der prozentuale Anteil an ILT3 exprimierenden DCs verringerte sich ab d5, wobei diese Abnahme viel stärker bei DCs<sup>-trp</sup> zu beobachten war. Am Ende der Differenzierungsphase an d6 betrug die prozentuale Verteilung der ILT3 exprimierenden DCs auf DCs<sup>+trp</sup> lediglich 52 % gegenüber DCs<sup>-trp</sup>, die zu 83 % ILT3 positiv waren. Die relative Intensität der ILT3 Expression auf DCs beider Kulturbedingungen (Abb. 11A unteres Diagramm) zeigte eine generelle Hochregulierung von ILT3 in den ersten 3 Tagen ihrer Differenzierung, wobei ILT3 auf DCs<sup>-trp</sup> signifikant stärker hochreguliert wurde und den Höchstwert zwischen d2 und d3 erreichte (d3 DCs<sup>-trp</sup> MW<sub>rFI</sub> = 76; DCs<sup>+trp</sup> MW<sub>rFI</sub> = 34). Anschließend sank die ILT3 Expression auf DCs im Verlauf der Differenzierung stetig von d3 bis d7 ab, jedoch blieb die Stärke der ILT3 Expression kontinuierlich signifikant erhöht auf DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup>. Die Zugabe von trp in einer Endkonzentration von 30 µM (entspricht der Konzentration des normalen Kulturmediums) an d3 der Kultur konnte den Effekt der erhöhten ILT3 Expression auf DCs<sup>-trp</sup> im weiteren Verlauf ihrer Differenzierung nicht aufheben (Abb. 11B).

Um die Unterschiede der ILT3 Expression zwischen DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> während ihrer Differenzierung mit einer weiteren Methode zu validieren, wurde eine RT-PCR zur Quantifizierung der RNA Expression von ILT3 durchgeführt (Abb. 11C). Die Ergebnisse der semi-quantitativen RT-PCR zeigten relativ zur  $\beta$ -Actin Kopienzahl eine durch trp-Mangel bedingte Erhöhung der ILT3 Transkripte in den Zellen im Verlauf ihrer Differenzierung von Monozyten zu DCs an d3 und d6 gegenüber DCs<sup>+trp</sup>, wodurch die Ergebnisse der durchflusszytometrischen Analyse bestätigt werden konnten.

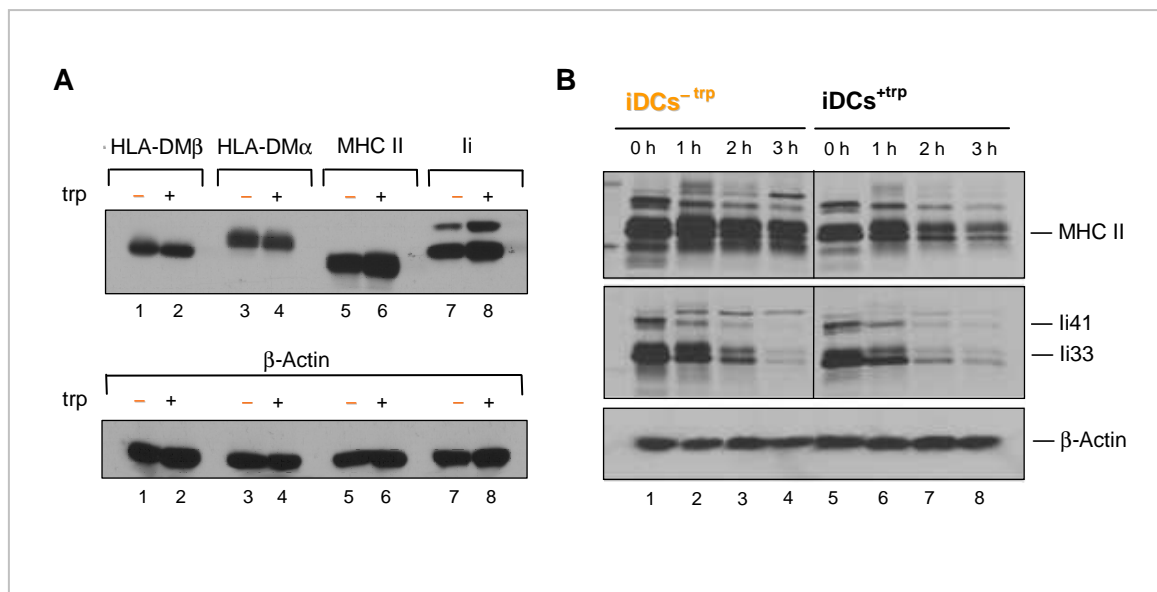
Nach Charakterisierung des immunologischen Profils lässt sich zusammenfassend formulieren, dass die unter trp-Mangel generierten DCs einen, wie in der Literatur bereits beschriebenen, tolerogenen Phänotyp aufzeigen (CD80<sub>low</sub> CD40<sub>low</sub>/ ILT3<sup>high</sup>). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die Hochregulierung des inhibitorischen Rezeptors ILT3 sehr früh in der Differenzierungsphase der Zellen durch trp-Mangel induziert wird. Es ergab sich die Frage, ob iDCs<sup>-trp</sup> durch ihre Eigenschaft als tolerogene APC-Population dazu beitragen, Toleranz gegenüber T-Zellen zu etablieren. Um dies zu klären, wurden die Zellen *in vitro* funktionellen Untersuchungen unterzogen, deren Ergebnisse in den Kapiteln 3.10 – 3.15 aufgeführt werden.

### **3.6 Die Proteinbiosynthese von Ii, HLA-DM und MHC-II wird nicht durch trp-Mangel eingeschränkt**

Nach Charakterisierung der Oberflächenexpression stellte sich die Frage, ob die Proteinbiosynthese der Moleküle für die Peptidantigen-Prozessierung und -Präsentation, auf DCs<sup>-trp</sup> eingeschränkt ist. Im Speziellen sollte anhand von Pulse Chase- und Westernblot-Analysen untersucht werden, ob eine geringere Proteinbiosynthese der MHC-II-assoziierten invarianten Kette (Ii), die unter anderem den Transport aus dem endoplasmatischen Retikulum (ER) zum endosomalen Kompartiment dirigiert, vorliegt. In

der Literatur gibt es Hinweise, dass bei einem Fehlen der li die MHC Klasse-II Moleküle (MHC-II) im ER zurückgehalten werden. Darüber hinaus sollte die Proteinbiosynthese von MHC-II- sowie HLA-DM (*human leukocyte antigen*) Molekülen untersucht werden, da sie die Beladung von MHC-II Molekülen mit Peptidantigenen katalysiert.

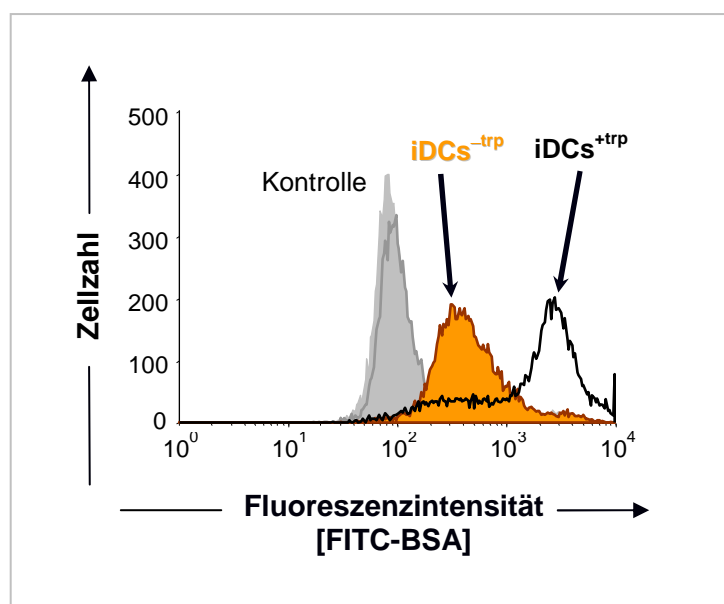
Westernblot-Analysen zeigten keinen wesentlichen Unterschied in der Proteinbiosynthese von HLA-DM, MHC-II Molekülen und li auf DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup> an d6 (Abb. 12A) auf. Zur Überprüfung der Proteinbiosynthese von MHC-II- und li Molekülen in einem definierten Zeitfenster wurden zudem Pulse Chase-Analysen durchgeführt. Die radioaktive Markierung (*Pulse*) der DCs mit [<sup>35</sup>S]-Methionin erfolgte für 10 min., wobei in den angegebenen Zeitintervallen (*Chase*: 0 h, 1 h, 2 h und 3 h) über die Markierung verfolgt werden konnte, was die Zelle an radioaktivem Material umsetzt. Wie schon im Westernblot gezeigt, wiesen auch hier DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup> keinen Unterschied in der Rate neu synthetisierter MHC-II- und li Moleküle auf.



**Abb. 12: Proteinbiosynthese von HLA-DM, MHC Klasse-II Molekülen (MHC-II) und Invarianter Kette (li) in DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup>.** (A) Zur Bestimmung der Proteinbiosynthese durch Westernblot-Analysen wurden die mAk DM.K8 anti-HLA-DMβ (Spalte 1-2), 5C1 anti-HLA-DMα (Spalte 3-4), 1B5 anti-MHC-II (anti-DR-α-Kette, Spalte 5-6) und Bu43 anti-li (Spalte 7-8) verwendet. Die Detektion von β-Actin als Lysekontrolle erfolgte mit AC40 mAk (unterste Reihe). DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> zeigen keinen wesentlichen Unterschied in der Proteinbiosynthese von HLA-DM, MHC-II und li. Repräsentative Daten sind gezeigt (n = 3). (B) Immunopräzipitation von radioaktiv-markierten MHC-II und li in DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup>. Die Markierung der Zellen mit [<sup>35</sup>S]-Methionin erfolgte für 10 min. an d6, wobei die Lysate durch mAk ISCR3 anti-MHC-II und mAk Bu45 anti-li detektiert wurden. Die Immunopräzipitate wurden auf einem SDS-Gel aufgetrennt und auf einem Röntgenfilm 4,5 h entwickelt. Neben anti-MHC-II und anti-li wurde als Lysekontrolle anti-β-Actin (unterste Reihe) im Westernblot mitgeführt. Unreife DCs<sup>-trp</sup> (Spalte 1-4) zeigen keinen Unterschied in der Syntheserate neu synthetisierter li- und MHC-II Moleküle gegenüber iDCs<sup>+trp</sup> (Spalte 5-8).

### 3.7 Verminderte Pinozytoseaktivität der DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup>

Nach der Überprüfung der Vitalität und der Bestimmung der quantitativen Ausbeute sowie der Phänotypisierung der DCs<sup>-trp</sup> wurde die Funktionalität dieser Zellen in verschiedenen Testsystemen überprüft (siehe auch Kapitel 3.10 – 3.15). Die Fähigkeit Antigene aufzunehmen ist eine grundsätzliche Funktion intakter unreifer DCs (iDCs). Um zu testen, ob die Antigenaufnahme auf DCs durch trp-Mangel beeinflusst ist, wurde die Fähigkeit der Zellen, FITC-markiertes BSA (*bovine serum albumin*) aufzunehmen, durchflusszytometrisch untersucht. Anschließend wurde die Aufnahme von BSA anhand der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) bestimmt (Abb. 13). Dabei zeigte sich, dass iDCs<sup>-trp</sup> eine stark verminderte, bis zu 10-fach geringere Pinozytoseaktivität im Vergleich zu iDCs<sup>+trp</sup> aufwiesen, was auf eine eingeschränkte Antigenaufnahme hindeutet.



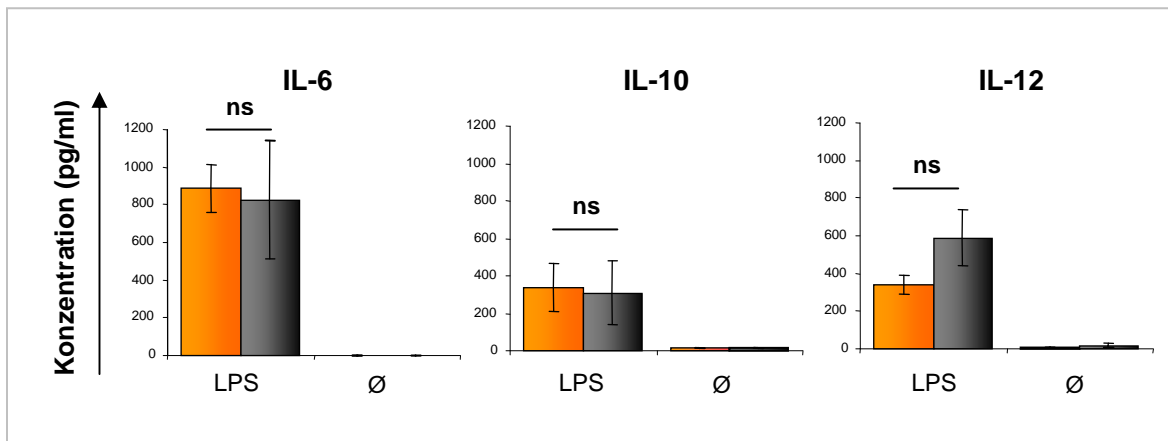
**Abb. 13: Pinozytoseaktivität von iDCs<sup>-trp</sup> und iDCs<sup>+trp</sup>.** Anhand der Aufnahme von FITC-BSA wurde die Pinozytoseaktivität der unreifen DCs an d6 gemessen. Die Aufnahme von FITC-BSA (50 µg/ml) erfolgte für 30 min. bei 37°C, wobei eine Kontrolle bei 4°C mitgeführt wurde. Die durchflusszytometrische Analyse ergab, dass iDCs<sup>-trp</sup> eine bis zu 10-fach geringere Pinozytoseaktivität im Vergleich zu iDCs<sup>+trp</sup> aufwiesen. Repräsentative Daten sind gezeigt (n = 5).

### 3.8 Die Zytokinsekretion von DCs wird nicht durch trp-Mangel beeinflusst

Wie bereits eingangs erwähnt ist die Art der resultierenden Immunreaktion von vielen Faktoren während der T-Zellaktivierung abhängig, zum Beispiel vom Reifeszustand der APCs, somit also vom Umfang der Kostimulation sowie von der Ausbildung eines ganz spezifischen Zytokinprofils. Die Induktion von Toleranz ist im allgemeinen durch die Expression eines T<sub>H</sub>2-Zytokinprofils gekennzeichnet. Zytokine, die immer wieder im Zusammenhang mit der Regulation von Immunantworten erwähnt werden, sind IL-4, IL-10

und TGF- $\beta$ . So fördert IL-4 die T<sub>H</sub>2 dominierte Immunantwort, wobei diese Tendenz zur humoralen Immunantwort durch das pro-inflammatorische Zytokin IL-6 verstärkt wird, das unter anderem Aktivierung, Wachstum und Differenzierung von T-Zellen vermittelt (Borish & Steinke, 2003). IL-10 als immunregulatorisches Zytokin induziert in peripheren T-Zellen Anergie durch selektive Inhibition des CD28 kostimulatorischen Signalweges (Akdis et al., 2001). IL-12 als pro-inflammatorisches Zytokin ist für die Aktivierung von NK-Zellen und T-Zellen verantwortlich und polarisiert diese Zellen zu einer zytotoxisch inflammatorischen Immunantwort des Types 1.

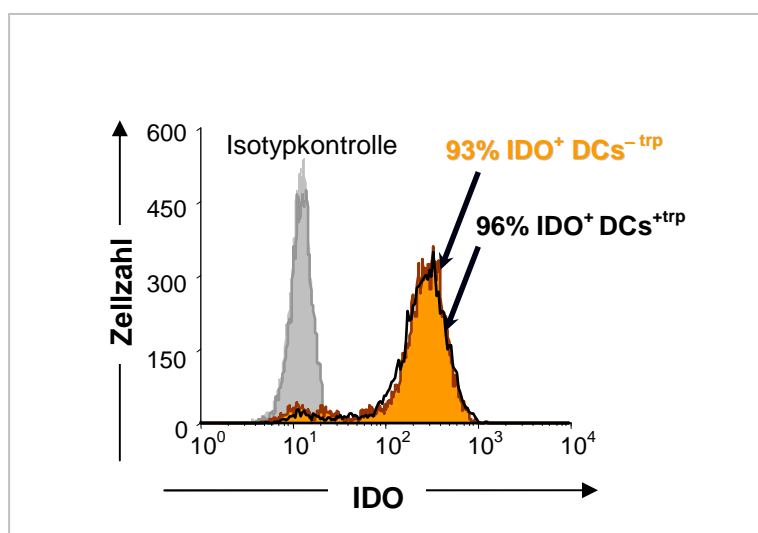
Nach den gezeigten Ergebnissen ergab sich die Frage, ob DCs<sup>-trp</sup>, die einen tolerogenen Phänotyp aufzeigen (CD80<sub>low</sub> CD40<sub>low</sub>/ ILT3<sup>high</sup>), nach einem TLR Stimulus auch in ihrer Zytokinexpression verändert sind. Zu diesem Zweck wurden die DCs an d6 geerntet und für 24 h mit LPS stimuliert. Anschließend wurden die Zellkulturüberstände auf die Zytokine IL-6, IL-10 und IL-12, die exemplarisch als typische Vertreter einer T<sub>H</sub>2- bzw. T<sub>H</sub>1-Antwort ausgewählt wurden, mit der ELISA-Technik untersucht. Unstimulierte Kontrollansätze wurden mitgeführt. Wie in Abb. 14 zusammengefasst konnten in den Kulturüberständen der stimulierten DCs die Zytokine IL-6, IL-10 und IL-12 nachgewiesen werden. Dabei zeigten die Überstände der stimulierten DCs<sup>-trp</sup> gegenüber DCs<sup>+trp</sup> keinen signifikanten Unterschied in der Zytokin Konzentration von IL-6 und IL-10. Zwar zeigte die Bestimmung der IL-12 Konzentration im Mittel geringere Werte bei DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup>, jedoch war dieser Unterscheid nicht signifikant. Im Gegensatz zu den stimulierten DCs konnte in den Kulturüberständen der unstimulierten DCs nur eine schwache Zytokin Konzentration nachgewiesen werden.



**Abb. 14: Bestimmung der Zytokin Konzentration aus Kulturüberständen von DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> nach LPS Stimulation mittels ELISA.** Dargestellt ist der Nachweis der Zytokin Konzentration von IL-6, IL-10 und IL-12 aus Zellkulturüberständen stimulierter DCs<sup>-trp</sup> (■) und DCs<sup>+trp</sup> (■) DCs. Unreife DCs wurden an d6 mit LPS (50ng/ml) für 24 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Ansätze ohne Stimulans (Ø) dienen als Kontrolle. Die Konzentration des jeweiligen Zytokins im Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA bestimmt. Die Überstände der TLR4 stimulierten DCs<sup>-trp</sup> gegenüber DCs<sup>+trp</sup> zeigten keinen signifikanten Unterschied in der Zytokin Konzentration von IL-6, IL-10 und IL-12. In den Kulturüberständen der unstimulierten DCs konnte nur eine schwache Zytokin Konzentration detektiert werden. Gezeigt sind MW  $\pm$  SEM von n = 6.

### 3.9 Trp-Depletion beeinflusst nicht die IDO Proteinexpression der DCs

Eine weitere interessante Frage war, ob DCs, die in trp-Mangelmedium generiert werden, weniger IDO exprimieren. Zu diesem Zweck wurden DCs an Tag 6 mit Poly(I:C) für 24 h in 100  $\mu$ M trp-haltigem Kulturmedium stimuliert und die anschließend permeabilisierten Zellen durchflusszytometrisch untersucht sowie die Überstände abgenommen. Die Funktionalität von IDO wurde durch die Bestimmung der Kynurenin- (kyn) und trp-Konzentration des Überstandes mittels HPLC (*high performance liquid chromatography*) nachgewiesen. Kontrollansätze wurden mitgeführt. Die durchflusszytometrische Analyse ergab keinen wesentlichen Unterschied in der IDO Expression der TLR3 stimulierten DCs aus beiden Kulturbedingungen (Abb. 15). Ebenfalls konnte kein Unterschied in der IDO Funktionalität nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Die Kontrollen zeigten sowohl in FACS- der als auch in der HPLC-Analyse keine IDO Expression.

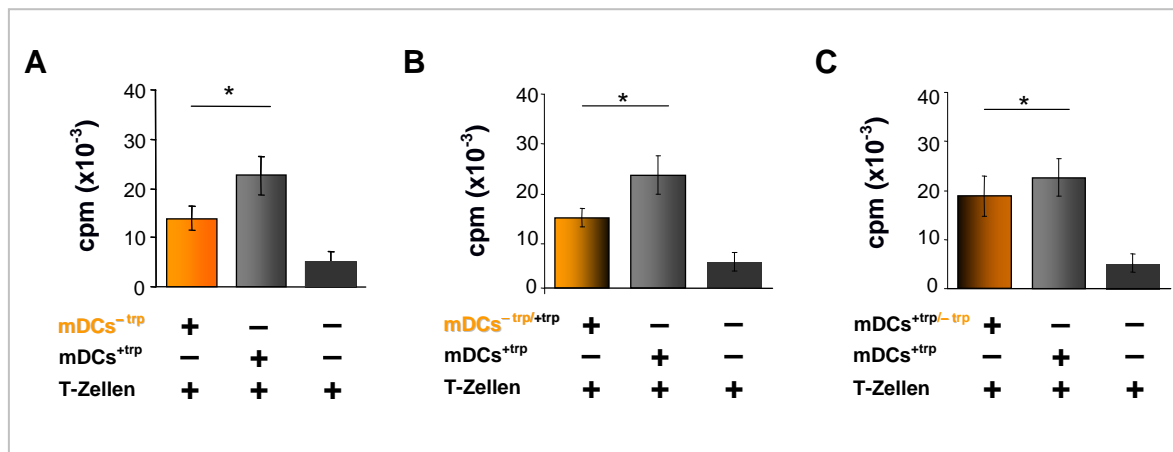


**Abb. 15: IDO Expression von DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup>.** DCs wurden an d6 in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in normalem Kulturmedium aufgenommen und für 24 h bei 37°C mit 25  $\mu$ g/ml Poly(I:C) stimuliert. Die Intrazelluläre FACS-Analyse ergab an d7 keinen wesentlichen Unterschied in der IDO Expression auf die mit Poly(I:C) stimulierten DCs aus beiden Kulturbedingungen. Repräsentative Daten sind gezeigt (n = 3).

### 3.10 Die T-Zell-stimulatorische Funktion von DCs<sup>-trp</sup> ist eingeschränkt

Der in vorangegangenen Experimenten gezeigte tolerogene Phänotyp der DCs<sup>-trp</sup> (CD80<sub>low</sub> CD40<sub>low</sub>/ ILT3<sup>high</sup>) und die Beobachtung der signifikant geringeren Fähigkeit Antigene aufzunehmen ergab die Frage, ob trp-Mangel während der Ausdifferenzierung zu DCs die stimulatorische Kapazität dieser Zellen beeinflusst. Dazu wurde die immunstimulatorische Funktion der DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup> *in vitro* mittels Kokultorexperimenten in autologen sowie allogenen Ansätzen untersucht. Diese funktionellen Untersuchungen zur Induktion proliferativer T-Zellantworten durch reife DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> erfolgten stets unter normalen Zellkulturbedingungen (30  $\mu$ M trp).

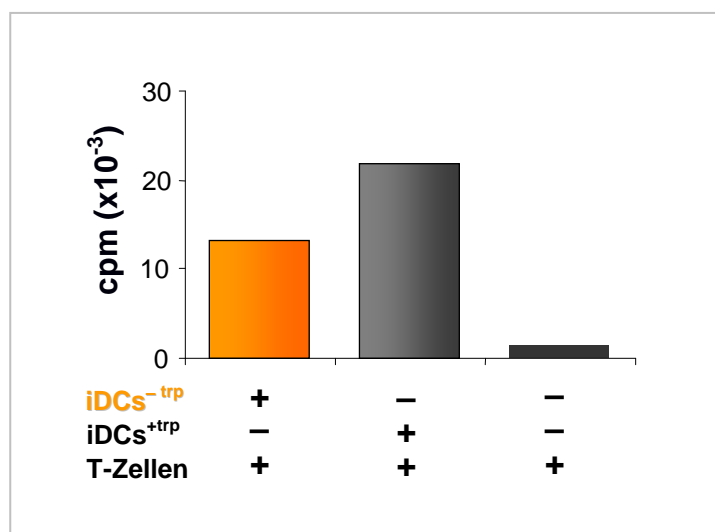
Im autologen *in vitro* Modell wurden DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup>, bevor sie 7 Tage mit T-Zellen kokultiviert wurden, gepulst, d.h. mit exogener Beladung des Antigens Tetanus Toxoid (TT) untersucht, wobei parallel nicht-gepulste DCs als Kontrolle dienten. Als weitere Kontrollen wurden T-Zellen und DCs alleine mitgeführt. Nach einer 4-stündigen Inkubationszeit mit dem Antigen erfolgte die Reifung der DCs durch TLR3 Stimulation (Poly(I:C)) für weitere 24 h in den entsprechenden Medien. Des Weiteren wurde überprüft, ob die Antigenaufnahme und Reifung unter trp-Mangel das Vermögen normal generierter DCs, T-Zellen zu stimulieren, beeinflusst. Umgekehrt wurde die stimulierende Funktion von DCs<sup>-trp</sup> untersucht, wenn die Antigenaufnahme und die Reifung unter normalen Kulturbedingungen erfolgten. Die stimulatorische Kapazität der reifen DCs wurde anhand des Einbaus von [<sup>3</sup>H]-Thymidin in proliferierende T-Effektorzellen gemessen. Als Maß für die Proliferation wurden 'counts per minute' (cpm) angegeben, welche die Menge des eingebauten Thymidins in replizierten T-Zellen repräsentieren. Zur Auswertung der antigen-spezifischen T-Zellantwort wurde der cpm-Mittelwert (MW) der fünf Wells gebildet. Die Interaktion der antigen-präsentierenden mDCs<sup>-trp</sup> mit autologen T-Zellen ergab im Vergleich zu mDCs<sup>+trp</sup> eine signifikant geringere T-Zellstimulation (Abb. 16A). Dieser Effekt der geringeren TT-spezifischen T-Zellantwort konnte durch die Anwesenheit von trp (30 µM trp) nur während der Antigenaufnahme und Reifung der ansonsten ohne trp generierten DCs<sup>-trp</sup> nicht kompensiert werden (Abb. 16B). Im Gegensatz dazu wurde jedoch bei den mDCs<sup>+trp</sup> eine signifikant geringere TT-spezifische T-Zellproliferation beobachtet, wenn die Aufnahme des Antigens und die Reifung unter trp-Mangelbedingungen erfolgten (Abb. 16C). Demnach scheint es funktionell für die DCs wichtig zu sein, dass trp auch während der Reifung und der Antigenaufnahme vorhanden ist.



**Abb. 16: Autologe T-Zellproliferation mit TT-beladenen mDCs<sup>-trp</sup> und mDCs<sup>+trp</sup>.** (A) Autologe Proliferationsversuche mit reifen DCs<sup>-trp</sup> (orange) vs. DCs<sup>+trp</sup> (grau). Die Kokulturrexperimente erfolgten stets unter normalen Zellkulturbedingungen (30 µM trp) für 7 Tage bei 37°C. Vor der Kokultivierung mit T-Zellen ( $1 \times 10^5$ ) wurden autologe DCs ( $1 \times 10^3$ ) 4 h mit Tetanus Toxoid (TT) beladen und mit Hilfe von Poly(I:C) für 24 h gereift. T-Zellen alleine dienten als Kontrolle (schwarz). (B) Autologe Proliferationsversuche mit DCs<sup>-trp</sup>, die unter normalen Kulturbedingungen gereift wurden (DCs<sup>-trp/+trp</sup> orange) vs. DCs<sup>+trp</sup> (grau). (C) Autologe Proliferationsversuche mit DCs<sup>+trp</sup>, die unter trp-Mangelbedingungen gereift wurden (DCs<sup>+trp/-trp</sup> orange) vs. DCs<sup>+trp</sup> (grau). Zur Auswertung der TT-spezifischen T-Zellantwort wurde das von den Zellen eingebaute [<sup>3</sup>H]-Thymidin gemessen (cpm) und ein MW der 5 Wells gebildet. Gezeigt sind MW  $\pm$  SEM von n = 6, \*P < 0,05.



In der Literatur werden unreife DCs als Toleranz induzierende Zellen diskutiert (Lutz & Schuler, 2002). Um dies zu überprüfen, wurden in dieser Arbeit ebenfalls  $iDCs^{-trp}$  vs.  $iDCs^{+trp}$  in autologen Ansätzen mittels Kokulturrexperimenten untersucht. Zu diesem Zweck wurden DCs, bevor sie mit T-Zellen für 7 Tage kokultiviert wurden, zur Antigenaufnahme 4 h mit TT inkubiert. Wie bereits bei der Verwendung reifer DCs gezeigt (Abb. 16A), konnte eine geringere T-Zellproliferation beobachtet werden, wenn das Peptidantigen durch  $iDCs^{-trp}$  präsentiert wurde (Abb. 17). Wie erwartet war die T-Zellantwort unter Einsatz unreifer DCs etwas geringer im Vergleich zu reifen DCs (siehe Abb. 16A und 17).



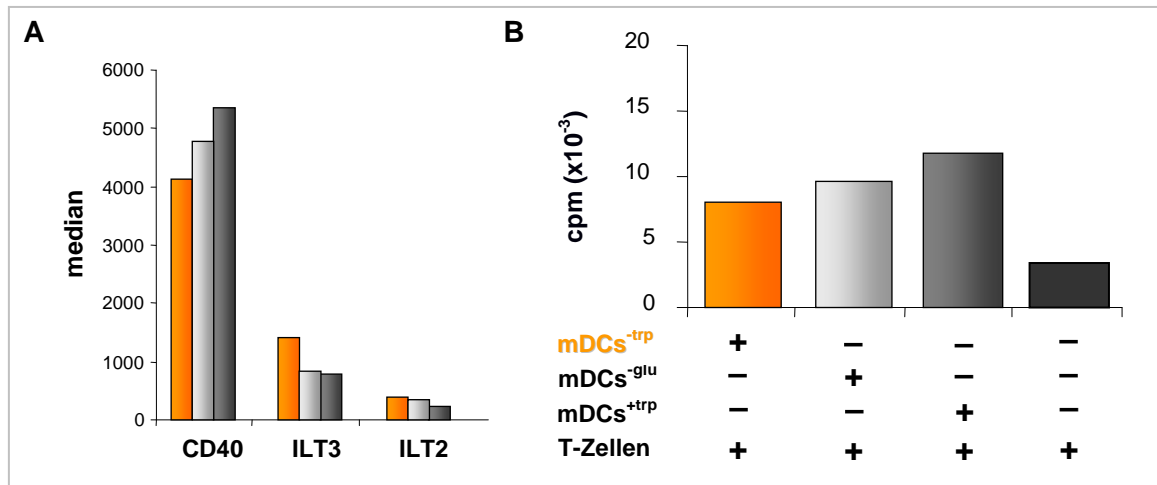
**Abb. 17: Autologe T-Zellproliferation mit TT-beladenen  $iDCs^{-trp}$  und  $iDCs^{+trp}$ .** (A) Autologe Proliferationsversuche mit  $iDCs^{-trp}$  (orange) vs.  $iDCs^{+trp}$  (grau). Die Kokulturrexperimente erfolgten unter normalen Zellkulturbedingungen ( $30 \mu M$  trp) für 7 Tage bei  $37^\circ C$ . Vor der Kokultivierung mit T-Zellen ( $1 \times 10^5$ ) wurden autologe DCs ( $1 \times 10^3$ ) 4 h mit Tetanus Toxoid (TT) beladen (Ratio DCs: T-Zellen: 1:100). T-Zellen alleine dienten als Kontrolle (schwarz). Zur Auswertung der TT-spezifischen T-Zellantwort wurde das von den Zellen eingebaute [ $^3H$ ]-Thymidin gemessen (cpm) und ein MW der 5 Wells gebildet. Repräsentative Daten sind gezeigt ( $n = 2$ ).

### 3.11 L-Glutamin-Mangel und der Einfluss auf DCs

Um den Mangel einer weiteren Aminosäure und dessen Einfluss auf DCs zu testen, wurde in einem Experiment zusätzlich die Auswirkung der L-Glutamin-Depletion auf Monozyten während ihrer Differenzierung zu DCs ( $DCs^{-glu}$ ) in Hinblick auf ihre Expression der inhibitorischen Rezeptoren ILT2 und ILT3 durchflusszytometrisch untersucht (Abb. 18A). Die Reifung der DCs erfolgte an d6 mit Hilfe von Poly(I:C) für 24 h.

Es konnte eine etwas verstärkte Expression der beiden inhibitorischen Rezeptoren ILT2 und ILT3 auf  $DCs^{-glu}$  gegenüber  $DCs^{+trp}$  festgestellt werden, wobei dieser Befund im Vergleich zu  $DCs^{-trp}$  nur sehr gering war. Zudem wiesen  $DCs^{-glu}$  eine geringere Expression von CD40 auf gegenüber  $DCs^{+trp}$ . Des Weiteren wurde die antigen-präsentierende Funktion der  $DCs^{-glu}$  vs.  $DCs^{-trp}$  und  $DCs^{+trp}$  *in vitro* mittels autologer Proliferationsversuche unter normalen Zellkulturbedingungen ( $30 \mu M$  trp) überprüft. Im Gegensatz zu  $DCs^{+trp}$  konnte bei den DCs, die ohne L-Glutamin generiert wurden, eine verminderte

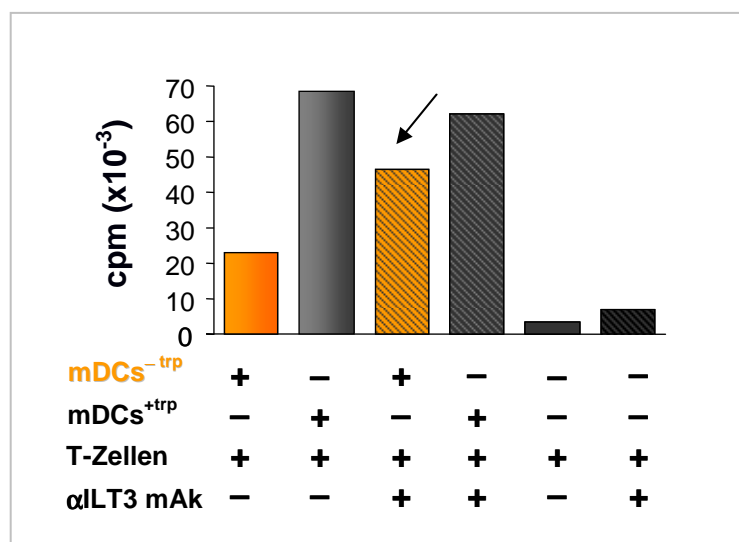
stimulatorische Kapazität gegenüber T-Zellen beobachtet werden. DCs<sup>-trp</sup> zeigten im Vergleich zu DCs<sup>-glu</sup> und DCs<sup>+trp</sup> eine geringere stimulatorische Kapazität gegenüber T-Zellen (Abb. 18B).



**Abb. 18: Oberflächenfärbung von CD40, ILT2 und ILT3 von reifen DCs<sup>-trp</sup>, DCs<sup>-glu</sup> und DCs<sup>+trp</sup> sowie T-Zellproliferation mit autologen DCs<sup>-trp</sup>, DCs<sup>-glu</sup> und DCs<sup>+trp</sup>.** (A) DCs wurden 6 Tage unter trp-Mangel DCs<sup>-trp</sup> (orange) und glu-Mangel DCs<sup>-glu</sup> (light grey) und unter normalen Kulturbedingungen DCs<sup>+trp</sup> (dark grey) generiert. Reife DCs (mDCs) wurden an d7 durchflusszytometrisch untersucht. Als Reifungsstimulus diente Poly(I:C) in einer Konzentration von 25 µg/ml für 24h. Dargestellt sind Dreifachfärbungen mit 7-AAD, anti-CD1a mAk in der PE-Fluoreszenz und CD40, ILT2 und ILT3 in der FITC-Fluoreszenz. (B) Autologe Proliferationsversuche mit reifen DCs<sup>-trp</sup> (orange) und DCs<sup>-glu</sup> (light grey) vs. DCs<sup>+trp</sup> (dark grey). Die Kokulturrexperimente erfolgten unter normalen Zellkulturbedingungen (30 µM trp) für 6 Tage bei 37°C. Vor der Kokultivierung mit T-Zellen ( $1 \times 10^5$ ) wurden autologe DCs ( $1 \times 10^3$ ) 4 h mit Tetanus Toxoid (TT) beladen und mit Hilfe von Poly(I:C) für 24 h gereift (Ratio DCs: T-Zellen: 1:100). T-Zellen alleine dienten als Kontrolle (black). Zur Auswertung der TT-spezifischen T-Zellantwort wurde das von den Zellen eingebaute [<sup>3</sup>H]-Thymidin gemessen (cpm) und ein MW der 5 Wells gebildet (n = 1).

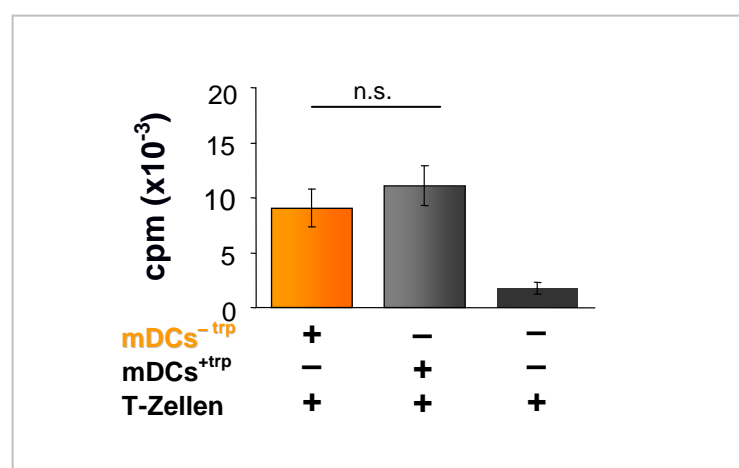
### 3.12 DCs<sup>-trp</sup> zeigen ILT3 abhängig eine verminderte T-Zell-stimulatorische Kapazität

Die bereits gezeigte Hochregulierung des inhibitorischen Rezeptors ILT3 durch trp-Mangel bei DCs (Abb. 10 und 11) und deren verminderte stimulatorische Kapazität gegenüber autologen T-Zellen (Abb. 16 und 17) führte zur Frage, inwieweit der inhibitorische Rezeptor ILT3 an der eingeschränkten Fähigkeit T-Zellantworten zu induzieren, beteiligt ist. Um dies zu klären, wurde die 7-tägige Antigenstimulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen durch DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> in Anwesenheit eines Neutralisierungsantikörpers (anti-ILT3) unter normalen Zellkulturbedingungen (30 µM trp) durchgeführt. Vor der Kokultivierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte die Inkubation der DCs mit anti-ILT3 mAk bei 37°C für 30 min. Durch die Zugabe des anti-ILT3 mAk (10 µg/ml) wurde der Effekt der DCs<sup>-trp</sup>, geringere TT-spezifische T-Zellantworten zu induzieren, partiell aufgehoben (Abb. 19). Diese neutralisierende Wirkung von ILT3 konnte dagegen nicht beobachtet werden, wenn der Einsatz des spezifischen anti-ILT3 mAk in einer Endkonzentration von 1 µg/ml erfolgte (nicht gezeigt).



**Abb. 19: Autologe T-Zellproliferation mit TT-beladenen mDCs<sup>-trp</sup> und mDCs<sup>+trp</sup> in Anwesenheit von anti-ILT3 mAk.** Autologe Kokulturen mit DCs<sup>-trp</sup> (■) vs. DCs<sup>+trp</sup> (■). Die Proliferationsversuche erfolgten unter normalen Zellkulturbedingungen (30 μM trp) für 6 Tage bei 37°C. Vor der Kokultivierung mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen (1 x 10<sup>5</sup>) wurden autologe DCs (1 x 10<sup>3</sup>) 4 h mit Tetanus Toxoid (TT) beladen und mit Hilfe von Poly(I:C) für 24 h gereift (Ratio DCs: T-Zellen: 1:100). T-Zellen alleine dienten als Kontrolle (■). Durch die Zugabe des Neutralisierungsantikörpers anti-ILT3 (10 μg/ml) wird der Effekt der geringeren stimulatorische Kapazität von DCs<sup>-trp</sup> (■) gegenüber TT-spezifischen T-Zellen partiell aufgehoben (Pfeil). Hingegen konnte keine neutralisierende Wirkung auf T-Zellen beobachtet werden, die durch DCs<sup>+trp</sup> (■) stimuliert wurden. Zur Auswertung der TT-spezifischen T-Zellantwort wurde das von den Zellen eingebaute [<sup>3</sup>H]-Thymidin gemessen (cpm) und ein MW der 3 Wells gebildet. Angegeben sind repräsentative Daten (n = 3).

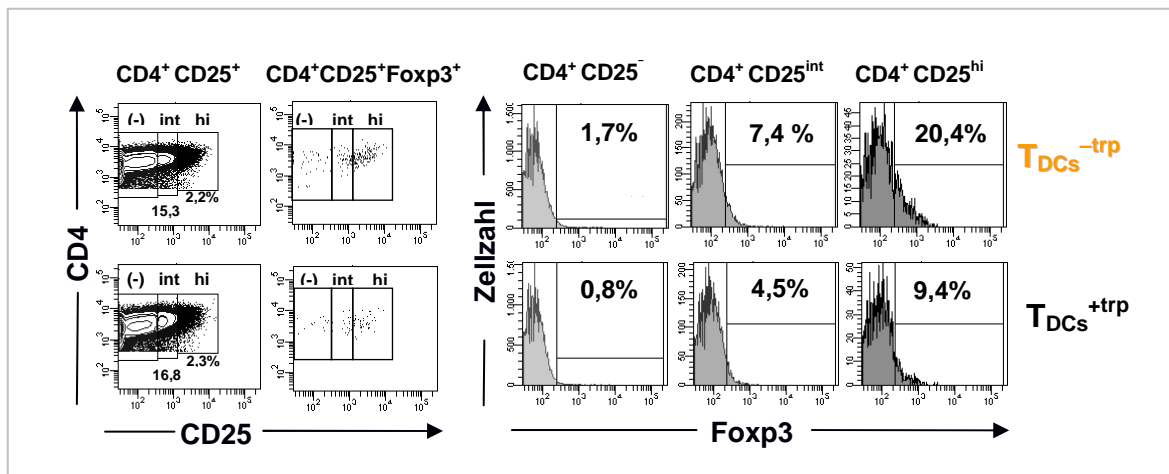
Während bei autologen T-Zellen eine signifikant verminderte Proliferation durch Antigenstimulation mit TT, das von DCs<sup>-trp</sup> präsentiert wurde, gezeigt werden konnte, führten allogene DCs<sup>-trp</sup> zu keiner verminderten T-Zellstimulation (Abb. 20).



**Abb. 20: Allogene T-Zellproliferation mit mDCs<sup>-trp</sup> und mDCs<sup>+trp</sup>.** Die allogenen Proliferationsversuche erfolgten unter normalen Zellkulturbedingungen (30 μM trp) über einen Zeitraum von 6 Tagen bei 37°C. T-Zellen (1 x 10<sup>5</sup>) wurden mit allogenen DCs<sup>-trp</sup> (■) bzw. DCs<sup>+trp</sup> (■) kokultiviert (Ratio DCs: T-Zellen: 1:100). T-Zellen alleine dienten als Kontrolle (■). Zur Auswertung der T-Zellantwort wurde das von den Zellen eingebaute [<sup>3</sup>H]-Thymidin gemessen und ein MW der 5 Wells gebildet. Gezeigt sind MW ± SEM von n = 5.

### 3.13 Induktion von Foxp3 in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen durch ILT3<sup>high</sup> DCs<sup>-trp</sup>

In der Literatur wurde gezeigt, dass ILT3<sup>high</sup> DCs aus CD4<sup>+</sup> T-Zellen CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen mit regulatorischer Funktion induzieren können (Vlad et al., 2003; Penna et al., 2005). Deshalb lag es nahe, dass die unter trp-Mangel differenzierten ILT3<sup>high</sup> DCs auch CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs generieren. Um dies zu klären, wurden CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die für 7 Tage mit TT-beladenen DCs<sup>-trp</sup> bzw. als Kontrolle mit DCs<sup>+trp</sup> kokultiviert wurden, auf die Expression von Foxp3 (*forkhead box P3*) untersucht (Hori et al., 2003; Khattri et al., 2003; Fontenot et al., 2003). Zur Immunphänotypisierung der CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden die Kokulturen an d7 geerntet und die Oberflächenexpression des Aktivierungsmarkers CD25 als Teil des IL-2 Rezeptors sowie die Expression des intrazellulären Transkriptionsfaktors Foxp3 analysiert. Bei Foxp3 handelt es sich um einen Treg-Marker, der auf unterschiedlichen Treg-Populationen exprimiert wird, so auch auf der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg-Population, die besonders stark CD25 exprimiert (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>) (Vukmanovic-Stejic et al., 2006). Im Folgenden wurden aufgrund der Übersichtlichkeit die nach 7-tägiger Antigenstimulation durch DCs<sup>-trp</sup> bzw. DCs<sup>+trp</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen als T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> bzw. T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup> bezeichnet.



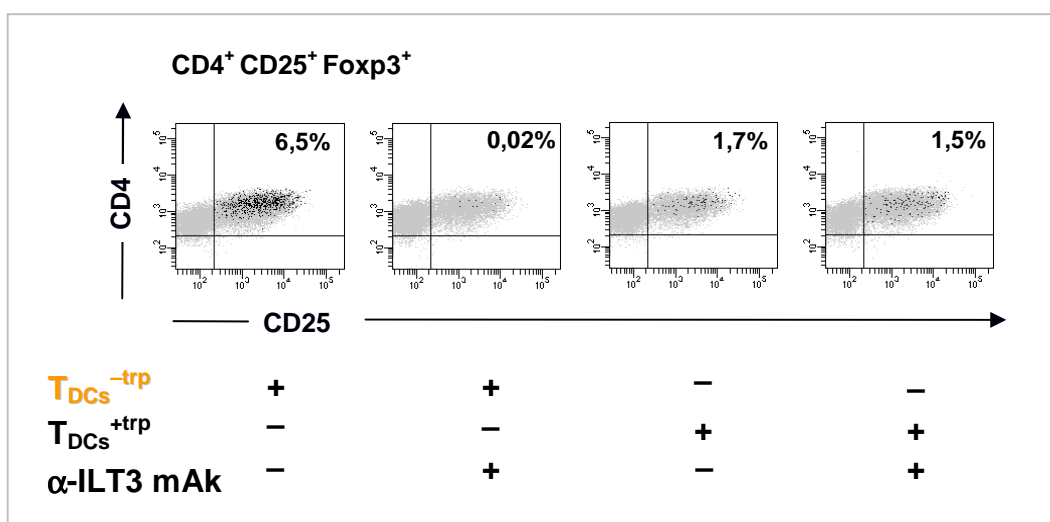
**Abb. 21: Erhöhte Foxp3-Induktion in T-Zellen durch DCs<sup>-trp</sup>.** Autologe, TT beladene DCs<sup>-trp</sup> (CD80<sub>low</sub> CD40<sub>low</sub>/ ILT3<sup>high</sup>) wurden mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen kokultiviert (Ratio DCs: CD4<sup>+</sup> T-Zellen: 1:100) und die T-Zellen an d7 durchflusszytometrisch analysiert. Die links dargestellten Punktdiagramme zeigen keinen Unterschied in der Oberflächenexpression von CD4 und CD25 in T-Zellen nach autologen Proliferationsversuchen mit DCs<sup>-trp</sup> (T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup>) vs. DCs<sup>+trp</sup> (T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup>). Dargestellt ist eine zusätzliche Unterteilung von CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die CD25 stark exprimieren (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>), und eine Population, welche CD25 intermediär exprimiert (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>int</sup>) und T-Zellen, die für CD25 negativ sind (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup>). Die übrigen Histogramme zeigen in einer intrazellulären FACS-Analyse, dass die CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> prozentual mehr Foxp3 exprimieren gegenüber CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup>. Angegeben sind repräsentative Daten (n = 3).

In der durchflusszytometrischen Analyse wurden die Populationen der einfach-positiven CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen und doppelt-positiven CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen getrennt betrachtet. Bei den CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte eine zusätzliche Unterteilung in eine T-Zellpopulation, die CD25 stark exprimiert (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup>) und eine, die CD25 intermediär exprimierten (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>int</sup>). Die anschließende intrazelluläre FACS-Analyse zeigte, dass der prozentuale Anteil an Foxp3 exprimierenden Zellen bei CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> um den

Faktor 2 erhöht war im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup>. Im Vergleich zu der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>hi</sup> T-Zellen zeigten CD4<sup>+</sup> CD25<sup>int</sup> T-Zellen aus beiden Versuchsansätzen eine geringe Foxp3 Expression auf, wobei die CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen Foxp3 negativ waren (Abb. 21). Anhand der Oberflächenfärbung konnte zudem nachgewiesen werden, dass der prozentuale Anteil an CD25 exprimierenden CD4<sup>+</sup> Zellen nach Antigenstimulation durch DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> annähernd gleich war (Abb. 21, Diagramme links). Ebenfalls zeigte die prozentuale Verteilung der CD45RO exprimierenden CD4<sup>+</sup> T-Zellen (T-Gedächtniszellen) nach Kokultivierung mit DCs<sup>-trp</sup> bzw. DCs<sup>+trp</sup> (T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup>: 74,8 %; T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup>: 74,7 %) keinen Unterschied (nicht gezeigt).

### 3.14 Erhöhte Induktion von Foxp3 in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen in Abhängigkeit von ILT3

Um die Rolle der verstärkten Expression des inhibitorischen Rezeptors ILT3 auf DCs<sup>-trp</sup> bei der Induktion von Foxp3<sup>+</sup> in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>DCs</sub> zu untersuchen, erfolgten autologe Proliferationsversuche unter Anwesenheit des Blockierungsantikörpers anti-ILT3 in einer Endkonzentration von 10 µg/ml über 7 Tage. Im Speziellen wurden die mit TT-beladenen DCs 30 min. in Anwesenheit des anti-ILT3 mAk inkubiert, bevor sie mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen (1 x 10<sup>5</sup> Zellen/ Well) kokultiviert wurden. Die durchflusszytometrischen Untersuchungen ergaben, dass durch die Zugabe von anti-ILT3 der Effekt der verstärkten Foxp3 Induktion in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> aufgehoben werden konnte (Abb. 22).



**Abb. 22: Beutung von ILT3 in der Hochregulierung von Foxp3 in T-Zellen durch ILT3<sup>high</sup> DCs<sup>-trp</sup>.** Um die Rolle des inhibitorischen Rezeptors ILT3 bei der Induktion von Foxp3<sup>+</sup> in T-Zellen nach Kokultivierung mit TT-beladenen DCs (1 x 10<sup>3</sup> Zellen/ Well) zu untersuchen, wurden diese 30 min. in T-Zellmedium in Anwesenheit des anti-ILT3 mAk inkubiert, bevor sie mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen (1 x 10<sup>5</sup> Zellen/ Well) kokultiviert wurden (Ratio DCs: CD4<sup>+</sup> T-Zellen: 1:100). Durch die Zugabe des Neutralisierungsantikörpers anti-ILT3 (10 µg/ml) wird der Effekt der verstärkten Induktion von Foxp3<sup>+</sup> durch DCs<sup>-trp</sup> in T-Zellen aufgehoben. Es konnte keine neutralisierende Wirkung auf CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachten werden, die durch DCs<sup>+trp</sup> in Anwesenheit von anit-ILT3 stimuliert wurden. Angegeben sind repräsentative Daten (n = 3).

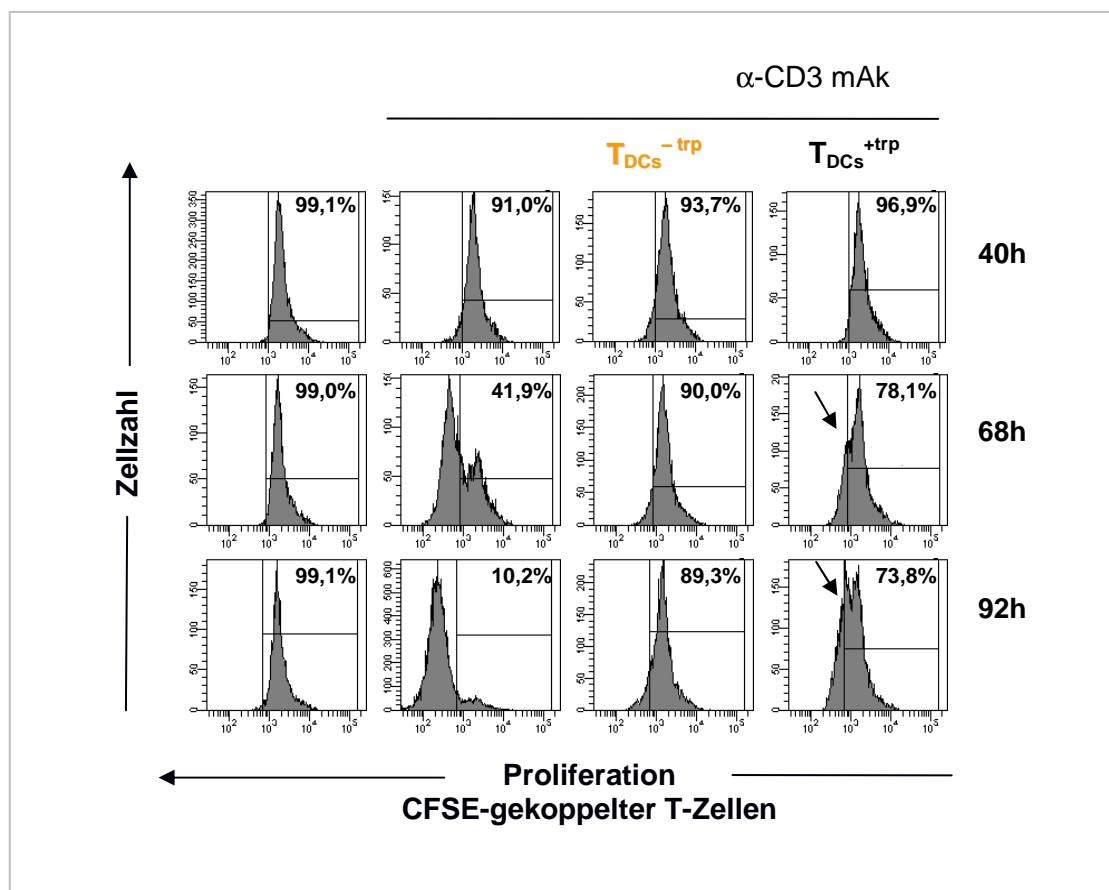
Im Kontrollansatz  $CD4^+ CD25^+ T_{DCs}^{+trp}$  konnte kein Effekt des anti-ILT3 mAk auf die Foxp3 Expression festgestellt werden. Insgesamt zeigen diese Ergebnisse, dass die erhöhte Foxp3 Induktion in  $CD4^+ CD25^+ T_{DCs}^{-trp}$  in Abhängigkeit von ILT3 erfolgt.  $DCs^{-trp} CD80_{low} CD40_{low}/ ILT3^{high}$  sind somit über die erhöhte ILT3 Expression in der Lage, während einer 7-tägigen Kokultivierung mit  $CD4^+$  T-Zellen verstärkt Foxp3<sup>+</sup> in  $CD4^+ CD25^+$  T-Zellen zu induzieren.

### 3.15 ILT3<sup>high</sup> DCs fördern die Generierung von $CD4^+ CD25^+$ Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen mit regulatorischer Funktion

Um die regulatorische Funktion der  $CD4^+ CD25^+$  Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen nach Kokultorexperimenten mit  $CD4^+$  T-Zellen und ILT3<sup>high</sup>  $DCs^{-trp}$  bzw.  $DCs^{+trp}$  ( $CD4^+ CD25^+ T_{DCs}^{-trp}$  bzw.  $CD4^+ CD25^+ T_{DCs}^{+trp}$ ) nachzuweisen, wurde neben der Bestimmung des typischen Treg-Markers Foxp3 zusätzlich die Fähigkeit dieser Zellen untersucht, polyklonale sowie antigen-stimulierte  $CD4^+$  T-Zellen zu supprimieren.

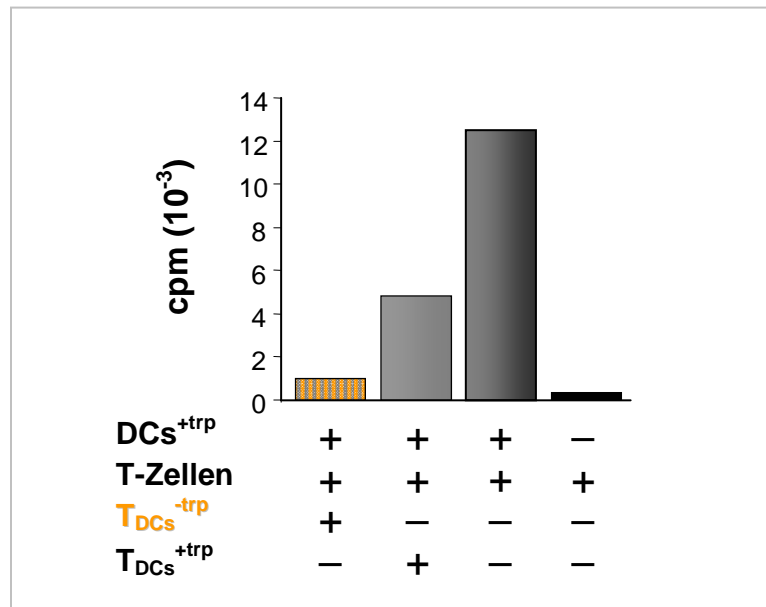
Die über MACS<sup>®</sup> Separation isolierten  $CD4^+ CD25^+$  T-Zellen und die darin enthaltenden  $CD4^+ CD25^+$  Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen der autologen Proliferationsexperimente mit  $DCs^{-trp}$  bzw.  $DCs^{+trp}$  wurden mit CFSE-markierten  $CD4^+$  T-Zellen kultiviert und mit platten-gebundenem anti-CD3 polyklonal stimuliert ( $1 \times 10^5$   $CD4^+ CD25^+ T_{DCs}$ :  $1 \times 10^5$  T-Zellen/Well). Zur Bestimmung der Zellteilungsaktivität wurden die CFSE-markierten  $CD4^+$  T-Zellen nach 40 h, 68 h und 92 h durchflusszytometrisch analysiert. Anhand von unstimulierten CFSE-markierten  $CD4^+$  T-Zellen konnte der prozentuale Anteil nicht expandierter Zellen ermittelt werden. Als Positivkontrolle wurden anti-CD3 stimulierte  $CD4^+$  T-Zellen alleine mitgeführt.

Die generierten  $CD4^+ CD25^+$  Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen aus den Kokulturen mit  $DCs^{-trp}$  ( $T_{DCs}^{-trp}$ ) bzw.  $DCs^{+trp}$  ( $T_{DCs}^{+trp}$ ) zeigten nach 68 h und 92 h eine deutliche Proliferationsinhibition der polyklonal-stimulierten T-Zellen. Nach 92 h konnten in den Ansätzen ohne  $CD4^+ CD25^+$  T-Zellen 10,2 %, mit  $CD4^+ CD25^+ T_{DCs}^{-trp}$  89,3 % und mit  $CD4^+ CD25^+ T_{DCs}^{+trp}$  73,8 % ungeteilte  $CD4^+$  T-Zellen festgestellt werden (Abb. 23). Während die polyklonal-stimulierten T-Zellen in Anwesenheit von  $T_{DCs}^{+trp}$  nach 68 h - 92 h eine Zellteilung durchliefen, wurde diese durch  $T_{DCs}^{-trp}$  deutlich inhibiert. Insgesamt wurde eine stärkere Inhibition der polyklonalen T-Zellantwort durch  $T_{DCs}^{-trp}$  beobachtet im Vergleich zu  $T_{DCs}^{+trp}$ .



**Abb. 23: Suppression polyklonaler T-Zellantworten durch CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen.** Die über MACS<sup>®</sup> Separation isolierten CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen (1 x 10<sup>5</sup>) der Proliferationsversuche mit autologen DCs<sup>-trp</sup> bzw. DCs<sup>+trp</sup> wurden mit CFSE-markierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen (1 x 10<sup>5</sup>) in T-Zellmedium (30 μM trp) kultiviert und mit platten-gebundenem anti-CD3 polyklonal stimuliert (Ratio CD4<sup>+</sup> T-Zellen: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>DCs</sub> 1:1). Zur Bestimmung der Zellteilungsaktivität wurden die CFSE-markierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 40h, 68h und 92 h durchflusszytometrisch analysiert. Unstimulierte und anti-CD3 stimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen alleine dienten als Kontrolle. Angegeben sind repräsentative Daten (n = 2).

Um die suppressive Fähigkeit der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup> gegenüber antigen-stimulierter T-Zellen nachzuweisen, wurden die über MACS<sup>®</sup> isolierten CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen weitere 7 Tage unter normalen Zellkulturbedingungen (30 μM trp) mit autologen CD4<sup>+</sup> T-Zellen in Anwesenheit von TT beladenen DCs<sup>+trp</sup> kultiviert (1 x 10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen: 1 x 10<sup>5</sup> CD4<sup>+</sup> T-Zellen: 1 x 10<sup>3</sup> DCs<sup>+trp</sup> / Well). Zusätzlich zur gezeigten Inhibition polyklonaler T-Zellantworten durch T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> und T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup> konnte auch bei antigen-stimulierten T-Zellen eine deutliche Proliferationsinhibition durch T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> und T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup> festgestellt werden (Abb. 24). Dabei zeigte sich ebenfalls eine stärkere Proliferationsinhibition der T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> (ca. 90 %) vs. T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup> (ca. 60%). Insgesamt implizieren diese Ergebnisse, dass ILT3<sup>high</sup> DCs<sup>-trp</sup> die Generierung von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen mit regulatorischer Funktion begünstigen.



**Abb. 24: Suppression TT-stimulierter T-Zellantworten durch CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen.** Die mittels MACS<sup>®</sup> System isolierten CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen ( $1 \times 10^5$ ) und die darin enthaltenden Foxp3 positiven T-Zellen wurden mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen ( $1 \times 10^5$ ) und mit Tetanus Toxoid (TT)-beladenen autologen DCs<sup>+trp</sup> ( $1 \times 10^5$ ) kokultiviert (Ratio DCs<sup>+trp</sup>: CD4<sup>+</sup> T-Zellen: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>DCs</sub> 1:100:100). TT-stimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen wurden mit CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen aus Proliferationsversuchen mit DCs<sup>-trp</sup> (■) und entsprechend mit DCs<sup>+trp</sup> (■) kokultiviert. TT-stimulierte CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Ratio DCs: CD4<sup>+</sup> T-Zellen: 1:100) ohne CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>DCs</sub> wurden als Kontrolle mitgeführt (■). CD4<sup>+</sup> T-Zellen alleine ( $1 \times 10^5$ ) dienten als weitere Kontrolle (■). Zur Auswertung der T-Zellantwort wurde das von den Zellen eingebaute [<sup>3</sup>H]-Thymidin gemessen und ein MW der 3 Wells gebildet. Angegeben sind repräsentative Daten (n = 2).



## 4 DISKUSSION

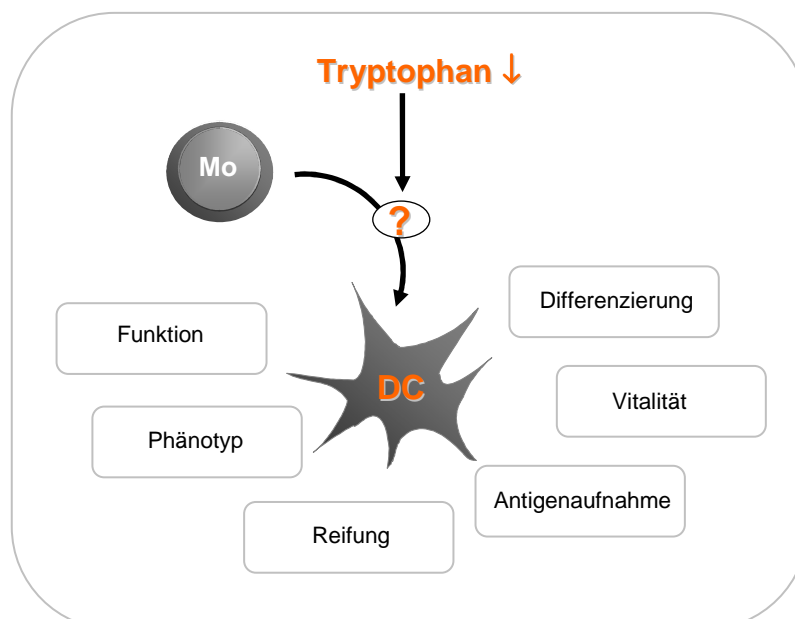
In zahlreichen Arbeiten der letzten Jahre konnte gezeigt werden, dass der Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan (trp) über den Kynureninweg nicht ausschließlich in Leberzellen stattfindet, sondern auch durch unterschiedliche Zellpopulationen, vor allem APCs, durch das induzierbare Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) erfolgt und dadurch das Immunsystem maßgeblich beeinflusst wird. Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Frage, inwieweit die trp-Depletion als immunologischer Toleranzmechanismus die biologische Funktion der antigen-präsentierenden Zelle (APC) beeinflusst.

Im Maussystem wurde gezeigt, dass der IDO Mechanismus *in vivo* für die T-Zell-toleranz entscheidend ist und zu immunologischer Toleranz gegenüber allogenen Föten führt (Munn et al., 1998). Darüber hinaus fördert die IDO Aktivität immunologische Toleranz gegenüber Tumoren, chronischen Infektionen, allergischen Erkrankungen sowie Autoimmunerkrankungen (von Bubnoff et al., 2004; Popov et al., 2006; von Bergwelt-Baildon et al., 2006; Puccetti & Grohmann, 2007; Munn & Mellor, 2007; Scheler et al., 2007; Romani et al., 2008). IDO muss, um effektiv sein zu können, trp aus dem extrazellulären Raum in die Zelle über einen '*L amino acid transporter*' transportieren (Castagna et al., 1997; Verrey et al., 1999; Kim et al., 2001; Kudo & Boyd, 2001; Zegarra-Moran et al., 2004), was lokal zur Reduktion von trp in den Extrazellularräumen führt (Munn et al., 1998). In Makrophagen wurde zusätzlich ein hochaffiner trp Transporter beschrieben, der im Vergleich zum L-System 100-fach stärker an trp bindet und der Zelle vermutlich erlaubt, trp im nanomolaren Bereich effektiv aufzunehmen (Seymour et al., 2006). Die Bildung von trp-Metaboliten als Folge der IDO Aktivität wird neben der trp-Verarmungstheorie als weiterer Regulationsweg diskutiert (Terness et al., 2002; Frumento et al., 2002; Fallarino et al., 2002a; Bauer et al., 2005).

Die suppressive Auswirkung des IDO bedingten trp-Mangels und/oder der Einfluss der entstandenen trp-Metaboliten wurden bisher in der Literatur vorwiegend auf T-Zellen untersucht. So konnten *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass der trp-Mangel den Eintritt aktivierter T-Zellen in die G1-Phase des Zellzyklus und somit die Proliferation verhindert. Zudem kommt es in Folge der IDO Aktivität zur Induktion von T-Zellenergie sowie zur Apoptoseinduktion aktivierter T-Zellen, wodurch die T-Zell-vermittelte Immunantwort inhibiert wird (Munn et al., 1999; Mellor & Munn, 1999; Lee et al., 2002; Fallarino et al., 2002a). Einige Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass Tregs den IDO Mechanismus zur Erhalt der eigenen Population nutzen (Belladonna et al., 2006; Fallarino et al., 2006b; Grohmann et al., 2007; Sharma et al., 2007; Hill et al., 2007). Hingegen existieren derzeit nur wenige Studien über einen Effekt der IDO Aktivität auf benachbarte IDO<sup>-</sup> APCs. Untersuchungen im Maussystem konnten zeigen, dass CD8<sup>+</sup> DCs nach IFN- $\gamma$ -induzierter IDO Expression im Vergleich zu IDO<sup>-</sup> CD8<sup>+</sup> DCs die antigen-präsentierende Funktion der immunogenen CD8<sup>-</sup> DC-Population hemmen (Grohmann et al., 2000). Zudem wurde nachgewiesen, dass IDO exprimierende DCs Toleranz auf immunogene IDO<sup>-</sup> DCs übertragen, indem die trp-Metaboliten von IDO<sup>-</sup> DCs aufgenommen werden und dort

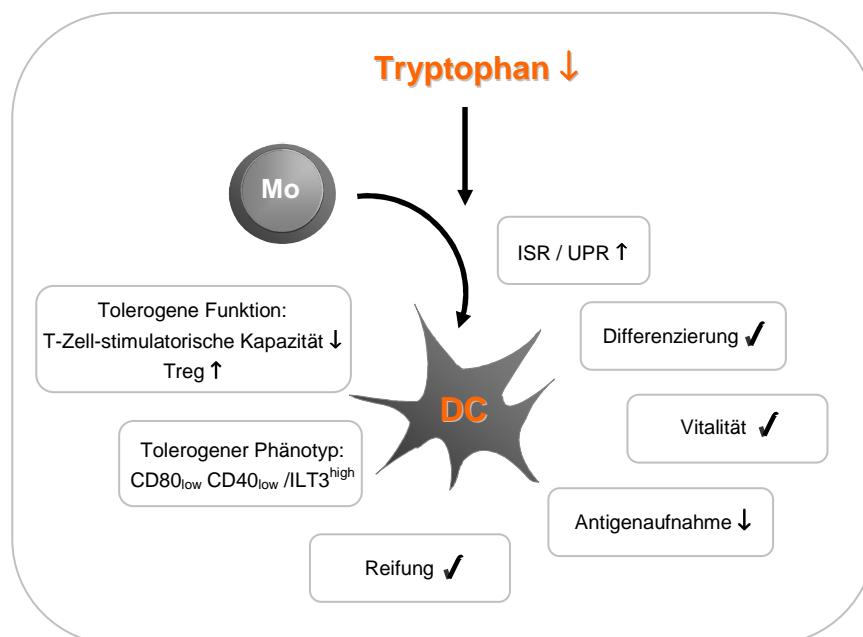
weiter abgebaut werden (Belladonna et al., 2006). Die Vermutung liegt nahe, dass neben zytotoxischen trp-Metaboliten die trp-Degradation als toleranzinduzierender Mechanismus eine immunmodulierende Wirkung auf DCs ausübt - insbesondere auf die Differenzierung der DCs, die in ein entzündetes Gewebe einwandern, in der dieIDO Aktivität hoch ist. Daher wurde in dieser Arbeit die Frage bearbeitet, inwieweit die trp-Depletion die Differenzierung und die biologische Funktion humaner myeloischer DCs *in vitro* beeinflusst. Die im Rahmen dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse zeigen einen neuen Mechanismus zur Induktion und Aufrechterhaltung von Toleranz durch tolerogene (supprimierende) bzw. regulatorische DCs auf, der durch den Mangel der essentiellen Aminosäure trp zustande kommt. Im folgenden Abschnitt werden zunächst die Hauptergebnisse zusammengefasst und in den nachstehenden Kapiteln diskutiert.

- a) Wird die Differenzierung der Monozyten zu DCs und deren Reifung durch das verminderte trp-Angebot beeinflusst?
- b) Weisen DCs unter trp-Mangel eine stärkere Anfälligkeit gegenüber Apoptose auf?
- c) Wird der induzierbare aminosäuresensitive GCN2 Signalweg in Folge des geringeren trp-Angebots in DCs aktiviert?
- d) Führt der trp-Mangel während der Differenzierung zu DCs zu einer phänotypischen Veränderung dieser Zellen?
- e) Werden in Folge der trp-Depletion Antigenaufnahme, Prozessierung und Präsentation von DCs beeinflusst?
- f) Ist die stimulatorische Funktion der DCs<sup>trp</sup> gegenüber T-Zellen eingeschränkt?
- g) Führt die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Antigen durch DCs<sup>trp</sup> zur Generierung von T-Zellen mit regulatorischer Funktion?



#### 4.1 Übersicht der Hauptergebnisse

(a und b) Anhand von *in vitro* Experimenten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass Monozyten unter *trp*-Mangel zu DCs differenzieren und ausreifen können und dass die Vitalität der DCs<sup>-trp</sup> nicht beeinflusst wird (Abb. 4-8). (c) In DCs<sup>-trp</sup> wurde die verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors CHOP, der durch Stresssignalwege in Folge von Aminosäuremangel und durch fehlgefaltete bzw. ungefaltete Proteine hochreguliert wird, gemessen (Abb. 9). (d) Erstmals konnte eine durch *trp*-Mangel bedingte Hochregulierung des inhibitorischen Rezeptors ILT3 in DCs<sup>-trp</sup> und gleichzeitig eine signifikant geringere Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD40 und CD80 gezeigt werden (Abb. 10, 11). (e) Neben dem tolerogenen Phänotyp (CD80<sub>low</sub> CD40<sub>low</sub>/ ILT3<sup>high</sup>) weisen diese Zellen funktionell eine deutlich verminderte Pinozytoseaktivität auf (Abb. 13). (f) Wie nach den Ergebnissen des immunologischen Profils der DCs<sup>-trp</sup> zu erwarten, konnte in einem antigen-spezifischen System mit Tetanus Toxoid (TT) eine signifikant geringere Proliferation TT-stimulierter T-Zellen durch autologe DCs<sup>-trp</sup> beobachtet werden (Abb. 16, 17). Durch den neutralisierenden ILT3 mAk wurde die verminderte stimulatorische Kapazität von DCs<sup>-trp</sup> partiell aufgehoben (Abb. 19). Während bei autologen T-Zellen eine geringere stimulatorische Kapazität durch DCs<sup>-trp</sup> festgestellt werden konnte, kam es beim Einsatz allogener DCs<sup>-trp</sup> zu keinem signifikanten Unterschied in der T-Zellstimulation (Abb. 20). (g) Autologe TT-beladene DCs<sup>-trp</sup> (CD80<sub>low</sub> CD40<sub>low</sub>/ ILT3<sup>high</sup>) sind in der Lage, während der 7-tägigen Kokultivierung mit CD4<sup>+</sup> T-Zellen, die Expression von Foxp3 in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen (T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup>) um den Faktor 2 zu erhöhen im Vergleich zu DCs<sup>+trp</sup> (T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup>) (Abb. 21). Durch die Verwendung des neutralisierenden ILT3 mAk wurde der Effekt der verstärkten Induktion von Foxp3 in T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> aufgehoben (Abb. 22). Eine regulatorische Funktion der T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> bzw. T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup> konnte anhand der deutlichen Proliferationsinhibition von antigen-stimulierten (TT) CD4<sup>+</sup> T-Zellen sowie polyklonal-stimulierten (anti-CD3) CD4<sup>+</sup> T-Zellen nachgewiesen werden. Darüber hinaus zeigten T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> sowohl in der polyklonalen als auch in der antigen-spezifischen Stimulation im Vergleich zu T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup> eine stärkere Proliferationsinhibition der CD4<sup>+</sup> T-Zellen (Abb. 23, 24).



## 4.2 Wird die Differenzierung der Monozyten zu DCs und deren Reifung durch den trp-Mangel beeinflusst?

(a) Bei DCs handelt es sich um hochpotente APCs, welche von hämatopoetischen Vorläuferzellen abstammen, die überall im Körper in unterschiedliche Gewebereiche einwandern. Anhand von *in vitro* Untersuchungen besteht die Möglichkeit, gezielt wichtige Funktionen von DCs zu untersuchen und zu simulieren, wenn diese bzw. ihre Vorläuferzellen in ein entzündetes Gewebe mit sehr niedriger trp-Konzentration in Folge hoher lokalerIDO Aktivität gelangen. Um zu klären, inwieweit der trp-Mangel die biologische Funktion der APCs *in vitro* beeinflusst, wurde die Auswirkung eines trp-verarmten Mikromilieus (5  $\mu\text{M}$  trp) auf DCs untersucht und mit DCs unter normalen Zellkulturbedingungen (30  $\mu\text{M}$  trp) verglichen. Zu diesem Zweck wurden humane DCs aus Monozyten generiert und 7 Tage in trp-Mangelmedium (DCs<sup>-trp</sup>) sowie unter normalen Bedingungen (DCs<sup>+trp</sup>) kultiviert. Ebenso wie Makrophagen und Monozyten entwickeln sich DCs wie epidermale Langerhans Zellen und dermale DCs aus den myeloischen Vorläuferzellen des Knochenmarks, wobei die einzelnen Entwicklungsstufen noch weitgehend unklar sind (Caux et al., 1992; Inaba et al., 1993; Pickl et al., 1996; Kohl, 2007). *In vitro* können myeloische DCs aus CD34<sup>+</sup> Stammzellen, CD14<sup>+</sup> Monozyten oder aus CD11c<sup>+</sup> Vorläuferzellen des peripheren Blutes unter Zusatz von verschiedenen Zytokinen gewonnen werden. Durch die Kombination von GM-CSF und IL-4 lassen sich ausreichende Mengen an unreifen myeloischen DCs aus Monozyten generieren, die sich durch die Expression von CD14, einem Bestandteil des LPS Rezeptors (TLR4), auszeichnen (Akagawa et al., 1996). Die so generierten DCs wurden in der vorliegenden Arbeit über den membranständigen DC-Marker CD1a charakterisiert. Sowohl Langerhans Zellen als auch dermale DCs exprimieren den Lipid-präsentierenden Rezeptor CD1a, dessen Struktur MHC Klasse-I Molekülen ähnelt (Hunger et al., 2004; Koch et al., 2006; Barral & Brenner, 2007). Zunächst erfolgten vergleichende Untersuchungen zur Differenzierung und Reifung dendritischer Zellen unter den genannten Versuchsansätzen.

Während der Differenzierung von CD14<sup>+</sup> Monozyten zu DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> wies die CD1a Expression keinen signifikanten Unterschied innerhalb der 7-tägigen Zellkultur auf, was für einen vergleichbaren Differenzierungsgrad der Zellen spricht. Im späteren Verlauf der Differenzierung (ab d6) waren DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> negativ für CD14 und zu 95% positiv für CD1a. Generell kommt es zur Herabregulierung von CD14 im Verlauf der Differenzierung zu DCs (Ziegler-Heitbrock & Ulevitch, 1993). Interessant war die Beobachtung, dass die CD14 Expression auf den Zellen unter trp-Mangel zwar nur schwach, aber über einen längeren Zeitraum im Verlauf ihrer Differenzierung (bis d5) sichtbar war, verglichen mit normal generierten Zellen (bis d4). Kürzlich konnte in einer Studie zeigen werden, dass humane Monozyten abhängig von der Expressionsintensität des GM-CSF Rezeptors auch durch die alleinige Gabe von GM-CSF, d.h. ohne IL-4, zu CD1a<sup>+</sup> DCs differenzieren können und dass diese bis d6 eine schwache CD14 Expression aufweisen. Diese CD14<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup> DCs zeichnen sich im Gegensatz zu CD14<sup>-</sup> CD1a<sup>+</sup> DCs nach einem TLR4-Stimulus bei gleichzeitiger Herabregulierung von CD14 durch eine hohe IL-10 sowie eine verminderte IL-12 Expression aus (Conti et al., 2008).

Ferner konnte anhand von Neutralisierungsexperimenten gezeigt werden, dass die erhöhte Expression von IL-10 für die geringe IL-12 sowie für die verminderte stimulatorische Kapazität dieser Zellen verantwortlich ist (Conti et al., 2008). DCs<sup>-trp</sup> zeigten jedoch nach TLR4-Stimulus an d6 keine signifikanten Unterschiede in der Zytokinexpression von IL-6, IL-10 und IL-12 im Vergleich zu DCs<sup>+trp</sup>. Dieser Befund spricht gegen eine Beteiligung der untersuchten Zytokine an der Modulation von T-Zellantworten durch DCs<sup>-trp</sup>. Dabei sollte jedoch berücksichtigt werden, dass die DCs aus beiden Kulturbedingungen an d6 bereits CD14 negativ waren. Daher sollte die Möglichkeit eines veränderten Zytokinmusters der CD14<sup>+</sup> CD1a<sup>+</sup> DCs<sup>-trp</sup> und der CD14<sup>-</sup> CD1a<sup>+</sup> DCs<sup>+trp</sup> an d5 nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt spricht die generelle Herabregulierung von CD14 bei gleichzeitiger Aufregulation von CD1a im Verlauf der Differenzierung zum einen dafür, dass es sich bei den Zellen aus beiden Kulturbedingungen um die in der Literatur beschriebenen Zellen handelt (Akagawa et al., 1996), und zum anderen, dass Monozyten trotz trp-Mangels zu myeloischen DCs differenzieren können.

Ferner konnte in beiden Zellkulturen lichtmikroskopisch der typische Phänotyp immaturer DCs (iDCs) mit großen Zellkörpern und feinen zytoplasmatischen Ausläufern detektiert werden. Generell wiesen DCs<sup>-trp</sup> im Gegensatz zu DCs<sup>+trp</sup> eine etwas geringere Zell- und Clustergröße auf. Ebenso bestätigte die durchflusszytometrische Analyse an d6 den Unterschied in der Einzelzellgröße, wobei auch eine geringere Granularität im Vergleich zu DCs<sup>+trp</sup> festgestellt wurde. Eine verstärkte Apoptose dieser Zellen konnte jedoch ausgeschlossen werden, da keine erhöhte Apoptoserate in unreifen sowie reifen DCs<sup>-trp</sup> nach TLR-Stimulation festgestellt werden konnte. Als Ursache für die verminderte Zellgröße kommt vermutlich eine Verminderung der anabolen Prozesse des Zellstoffwechsels durch trp-Mangel in Betracht. Genauso wie das Wachstum wird auch die Größe einer Zelle von Komponenten des Aktin-Zytoskeletts beeinflusst. Stress führt in eukaryontischen Zellen zu einer Vielzahl von Reaktionen, von denen auch das Aktin-Zytoskelett betroffen ist (Vicente-Manzanares & Sanchez-Madrid, 2004). Aktinfilamente sorgen vor allem in netzartigen Anordnungen unterhalb der Plasmamembran für die Stabilisierung der äußeren Form der Zelle (Soldati & Schliwa, 2006). Der trp-Mangel könnte Einfluss auf die Zellgröße nehmen, indem die Transkriptions- und Translationsmaschinerie durch die Synthese der für das Zellwachstum benötigten Proteine inhibiert wird. Ein verminderter Stoffwechsel aufgrund des trp-Mangels, könnte auch eine Erklärung für die geringere Granularität der DCs<sup>-trp</sup> sein, da es sich bei den Granula um Einlagerungen der Zellen, die meist Speicher oder Sekretstoffe enthalten, handelt. Der beobachtete Unterschied in der Clustergröße bei unreifen DCs<sup>-trp</sup> könnte auf die verminderte Expressionsintensität der  $\alpha$ -Integrine CD11b und CD11c zurückzuführen sein, die für die Adhäsion der Zellen von großer Bedeutung sind.

Um zu überprüfen, ob die DCs<sup>-trp</sup> verglichen mit DCs<sup>+trp</sup> normal ausreifen können, wurde die Expression von CD83, einem in der Wissenschaft anerkannten Reifungsmarker, nach TLR3 Stimulation gemessen (Weissman et al., 1995; Zhou & Tedder, 1995a; Zhou & Tedder, 1995b; Zhou & Tedder, 1996). Das membranständige und zur Immunglobulin-Superfamilie zugehörige CD83 Molekül wird auf der Oberfläche

von reifen DCs (mDCs) hochreguliert und spielt vermutlich eine Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen (Prechtel & Steinkasserer, 2007). Mittels durchflusszytometrischer Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass mDCs<sup>-trp</sup> und mDCs<sup>+trp</sup> keinen signifikanten Unterschied in der Oberflächenexpression von CD83 aufwiesen. Dies deutet darauf hin, dass die Fähigkeit zur Reifung der mDCs trotz trp-Mangels nicht eingeschränkt wird. Insgesamt implizieren die erhobenen Daten, dass ein verringertes trp-Angebot während der Generierung von DCs aus Monozyten nicht die Differenzierung und Ausreifung dieser Zellen beeinflusst, welches durch die Morphologie der DCs, die Expression von CD1a und die generelle Aufregulierung der kostimulatorischen Moleküle CD83, CD40, CD80 sowie MHC Klasse-I- und MHC Klasse-II Moleküle nach dem Reifungsstimulus gezeigt werden konnte.

#### **4.3 Weisen DCs unter trp-Mangel eine stärkere Anfälligkeit gegenüber Apoptose auf?**

(b) Aufgrund der beschriebenen pro-apoptotischen Wirkung von trp-Mangel auf aktivierte T-Zellen (Munn et al., 1999; Lee et al., 2002) wurde die Vitalität und die Sensitivität gegenüber Apoptose von DCs<sup>-trp</sup> untersucht. *In vitro* Studien von Munn und Mellor konnten zeigen, dass ein trp-vermindertes Mikromilieu sich inhibierend auf die Proliferation von T-Effektorzellen auswirken kann und somit die T-Zell-vermittelte Immunantwort beeinträchtigt (Munn et al., 1999; Mellor & Munn, 1999). So konnten *in vitro* Untersuchungen zeigen, dass der trp-Mangel den Eintritt aktivierter T-Zellen in die G1-Phase des Zellzyklus und somit die Proliferation verhindert und zum anderen deren Sensitivität gegenüber einer Apoptoseinduktion erhöht (Terness et al., 2002; Lee et al., 2002). Ferner konnte gezeigt werden, dass die durch den trp-Abbau entstandenen Metabolite besonders in aktivierten T-Zellen sowie in B- und NK-Zellen Apoptose induzieren und dementsprechend inhibierend auf die T-Zellproliferation wirken (Bauer et al., 2005). *In vivo* führt die systemische Inhibition des trp-limitierenden Enzyms IDO durch 1-Methyl-Tryptophan zur T-Zell-vermittelten Abstoßung allogener Föten im Mausmodell (Munn et al., 1998). Die in der Literatur beschriebene apoptotische Wirkung des trp-Mangels auf T-Zellen konnte anhand der in dieser Arbeit verwendeten Methode unter Einsatz von FITC-gekoppeltem Annexin V auf DCs<sup>-trp</sup> nicht beobachtet werden. Die in dieser Arbeit gezeigte Resistenz der DCs gegenüber einer trp-Mangel bedingten Apoptose ergänzen die Befunde von Bauer und Terness, die eine toxische Wirkung der trp-Metaboliten auf IDO<sup>+</sup> DCs untersucht haben und in diesem Zusammenhang ebenfalls keine verstärkte Apoptoseinduktion in DCs feststellen konnten. Weitere Anhaltspunkte, dass die IDO-vermittelte Apoptose selektiv auf unterschiedliche Zellpopulationen wirkt, geben die Ergebnisse von Fallarino und Mitarbeitern. So führte die IDO-vermittelte trp-Degradation und der gleichzeitige Anstieg der primären Metaboliten selektiv zur Apoptose von T<sub>H</sub>1-Zellen, während naive T-Zellen des T<sub>H</sub>2-Types wesentlich resistenter gegenüber dieser Form der Apoptoseinduktion waren (Fallarino et al., 2002a). Zudem konnte kürzlich bei ILT2<sup>+</sup> DCs, die durch ILT2 Ligation im Verlauf ihrer Differenzierung einen tolerogenen Phänotyp ausprägen, eine Resistenz gegenüber einer CD95L/CD95-vermittelten

Apoptose beobachtet werden (Young et al., 2008). Zwar zeigen die generierten DCs<sup>-trp</sup> an d6 und d7 der Zellkultur keine erhöhte Apoptoserate und keinen Unterschied in der 7-AAD- sowie Trypanblaufärbung, jedoch konnte eine 10 % geringere Ausbeute der Zellen gegenüber DCs<sup>+trp</sup> beobachtet werden. Da die Annexin V Färbung am Ende der Differenzierung durchgeführt wurde, können apoptotische Zellen am Anfang der Zellkultur unter trp-Depletion nicht ausgeschlossen werden.

#### 4.4 Wird der induzierbare aminosäuresensitive GCN2 Signalweg in Folge des geringeren trp-Angebots in DCs aktiviert?

(c) Da der trp-Mangel keine Auswirkung auf Differenzierung, Ausreifung und Vitalität der DCs<sup>-trp</sup> verglichen mit DCs<sup>+trp</sup> zeigte, ergab sich die Frage, ob DCs unter trp-Mangel aktive Gegenmaßnahmen einleiten, um eine optimale Adaptation an die Umgebung zu gewährleisten. Bei der 'Integrated Stress Response' (ISR) handelt es sich um einen Signalweg, der für das Überleben und für die Anpassung der Zelle unter Stressbedingungen essentiell ist. Im Rahmen der ISR wird durch trp-unbeladene tRNAs der GCN2 (*general control non-depressing 2 protein kinase*) Signalweg induziert. Dieser Stresssignalweg wird als grundlegender Mechanismus für dieIDO-vermittelte Toleranzinduktion in der Literatur mehrfach diskutiert. In antigen-aktivierten T-Zellen führt funktionelles IDO in Abhängigkeit der GCN2 Aktivierung zur T-Zellangergie sowie zum Arretieren des Zellzyklus und somit zur Proliferationsinhibition (Munn et al., 2005; Fallarino et al., 2006b; Puccetti & Grohmann, 2007). Durch die Kombination der trp-Depletion und der trp-Metaboliten wird über die Induktion des GCN2 Signalweges die TCR  $\xi$ -Kette herunterreguliert und gleichzeitig ein regulatorischer Phänotyp in naiven CD4<sup>+</sup> T-Zellen induziert (Fallarino et al., 2006a).

Die ISR bewirkt durch die aminosäuresensitive GCN2 Kinase eine Genregulation auf translationaler Ebene und beeinflusst den Zellzyklus und die Differenzierung der T-Zellen. Die aktivierten GCN2 Protein Kinasen phosphorylieren den Initiationsfaktor eIF2 $\alpha$ , was zum allgemeinen Translationsstopp bei gleichzeitiger selektiver Translation diverser Gene wie dem Transkriptionsfaktor ATF4 (*activating transcription factor 4-mRNA*) führt. Dieser induziert unter anderem Proteine, die am Aminosäure-Import beteiligt sind sowie den Transkriptionsfaktor CHOP (*C/EBP homologous protein*) (Fafournoux et al., 2000; Harding et al., 2000; Wek et al., 2006; Zhang & Kaufman, 2006). Die erhöhte CHOP Expression führt zur Blockierung der G1- S-Phase des Zellzyklus. Die Dimerisierung von CHOP mit anderen C/EBP Proteinen führt dazu, dass CHOP Dimere für 'klassische' C/EBP Bindungsstellen nicht mehr zur Verfügung stehen. CHOP moduliert demnach negativ C/EBP-like Proteine in verschiedenen Zellpopulationen.

Um die Expression der GCN2 Kinase in DCs<sup>-trp</sup> im Verlauf der Generierung zu messen, wurde der in der Literatur beschriebene Marker CHOP für die GCN2 Aktivierung in T-Zellen (Munn et al., 2005) untersucht. Die verstärkte Induktion von CHOP in DCs<sup>-trp</sup> an d6 und dessen Herunterregulierung auf DCs<sup>+trp</sup> deutet darauf hin, dass ein trp-Mangel, während der Differenzierung der Monozyten zu DCs, auch zur Induktion des GCN2

Signalweges in DCs führt. Die erhöhte CHOP Expression in Monozyten an d0 könnte auf einen Isolationstress beruhen. Dieser Befund stimmt mit neuen Studien von Manlapat und Mitarbeitern überein, in denen nachgewiesen werden konnte, dass durch denIDO-vermittelten trp-Abbau die GCN2 Kinase ebenfalls in CD19<sup>+</sup> murinen DCs aktiviert wird. So konnte durch Versuche an GCN2 *Knock-out* Mäusen gezeigt werden, dass die IFN- $\alpha$  Expression nach B7-vermittelter IDO Induktion in DCs GCN2 abhängig erfolgt (Manlapat et al., 2007).

Obwohl CHOP neben dem Aminosäure-Mangel auch durch andere Stressfaktoren wie beispielsweise ER (endoplasmatisches Retikulum) -Stress durch die 'Unfolded Protein Response' (UPR) hochreguliert wird, ist seine verstärkte Expression in T-Zellen spezifisch für den GCN2 Signalweg. Durch die Entdeckung, dass in GCN2 *Knock-out* Mäusen die trp-Mangel bedingte Hochregulierung von CHOP verhindert wird, wurde CHOP als *downstream* Marker für die GCN2 Aktivierung in T-Zellen etabliert (Munn et al., 2005). Die Literatur liefert noch keine direkten Hinweise darüber, ob CHOP für den GCN2 Signalweg in DCs spezifisch ist. Daher besteht die Wahrscheinlichkeit, dass ein trp-Mangel ebenfalls Proteinfehlfaltungen verursacht und damit die UPR induziert. Einen Hinweis, dass der Aminosäure-Mangel die Genexpression unabhängig von ER-Stress moduliert, liefern Versuche in denen gezeigt werden konnte, dass beide Signalwege unterschiedliche Promotorregionen von CHOP nutzen. Zudem korreliert die Aminosäure-Depletion nicht mit einer verstärkten Expression von ER-Chaperonen (Fafournoux et al., 2000). Unter anderem steht CHOP, auch bekannt als GADD153 (*Growth arrest DNA damage inducible gene 153*), im Zusammenhang damit in der späten Phase der ISR sowie der UPR Apoptose zu induzieren (Oyadomari & Mori, 2004). Wie bereits im vorherigen Kapitel beschrieben, konnte in unreifen und reifen DCs<sup>-trp</sup> keine erhöhte Anfälligkeit gegenüber einer trp-Mangel induzierten Apoptose beobachtet werden. Die gezeigten Ergebnisse und die Angaben der Literatur führen zu der Annahme, dass der aminosäuresensitive GCN2 Signalweg in Folge des verminderten trp-Angebots in DCs induziert wird und für die metabolische Adaptation verantwortlich sein könnte.

#### **4.5 Führt ein geringes trp-Angebot während der Differenzierung zu einer phänotypischen Veränderung dieser Zellen?**

(d) Nachdem lange Zeit das Hauptaugenmerk der Forschung auf der Untersuchung pro-inflammatorischer Mechanismen lag, haben Stein und Mitarbeiter 1992 mit dem Konzept der 'alternativen immunologischen Aktivierung' von APCs die anti-inflammatorische Gegenregulation in den Vordergrund gerückt (Stein et al., 1992). So konnte gezeigt werden, dass es sich bei 'alternativ aktivierte' Makrophagen, die mit anti-inflammatorisch wirksamen Substanzen wie Glukokortikoiden oder IL-4 behandelt wurden, nicht nur um deaktivierte Zellen handelt, denen pro-inflammatorische Mediatoren fehlen, sondern, dass diese durchaus 'aktive' APCs darstellen, die Antigene aufnehmen, prozessieren sowie Antigenpeptide präsentieren können. Funktionell führen 'alternativ aktivierte' Makrophagen zur Herabregulierung des Entzündungsgeschehens und zur Suppression der



adaptiven Immunantwort. Arbeiten der letzten Jahre zeigten, dass neben Makrophagen auch andere APCs wie DCs unter bestimmten Voraussetzungen 'alternativ aktiviert' werden und somit über ihre tolerogene Wirkung die Immunantwort regulieren können. So zeichnen sich tolerogene DCs durch die Expression der erst 1997 entdeckten ILT (*Immunoglobulin-like transcript*; CD85; LIR; MIR) Rezeptoren aus (Manavalan et al., 2003).

In der Literatur wurde mehrfach beschrieben, dass den inhibitorischen ILTs eine wichtige Bedeutung bei der Toleranzinduktion zukommt (Vlad et al., 2003; Penna et al., 2005). Alle Vertreter der ILT Rezeptoren, sowohl die aktivierenden als auch die inhibierenden, werden neben DCs auch von Monozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Endothelzellen exprimiert und unter bestimmten Bedingungen hochreguliert. So konnte gezeigt werden, dass regulatorische CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T-Zellen auf Monozyten und DCs eine Hochregulierung der inhibitorischen Rezeptoren ILT3 (CD83k) und ILT4 (CD85j) induzieren, woraufhin diese APCs eine niedrige Expression kostimulatorischer Moleküle aufweisen. Aufgrund der fehlenden Kostimulation konnten APCs durch die Induktion von T-Zellanergie die Toleranz gegenüber den CD4<sup>+</sup> T-Zellen etablieren. Parallel wurde an Patienten gezeigt, dass die Abstoßung eines Transplantates mit der fehlenden Hochregulierung von ILT3 und ILT4 in allogenen DCs einhergeht (Chang et al., 2002). In DCs führt die Interaktion mit Tregs oder auch die Stimulation mit IL-10 in Kombination mit IFN- $\alpha$  oder Vitamin D3 zur Hochregulierung von ILT3 (Cella et al., 1997; Manavalan et al., 2003; Suci-Foca et al., 2003; Penna et al., 2005). Gleichzeitig sind Tregs, IL-10 und IFN- $\alpha$  Mediatoren für dieIDO Induktion in APCs (Munn et al., 2002; Fallarino et al., 2003; Scheler et al., 2007; Maneglier et al., 2007). Im Rahmen dieser Arbeit konnte erstmalig ein Zusammenhang zwischen dem IDO-vermittelten trp-Mangel und der verstärkten Expression von inhibitorischen ILTs nachgewiesen werden. So wurden eine starke Hochregulierung von ILT3 und eine schwächere Hochregulierung von ILT2 durch trp-Mangel in DCs *in vitro* gezeigt. Zudem weisen die in der frühen Phase der Differenzierung gezeigte Hochregulierung von ILT3 DCs<sup>-trp</sup> sowie die stabile ILT3 Expression nach externer Zugabe von trp zum Zeitpunkt der stärksten ILT3 Expression an d3 auf eine stabile und frühe Induktion des tolerogenen Phänotyps hin. Die in dieser Arbeit gezeigte verminderte Expression von CD40 und CD80 in DCs<sup>-trp</sup> bei gleichzeitiger Aufregulierung des inhibitorischen Rezeptors ILT3 auf iDCs<sup>-trp</sup> gegenüber iDCs<sup>+trp</sup> sowie der signifikanten Hochregulierung beider inhibitorischer Rezeptoren ILT2 und ILT3 in Folge der Reifung bestätigt die Angaben der Literatur über die supprimierende Wirkung kostimulatorischer Moleküle. Inhibitorische Rezeptoren wie ILT2 und ILT3 vermitteln eine Hemmung der Zellaktivierung unter Einbeziehung der Phosphatase SHP-1. Durch Phosphorylierung der ITIMs entsteht eine Bindungsstelle für Phosphatasen (Smith et al., 1998; Ravetch & Lanier, 2000). Diese dephosphorylieren ihrerseits dann Effektormoleküle, wodurch die Signalübertragung gehemmt oder sogar verhindert wird (Li et al., 1999; Chang et al., 2002; Tone et al., 2002; Ju et al., 2004). So konnte in zahlreichen Arbeiten beobachtet werden, dass es in Folge der verstärkten Expression von ILT2, ILT3 sowie ILT4 zur Inhibition des NF- $\kappa$ B Signalweges kommt, woraufhin die Expression von kostimu-

latorischen Molekülen wie CD40 und CD80 gehemmt wird (Li et al., 1999; Chang et al., 2002; Tone et al., 2002; Ju et al., 2004).

In einer neueren Studie wird postuliert, dass dieIDO Aktivität verantwortlich für die erhöhte Expression von kostimulatorischen Molekülen sowie MHC Klasse-II Molekülen ist und damit wichtig für die Reifung humaner DCs *in vitro* (Hill et al., 2007). Um den autokrinen Effekt von IDO auf DCs zu untersuchen, wurde in der Studie von Hill und Mitarbeitern IDO durch LPS Stimulation induziert und mit DCs verglichen, die zusätzlich zur Hemmung der IDO Funktion mit dem systemischen Inhibitor 1-MT versetzt wurden. Diese Daten stehen nicht direkt im Widerspruch zu den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, da IDO nicht während der Differenzierung der DCs<sup>-trp</sup> induziert wurde, sondern ausschließlich der trp-Mangel auf DCs untersucht wurde. Es ist durchaus anzunehmen, dass durch die Aktivierung von IDO diverse Gene verstärkt exprimiert werden können. Jedoch belegen einige Studien einen indirekten Effekt von 1-MT auf DCs. Die Daten von Kudo und Boyd zeigen, dass die Verwendung des systemischen Inhibitors 1-MT konzentrationsabhängig den trp-Transport in die Zelle kompetitiv hemmen kann (Kudo & Boyd, 2001). Neben der Inhibition der IDO Aktivität steht somit gleichzeitig der Zelle selbst weniger trp zur Verfügung, woraufhin sie indirekt einem IDO Milieu trotz IDO Inhibition ausgesetzt ist. Den IDO Effekt durch 1-MT zu hemmen scheint demnach ungeeignet zu sein, um Rückschlüsse auf die Ausreifung dendritischer Zellen in Folge der IDO Aktivität zu ziehen. In Versuchen von Agaugué und Mitarbeitern konnte gezeigt werden, dass 1-MT IDO unabhängig nach LPS Stimulation die Reifung und die Funktion von DCs durch die erhöhte Phosphorylierung der ERK (*extracellular-regulated kinase*) und p38-MAPK (*mitogen activated protein kinase*) beeinflusst, was die Induktion von T<sub>H</sub>2 Zellen fördert (Agaugué et al., 2006). In der Literatur wird derzeit diskutiert, ob der Reifungsstatus der DCs durch das Gleichgewicht von ERK und p38-MAPK bestimmt wird. Die aktivierte p38-MAPK führt unter anderem zur verstärkten Expression von kostimulatorischen Molekülen wie CD83, CD80 und CD86, jedoch bestätigen die Untersuchungen von Agaugué und Mitarbeitern den Befund einer verminderten Expression der kostimulatorischen Moleküle in DCs durch 1-MT. Dies könnte dadurch zu erklären sein, dass 1-MT ebenfalls ERK aktiviert woraufhin die Expression von kostimulatorischen Molekülen und MHC Klasse-II Molekülen inhibiert wird (Rescigno et al., 1998; Ardeschna et al., 2000; Puig-Kroger et al., 2001; Yu et al., 2004; Agaugué et al., 2006). Demnach könnte die Aktivierung von ERK durch 1-MT einen indirekten Effekt auf die Reifung der DCs besitzen, der sich inhibierend auf kostimulatorische Moleküle auswirkt. Vergleichende Untersuchungen mit IDO<sup>+</sup> DCs und DCs von IDO defizienten Mäusen könnten Aufschluss darüber geben, ob die IDO Aktivität die Reifung der DCs begünstigt.

Ein weiterer interessanter Aspekt war die Untersuchung der Oberflächenexpression von Integrinen, da sich in der Literatur Belege für den Einfluss von ILT3 auf Adhäsionsmoleküle finden. So führt in Endothelzellen die Treg-vermittelte Induktion von ILT3 und ILT4 nicht ausschließlich zur T-Zellanergie durch die verminderte Expression kostimulatorischer Moleküle. Es wurde zusätzlich in Endothelzellen eine geringere Expression von Adhäsionsmolekülen gezeigt, woraufhin möglicherweise die Immigration von Leukozyten

erschwert wird (Manavalan et al., 2004). Integrine bestehen aus einer  $\alpha$ - und  $\beta$ -Kette und vermitteln Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen. Daher wird vermutet, dass sie für das Erreichen eines Bestimmungsortes (*homing*) von Leukozyten und für die Induktion einer Immunantwort eine Rolle spielen (van Kooyk & Figdor, 2000). Im Rahmen der Immunphänotypisierung wurden neben der verstärkten ILT3 Expression, besonders in unreifen DCs<sup>-trp</sup> Unterschiede in der Expressionsintensität der  $\alpha$ -Integrine ( $\alpha$ -Ketten CD11b und CD11c) nachgewiesen, die ihre Adhäsion im Gewebe beeinflussen könnten. Es wurde eine signifikant schwächere Expression von CD11b und CD11c in iDCs<sup>-trp</sup> gegenüber iDCs<sup>+trp</sup> gezeigt. Der trp-Mangel könnte demnach die Adhäsionsfähigkeit von unreifen DCs vermindern und ein Abwandern in afferente Lymphgefäße erleichtern. Die CD11b und CD11c Expression von mDCs<sup>-trp</sup> blieb im Verlauf ihrer Reifung auf dem niedrigen Niveau, während mDCs<sup>+trp</sup> diese Integrine herabregulierten, so dass der in unreifen DCs gezeigte Unterschied in der CD11b und CD11c Expression ausgeglichen wurde. Die generelle Herabregulation der  $\alpha$ -Integrine CD11a, CD11b und CD11c nach TLR3 Stimulation auf mDCs<sup>+trp</sup> bestätigt die Daten der Literatur, in denen nach Ausreifung durch TLR Stimulation eine Abnahme der CD11b/CD18 und CD11c/CD18 -vermittelten Adhäsion gezeigt wurde (Burns et al., 2004). Der Befund, dass die Expressionsintensität von CD11b und CD11c keinen Unterschied zwischen mDCs<sup>-trp</sup> und mDCs<sup>+trp</sup> zeigt, könnte bedeuten, dass die Abwanderung zu den afferenten Lymphgefäßen nicht durch den trp-Mangel eingeschränkt wird. Darüber hinaus konnte festgestellt werden, dass CD11a signifikant stärker auf unreifen und reifen DCs<sup>-trp</sup> exprimiert wurde als auf DCs<sup>+trp</sup>. Dieser Unterschied war, verglichen mit der deutlich geringeren Expression von CD11b und CD11c unreifer DCs<sup>-trp</sup>, geringfügig und spielt daher vermutlich eine untergeordnete Rolle in der Adhäsionsfähigkeit der DCs. Inwieweit Integrine für die Migration von Leukozyten innerhalb eines Gewebes erforderlich sind, ist in der Literatur umstritten (Friedl et al., 1998; Fiorini et al., 2002; Lämmermann et al., 2008). Kürzlich konnte anhand von *Knock-out* Mäusen, in denen die Gene für alle Leukozyten Integrin-Heterodimere deaktiviert wurden, festgestellt werden, dass Integrine für die spontane Migration im dreidimensionalen System nicht erforderlich sind (Lämmermann et al., 2008). Zudem konnte in einer Dissertation aus der Arbeitsgruppe Kolanus der Universität Bonn gezeigt werden, dass die Migration reifer DCs auch Integrin-unabhängig durch Cytohesin-1 und dem Cytohesin-interagierende Protein (CYTIP) reguliert werden kann (Tappertzhofen, 2007). In diesem Zusammenhang könnte beispielsweise die Untersuchung des Chemokin Rezeptors CCR7 Aufschluss über das Migrationsverhalten der mDCs<sup>-trp</sup> geben, da CCR7 eine wichtige Rolle bei der Migration in die benachbarten Lymphknoten zukommt.

Die Literatur und die erzielten Ergebnisse zur Immunphänotypisierung führen zu der Hypothese, dass es sich nicht um ein reines 'Aushungern' der Zellen handelt, sondern geben vielmehr einen Hinweis darauf, dass ein aktiver Prozess der Zellen in Folge des trp-Mangels induziert wird. Demnach unterstützen diese Daten das von Stein und Mitarbeiter 1992 vorgestellte Konzept der 'alternativen immunologischen Aktivierung' von APCs als anti-inflammatorische Gegenregulation. Die Aktivierung der GCN2 Kinase durch trp-unbeladene tRNAs könnte ein Mechanismus für die Entstehung des tolerogenen

Phänotyps (CD80<sub>low</sub> CD40<sub>low</sub>/ ILT3<sup>high</sup>) in DCs<sup>-trp</sup> darstellen. Diese Annahme wird gestützt durch die erhöhte Induktion von CHOP im Verlauf der Differenzierung der DCs<sup>-trp</sup> verglichen mit DCs<sup>+trp</sup>. Diese Annahme könnte durch weiterführende Versuche, in denen die GCN2 Kinase beispielsweise durch Gen *Knock-down* inhibiert wird, bestätigt werden. Ferner deuten die hier präsentierten Daten erstmals die Möglichkeit einer alleinigen Beteiligung der trp-Depletion ohne Anwesenheit von trp-Metaboliten bei der Entstehung und Aufrechterhaltung der Immuntoleranz durch tolerogene ILT3<sup>high</sup> DCs an. Ob die Induktion von ILT3<sup>high</sup> DCs durch die trp-Depletion und trp-Metaboliten synergetisch verstärkt wird oder die trp-Metaboliten auch einen alleinigen Effekt auf DCs ausüben, wurde in der vorliegenden Arbeit nicht untersucht, jedoch soll diese Fragestellung in weiterführenden Experimenten behandelt werden.

#### 4.6 Werden in Folge der trp-Depletion Antigenaufnahme, -Prozessierung und -Präsentation von DCs beeinflusst?

(e) Die Fähigkeit Antigene aufzunehmen ist eine grundsätzliche Funktion intakter iDCs. DCs sind die potentesten APCs, die bekannt sind und initiieren eine deutlich effektivere Immunantwort als andere APCs (Monozyten, Makrophagen oder B-Zellen), da sie ein breites Spektrum an Krankheitserregern und Antigenen aufnehmen, prozessieren und präsentieren können (Lutz & Schuler, 2002; Steinman & Banchereau, 2007; Burgdorf & Kurts, 2008). Mit Hilfe der Rezeptor-vermittelten Endozytose durch Fc-Rezeptoren oder des Mannoserezeptors sind unreife DCs unter anderem in der Lage Antikörper-Antigenkomplexe zu binden und große Mengen an Antigenen aufzunehmen (Anderson, 1989; Nimmerjahn & Ravetch, 2007). Durch Makropinozytose erfolgt eine unspezifische Aufnahme extrazellulärer Antigene (Lanzavecchia, 1996; Falcone et al., 2006). Die gezeigte stark verminderte Pinozytoseaktivität der DCs<sup>-trp</sup> und die signifikant geringere Expression des IgG Fc-Rezeptors Typ II (FcγRII; CD32) im Vergleich zu DCs<sup>+trp</sup> weisen auf eine eingeschränkte Antigenaufnahme nach trp-Mangel hin.

In dieser Arbeit wurden des Weiteren Oberflächenmoleküle der DCs untersucht, die wichtig sind für die Antigen-Prozessierung und für die Präsentation der Antigenpeptide. Die MHC-II-assoziierte invariante Kette (Ii; CD74), ein Typ-II Transmembranprotein, fördert unter anderem den Zusammenbau von MHC Klasse-II Molekülen im ER und sorgt für einen Transport von MHC Klasse-II Molekülen zu endo-/lysosomalen Zellkompartimenten, die dort nach der Peptidbeladung auf die Zelloberfläche der APCs transportiert werden. Der Bereich, mit dem sich Ii in die Bindungsgrube von MHC Klasse-II Molekülen legt, wird als CLIP (*class II invariant chain peptides*) bezeichnet (Bakke & Nordeng, 1999; Busch et al., 2005; Neumann et al., 2007). Aminosäuremangel kann Fehlfaltungen der in das ER hineinsynthetisierten Proteine verursachen und demnach dazu führen, dass diese nicht an die Zelloberfläche gelangen oder wieder im ER abgebaut werden. In der Literatur gibt es Hinweise, dass auch bei einem Fehlen von Ii die MHC Klasse-II Moleküle im ER zurückgehalten werden (Stumptner-Cuvelette & Benaroch, 2002). Die in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse einer signifikant niedrigeren

Oberflächenexpression von CLIP und MHC Klasse-II Molekülen auf unreifen DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup> lassen vermuten, dass der Transport neu synthetisierter Ii und MHC Klasse-II Moleküle zum endosomalen Kompartiment eingeschränkt ist oder sie im ER durch Fehlfaltungen zurückgehalten werden und somit nicht die Zelloberfläche gelangen. Einen weiteren Erklärungsansatz für die verminderte Expression von CLIP und MHC Klasse-II Molekülen der unreifen DCs<sup>-trp</sup> sowie die eingeschränkte Pinozytoseaktivität bietet die Aktivierung der stressabhängigen ISR- oder/und der UPR Signalwege in Folge der trp-Depletion durch Genregulation auf translationaler sowie transkriptionaler Ebene. Die Verminderung der anabolen Prozesse des Zellstoffwechsels durch trp-Mangel könnte das Aktin-Zytoskelett beeinflussen, so dass der Kreislauf bzw. ein 'turn over' zwischen MHC Klasse-II Moleküle und Endosomen eingeschränkt sein könnte. In Neutrophilen aus menschlichem Blut wurde durch zellulären Stress die Inhibierung von Endozytose und Exozytose nachgewiesen (Rizoli et al., 2000). Neben der Stabilisierung membranständiger Proteine sind Aktin/Myosin Interaktionen für den Kurzstreckentransport zum Beispiel von Vesikeln zur Plasmamembran verantwortlich, wobei der Langstreckentransport von Mikrotubuli/Dynein und Kinesin übernommen wird (Soldati & Schliwa, 2006).

Nach Ausreifung der DCs durch eine TLR3-vermittelte Stimulation konnte die in unreifen DCs<sup>-trp</sup> beobachtete geringere Oberflächenexpression von CLIP und MHC Klasse-II Molekülen nicht mehr detektiert werden. Ebenfalls konnten die durchgeführten Pulse Chase- und Westernblot-Analysen zeigen, dass die geringere Oberflächenexpression von MHC Klasse-II Molekülen und die des Ii Bestandteils CLIP nicht der intrazellulären Proteinexpression von unreifen DCs<sup>-trp</sup> entspricht. Die Ausreifung der DCs bewirkt Veränderungen im Zytoskelett, woraufhin das Migrationsvermögen und das Adhäsionsverhalten der Zellen beeinflusst wird (Flores-Romo, 2001; Burns & Thrasher, 2004; Randolph et al., 2007b). Durch diese komplexen Prozesse könnte ein eingeschränkter Transport und 'turn over' von CLIP und MHC Klasse-II Molekülen unreifer DCs<sup>-trp</sup> kompensiert werden. Ferner zeigte die Proteinbiosynthese von HLA-DM Molekülen, welche die Beladung von MHC Klasse-II Molekülen mit Peptidantigenen katalysiert, keinen wesentlichen Unterschied. Dagegen exprimierten DCs<sup>-trp</sup> im Zuge der Reifung weniger MHC Klasse-I Moleküle gegenüber DCs<sup>+trp</sup> auf der Zelloberfläche. Dieser Befund spricht für eine verminderte Präsentation proteasomal degradiertes, zytosolischer Proteine, die zelleigenen oder pathogenen Ursprungs (z.B. virale- oder Tumorantigene) sein können (Mellman & Steinman, 2001).

Insgesamt implizieren diese Ergebnisse, dass zwar die Antigenaufnahme der iDCs<sup>-trp</sup> eingeschränkt ist, jedoch die Proteinbiosynthese der Moleküle für die Antigen-Prozessierung und Antigenpeptid-Präsentation gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen nicht durch trp-Depletion beeinflusst wird. Demnach könnte die verminderte stimulatorische Kapazität der DCs<sup>-trp</sup> gegenüber T-Zellen (siehe nachfolgendes Kapitel) auch zum Teil durch die verminderte Antigenaufnahme bedingt sein. Im folgenden Kapitel wird die Frage diskutiert, ob der gezeigte Phänotyp der DCs<sup>-trp</sup> (CD80<sub>low</sub> CD40<sub>low</sub>/ ILT3<sup>high</sup>) dazu beiträgt, Toleranz gegenüber T-Zellen zu etablieren. Um dies zu klären, wurde die stimulatorische Funktion der DCs<sup>-trp</sup> vs. DCs<sup>+trp</sup> *in vitro* mit Hilfe von Kokultorexperimenten in autologen- sowie

allogenen Ansätzen unter normalen Zellkulturbedingungen (30  $\mu$ M trp) überprüft und parallel ILT3 Blockierungsexperimente durchgeführt.

#### 4.7 Ist die stimulatorische Funktion der DCs<sup>-trp</sup> gegenüber T-Zellen eingeschränkt?

(f) Zahlreiche Arbeiten der letzten Jahre zeigen, dass der inhibitorische Rezeptor ILT3, dessen Bindungspartner noch unbekannt ist, maßgeblich an der Induktion der Antigen-toleranz beteiligt ist (Vlad et al., 2003; Penna et al., 2005). Bei der negativen Signalleitung von ILT3 handelt es sich um einen bidirektionalen Prozess, in dem ILT3 einerseits über seine intrazelluläre Region (*immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motifs*; ITIMS) APCs tolerogene Signale übermittelt und andererseits durch seine extrazelluläre Region die T-Zelle beeinflusst (Li et al., 1999; Chang et al., 2002; Tone et al., 2002; Ju et al., 2004; Suci-Foca & Cortesini, 2007). Die inhibierende Funktion von ILT3 basiert auf der Interaktion mit seinem Liganden vermutlich auf der CD4<sup>+</sup> T-Zelle, da keine Bindung zwischen der extrazellulären Region des ILT3 Rezeptors und CD8<sup>+</sup> T-Zellen im Gegensatz zu CD4<sup>+</sup> T-Zellen beobachtet werden konnte (Kim-Schulze et al., 2006). Dieser Befund wird durch eine Studie von Rutella und Mitarbeitern unterstützt, in der nachgewiesen wurde, dass die Proliferationsinhibition von T-Zellen durch ILT3 und ILT4 kontaktabhängig erfolgt (Rutella et al., 2006). Wie nach den Ergebnissen des immunologischen Profils der DCs<sup>-trp</sup> erwartet, konnte in einem antigen-spezifischen System mit Tetanus Toxoid (TT) eine signifikant verminderte stimulatorische Kapazität gegenüber TT-stimulierten T-Zellen durch autologe ILT3<sup>high</sup> DCs<sup>-trp</sup> beobachtet werden. Eine Beteiligung vonIDO an der verminderten T-Zellantwort konnte ausgeschlossen werden, da in reifen DCs<sup>-trp</sup> und DCs<sup>+trp</sup> kein Unterschied in der IDO Expression sowie in der Funktionalität des IDO Proteins nach TLR3 Stimulation nachgewiesen werden konnte.

Durch den neutralisierenden mAk anti-ILT3 konnte der beobachtete Effekt, geringere T-Zellantworten zu induzieren, partiell aufgehoben werden. Von Chang und Mitarbeitern wurde gezeigt, dass ILT3 und ILT4 die Expression der kostimulatorischen Moleküle inhibieren, woraufhin die APC durch fehlende Kostimulation in der Lage ist, T-Zellenergie zu induzieren und somit Toleranz gegenüber CD4<sup>+</sup> T-Zellen zu etablieren. Es wurde ebenfalls gezeigt, dass die Abstoßung eines Transplantats *in vivo* mit der fehlenden Hochregulierung von ILT3 und ILT4 in allogenen DCs einhergeht (Chang et al., 2002). Die Angaben der Literatur und die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit führen zur Hypothese, dass es sich nicht ausschließlich um eine verminderte stimulatorische Kapazität der DCs<sup>-trp</sup> gegenüber autologen T-Zellen handelt, sondern um eine Proliferationsinhibition, bei der ILT3 eine bedeutende Rolle zukommt. So konnte gezeigt werden, dass regulatorische CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T-Zellen auf Monozyten und DCs eine Hochregulierung der inhibitorischen Rezeptoren ILT3 und ILT4 induzieren, woraufhin diese APCs eine niedrige Expression kostimulatorischer Moleküle aufweisen (Chang et al., 2002).

Anhand der Kokultorexperimente konnte ferner belegt werden, dass die tolerogenen DCs<sup>-trp</sup>, funktionell relativ stabil waren. Es zeigte sich, dass die Inhibition der TT-

spezifischen T-Zellantwort nicht kompensiert werden konnte, wenn die DCs<sup>-trp</sup> während der Reifung und Antigenaufnahme 30  $\mu$ M trp erhielten. Dies bestätigt die Beobachtung, dass durch die exogene Zugabe von trp an d3 die erhöhte ILT3 Expression in DCs<sup>-trp</sup> nicht aufgehoben werden konnte. Diese Ergebnisse führen zu der Annahme dass DCs<sup>-trp</sup> einen stabilen tolerogenen Phänotyp aufweisen, der während der Kokultivierung mit T-Zellen unter Anwesenheit von trp erhalten bleibt. Vermutlich spielt die eingeschränkte Antigenaufnahme der DCs<sup>-trp</sup>, zusammen mit anderen Faktoren, eine wichtige Rolle bei der verminderten Fähigkeit, T-Zellen zu stimulieren, da der inhibitorische Effekt von ILT3 durch einen neutralisierenden mAk nicht vollständig aufgehoben werden konnte. In mDCs<sup>+trp</sup> konnte eine signifikant geringere TT-spezifische T-Zellproliferation beobachtet werden, wenn die Antigenaufnahme und die Reifung unter trp-Mangel erfolgten. Demnach scheint es funktionell für die DCs wichtig zu sein, dass trp auch während der Reifung und der Antigenaufnahme vorhanden ist. Aus Gründen der Übersichtlichkeit werden die CD4<sup>+</sup> T-Zellen nach 7-tägiger Antigenstimulation durch DCs<sup>-trp</sup> bzw. DCs<sup>+trp</sup> im Weiteren als T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> bzw. T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup> bezeichnet.

#### 4.8 Führt die Stimulation von CD4<sup>+</sup> T-Zellen mit Antigen durch ILT3<sup>high</sup> DCs<sup>-trp</sup> zur Generierung von T-Zellen mit regulatorischer Funktion?

(g) Ein weiterer Aspekt dieser Arbeit war zu prüfen, ob CD80<sub>low</sub> CD40<sub>low</sub>/ ILT3<sup>high</sup> DCs<sup>-trp</sup> die Entstehung funktioneller Tregs begünstigt, da neuere Studien belegen konnten, dass tolerogene ILT3<sup>+</sup> DCs den Treg-Marker Foxp3 (*forkhead boxP3*) in CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzieren können (Penna et al., 2005; Rutella et al., 2006). Zahlreiche Veröffentlichungen beweisen, dass der IDO Mechanismus zusätzlich zur direkten Inhibition von T-Zellantworten die suppressive Funktion von Tregs und DCs kombiniert und somit zur Toleranzinduktion beiträgt (Belladonna et al., 2006; Fallarino et al., 2006a; Fallarino et al., 2006b; Curti et al., 2007; Grohmann et al., 2007; Hill et al., 2007). CD4<sup>+</sup> Tregs werden aufgrund ihres Entstehungsortes in natürliche Tregs (nTregs), die als eigene Linie während der T-Zell-Differenzierung im Thymus entstehen, und *de novo* induzierte Tregs (iTregs) unterschieden, die sich aus peripheren CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> Foxp3<sup>-</sup> T-Zellen entwickeln (Sakaguchi, 2005; Vukmanovic-Stejic et al., 2006; Akbar et al., 2007). Von Fallarino und Mitarbeitern konnte die *de novo* Induktion von CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> iTregs nachgewiesen werden, wenn CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen mit IDO<sup>+</sup> DCs kokultiviert wurden. Ebenfalls wurde die Induktion von CD4<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> iTregs durch die Kombination mit IDO<sup>-</sup> DCs, trp-Mangel (5  $\mu$ M trp) und trp-Metaboliten (10 $\mu$ M) erzielt. Anhand von GCN2 defizienten Mäusen wurde gezeigt, dass die Induktion von Foxp3 in der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellausgangspopulation GCN2 abhängig erfolgt (Fallarino et al., 2006a). Wie bereits in der Literatur belegt werden konnte, bestätigt die vorliegende Studie eine wichtige Rolle des inhibitorischen Rezeptors ILT3 bei der Induktion von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> T-Zellen mit regulatorischer Funktion. Im Rahmen dieser Arbeit konnte im autologen System gezeigt werden, dass ILT3<sup>high</sup> DCs<sup>-trp</sup> verglichen mit DCs<sup>+trp</sup> sowohl verstärkt als auch ILT3 abhängig die Expression von Foxp3 in antigen-stimulierten CD4<sup>+</sup> T-Zellen induzieren (CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> = 20,4%; CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup> T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup> = 9,4%). Während bei autologen T-Zellen eine Proliferationsinhibition

durch DCs<sup>-trp</sup> gezeigt werden konnte, führten allogene DCs<sup>-trp</sup> zu keiner signifikanten Inhibition der T-Zellstimulation nach 7 Tagen. Dies könnte dadurch begründet sein, dass Tregs erst nach mehrfachen allogenen Stimulationsdurchläufen mit ILT3<sup>+</sup> APCs induziert werden (Jiang et al., 1998; Chang et al., 2002).

Ob der Erhalt von Tregs durch klonale Expansion schon vorhandener nTregs erfolgt, oder ob Tregs *de novo* aus der CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellpopulation induziert werden oder beides wird derzeit in der Literatur diskutiert (Seddon & Mason, 2000; Vukmanovic-Stejic et al., 2006; Akbar et al., 2007). Sowohl *in vivo* als auch *in vitro* konnte gezeigt werden, dass eine Expansion von CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs trotz anergen Phänotyps möglich ist. Diese Proliferation ist jedoch von der Anwesenheit von Zytokinen wie IL-2 abhängig, welche nicht von den Tregs selbst produziert werden können (Yamazaki et al., 2003; Walker et al., 2003b; Kretschmer et al., 2005). Zahlreiche Arbeiten belegen eine *de novo* Induktion von Tregs in der Peripherie nach Antigenpräsentation ohne adäquate Kostimulation durch tolerogene DCs (Dieckmann et al., 2002; Manavalan et al., 2003; Akbar et al., 2003; Kretschmer et al., 2005). Ferner konnte gezeigt werden, dass die Proliferation dieser iTregs durch geringe Antigen-Konzentrationen und fehlende Kostimulation deutlich gefördert (10-fach) wird (Kretschmer et al., 2005). Daher könnten die DCs<sup>-trp</sup> durch die verminderte Pinozytoseaktivität (10-fach), die geringere Expression von FcγRII sowie der tolerogene Phänotyp (CD80<sub>low</sub> CD40<sub>low</sub>/ ILT3<sup>high</sup>), die *de novo* Induktion von Tregs begünstigen. Jedoch kann keine eindeutige Aussage über eine *de novo* Induktion regulatorischer T-Zellen getroffen werden, da in dem verwendeten TT-spezifischen System die bereits vorhandenen nTregs nicht aus der CD4<sup>+</sup> T-Zell-Ausgangspopulation ausgeschlossen wurden. Daher besteht die Möglichkeit, dass es sich bei den Foxp3<sup>+</sup> exprimierenden CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>DCs</sub><sup>-trp</sup> und T<sub>DCs</sub><sup>+trp</sup> auch um expandierte nTregs oder/ und um iTregs handelt. Nach derzeitigen Kenntnissen sind iTregs und nTregs immunphänotypisch als auch funktionell kaum zu unterscheiden. Aufgrund der Ähnlichkeit dieser beiden Treg-Populationen ergeben sich zwei derzeit noch unkläre Fragen. Zum einen wird in der Literatur diskutiert, ob nTregs und iTregs identisch sind (Vukmanovic-Stejic et al., 2006; Hsieh et al., 2006; Akbar et al., 2007) und zum anderen, ob es sich bei den unterschiedlichen iTregs Subpopulationen (CD4<sup>+</sup> T<sub>H</sub>3-Zellen, CD4<sup>+</sup> Tr1 und CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> iTregs) um eine einzige Treg-Population handelt. Hinweise gegen eine strikte Trennung in nTregs und iTregs zeigen Untersuchungen, in denen ein ähnliches TCR-Repertoire beider Populationen nachgewiesen werden konnte (Hsieh et al., 2006). Sowohl nTregs als auch iTregs exprimieren neben der α-Kette des IL-2 Rezeptors CD25 und dem Treg-Marker Foxp3 die gleichen Oberflächenmoleküle, wie z.B. CTLA-4, GITR, CD45RB (Shimizu et al., 2002; McHugh et al., 2002; Akbar et al., 2007).

Funktionell wird beiden CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Treg-Populationen neben der bedeutenden Rolle zum Erhalt von Selbst-Toleranz eine wichtige immunmodulatorische Funktion gegenüber Fremdantigenen zugeschrieben (Sakaguchi, 2005; Schwartz, 2005; Beissert et al., 2006; Akbar et al., 2007). In zahlreichen Studien wurde die Regression spontaner oder auch induzierter Immunkrankheiten (wie z.B. Autoimmunerkrankungen) durch den Transfer von nTregs belegt (Sakaguchi et al., 1995; Itoh et al., 1999; Shevach, 2000). Anhand eines



transgenen Mausmodells wurde gezeigt, dass iTregs für die Prävention von EAE (*experimental allergic encephalomyelitis*) verantwortlich sind (Chen et al., 1994; Sakurai et al., 2002). iTregs sind an der Toleranz gegenüber Allergenen, die über die Mukosa des Darms oder über der Lunge aufgenommen werden, zentral beteiligt (Akbari et al., 2001). Im Kontext der Transplantationsabstoßung rücken Tregs, die alloreaktive T-Zellen des Empfängers inhibieren und dadurch die Transplantatverträglichkeit verbessern, ebenfalls zunehmend in den Vordergrund (Chang et al., 2002; Suci-Foca & Cortesini, 2007). Um die Funktionalität der Foxp3 exprimierenden  $CD4^+ CD25^+ T_{DCs}^{-trp}$  und  $T_{DCs}^{+trp}$  nachzuweisen wurde ihre Fähigkeit getestet, T-Zellantworten zu supprimieren. Im Vergleich zu  $T_{DCs}^{+trp}$  wurde eine stärkere Inhibition der polyklonal- sowie antigen-stimulierten T-Zellantwort durch  $T_{DCs}^{-trp}$  nachgewiesen. Während die polyklonal-stimulierten T-Zellen in Anwesenheit von  $T_{DCs}^{+trp}$  nach 68 h - 92 h eine Zellteilung durchliefen, wurde diese deutlich durch  $T_{DCs}^{-trp}$  inhibiert. Ebenfalls zeigte sich eine stärkere Proliferationsinhibition der antigen-stimulierten T-Zellen durch  $T_{DCs}^{-trp}$  (ca. 90%) vs.  $T_{DCs}^{+trp}$  (ca. 60%). Es ist bekannt, dass die suppressive Wirkung von Tregs mit der T-Effektorzell-/Treg-Ratio korreliert (Walker et al., 2005). Daher liegt es nahe, dass der erhöhte prozentuale Anteil der Foxp3 exprimierenden Zellen innerhalb der  $CD4^+ CD25^+ T_{DCs}^{-trp}$  im Vergleich zu  $CD4^+ CD25^+ T_{DCs}^{+trp}$  für die verstärkte Proliferationsinhibition durch  $T_{DCs}^{-trp}$  verantwortlich sein könnte (Akbar et al., 2007; Suci-Foca & Cortesini, 2007).

Die hier gezeigten Ergebnisse der Inhibition polyklonaler T-Zellantworten der  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  T-Zellen sind konsistent mit den Angaben der Literatur, in denen die Antigen-spezifität von Tregs in Frage gestellt wird, da sie polyklonal-stimulierte T-Zellen über Zell-Zellkontakt inhibieren können (Walker et al., 2005; Akbar et al., 2007). Die in den letzten Jahren gewonnenen Ergebnisse weisen darauf hin, dass Tregs durchaus über beide Fähigkeiten verfügen und es nicht um sich gegenseitig ausschließende Mechanismen handeln muss. Ob  $T_{DCs}^{-trp}$  antigen-spezifische T-Zellantworten effizienter hemmen können als  $T_{DCs}^{+trp}$ , ist eine weitere interessante Fragestellung, die in weiterführenden Experimenten untersucht werden soll.

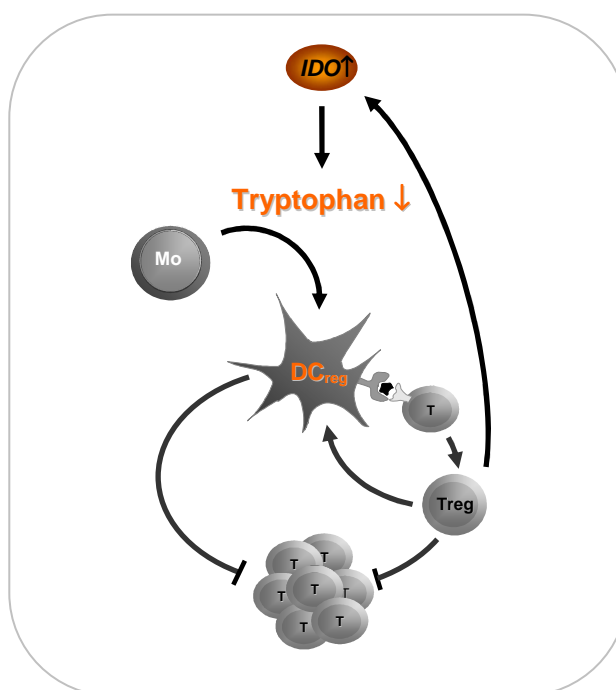
Eine maßgebliche Erkenntnis von Chang und Mitarbeitern war, dass die Induktion von tolerogenen  $ILT3^+$  APCs durch allogene  $CD8^+ CD28^- Foxp3^+$  iTregs mit der Abstoßung von Herztransplantaten korreliert (Chang et al., 2002).  $CD8^+ CD28^- Foxp3^+$  iTregs können *in vitro* durch wiederholte Alloantigenstimulation naiver  $CD8^+ CD28^-$  T-Zellen induziert werden (Suci-Foca & Cortesini, 2007). An Patienten konnte eine alloantigen-spezifische suppressive Funktion dieser Zellen gegenüber allogenen Transplantaten beobachtet werden (Manavalan et al., 2003; Manavalan et al., 2004). Des Weiteren können  $CD8^+ CD28^- Foxp3^+$  iTregs über einen Zell-Zellkontakt abhängigen, Zytokin-unabhängigen Mechanismus in DCs und Endothelzellen einen tolerogenen Phänotyp ( $ILT3^{high} ILT4^{high}$ ) induzieren (Chang et al., 2002; Manavalan et al., 2003; Manavalan et al., 2004). Diese tolerogenen APCs können wiederum aus alloreaktiven  $CD4^+ CD25^+$  T-Zellen  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  iTregs induzieren, die ebenfalls  $ILT3$  und  $ILT4$  in APCs hochregulieren (Manavalan et al., 2003). Obwohl eine multiple T-Zellstimulation durch allogene APCs sowohl zur Entstehung  $CD8^+ CD28^- Foxp3^+$  iTregs als auch zu  $CD4^+ CD25^+ Foxp3^+$  iTregs

führt, wird die Induktion letzterer nicht beobachtet, wenn zuvor die CD8<sup>+</sup> T-Zell-Population deletiert wurde. Dieser Befund spricht dafür, dass die Suppressorkaskade alloantigen-spezifischer CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> Foxp3<sup>+</sup> iTregs über die Induktion tolerogener APCs-vermittelt wird. Diese APCs mit erhöhter ILT3 und ILT4 Expression besitzen neben der Induktion regulatorischer T-Zellen zudem die Fähigkeit, alloreaktive CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Effektorzellen zu hemmen (Suciu-Foca & Cortesini, 2007). Insgesamt bildet diese Suppressorkaskade ein Netzwerk, in dem unterschiedliche Treg-Populationen zusammen mit tolerogenen APCs bidirektional interagieren, und schafft die Grundlage für einen effektiven inhibitorischen Rückkopplungsmechanismus der Toleranz. Ein trp-Mangel könnte in diesem Zusammenhang zur Induktion eines tolerogenen Phänotyps in APCs führen (CD80<sub>low</sub> CD40<sub>low</sub>/ ILT3<sup>high</sup>) und die Toleranzinduktion anstoßen. Eines der wichtigsten medizinischen Ziele der Transplantationsforschung sind, statt immunsuppressiver Medikamente, therapeutische Ansätze zu entwickeln, in denen Organe durch Vorbehandlung mit toleranzinduzierenden Substanzen eine Transplantatabstoßung verhindern (Chang et al., 2002). Der trp-Mangel könnte eine Therapiemöglichkeit darstellen.

#### 4.9 Schlussfolgerung

Unsere Arbeitshypothese besagt, dass dieIDO-vermittelte trp-Depletion zur Induktion von regulatorischen DC<sub>regs</sub> führt, die ihrerseits die Expansion und/oder die Induktion von Tregs fördern. Gestützt wird diese Hypothese durch das Ergebnis, dass durch trp-Mangel während der Differenzierung ein tolerogener Phänotyp (CD80<sub>low</sub> CD40<sub>low</sub>/ ILT3<sup>high</sup>) in DCs induziert wird. Diese tolerogenen DCs<sup>-trp</sup> (DC<sub>regs</sub>) zeichnen sich durch die Fähigkeit aus, über die verstärkte Expression des inhibitorischen Rezeptors ILT3, die Entstehung regulatorischer T-Zellen zu fördern. Diese Befunde bestätigen die Annahme, dass es sich bei der verminderten stimulatorischen Kapazität der DCs<sup>-trp</sup> nicht um einen passiven Effekt des 'Aushungerns' durch trp-Mangel handelt, sondern dass dies vielmehr für einen aktiven Suppressionsmechanismus in Folge einerIDO Aktivität spricht, bei dem ILT3 eine wichtige Bedeutung zukommt. Die verstärkte Induktion von CHOP während der Differenzierung der DCs unter trp-Mangel und die Angaben der Literatur führen zu der Hypothese einer bedeutenden Rolle des GCN2 Signalwegs bei der Induktion von DC<sub>regs</sub>. Gemeinsam mit Tregs leisten DC<sub>regs</sub> einen wichtigen Beitrag in derIDO-vermittelten Toleranzinduktion. Jedoch erfordern anti-inflammatorische Mechanismen wie die Entwicklung regulatorischer DCs oder Tregs wiederum Gegenregulations-Mechanismen. So konnte in der vorliegenden Studie gezeigt werden, dass der trp-Mangel zur signifikant stärkeren CD95 (FAS) Expression auf tolerogenen mDCs<sup>-trp</sup> verglichen mit mDCs<sup>+trp</sup> führt, welches die Wahrscheinlichkeit einer CD95/CD95L-vermittelten Apoptose von DCs<sup>-trp</sup> erhöht. Dies spricht für einen Mechanismus zur negativen Regulation der DC<sub>regs</sub>. Vermutlich könnte eine schnelle Depletion dieser DC<sub>reg</sub> im Immunsystem eine essentielle Notwendigkeit darstellen, um später erforderliche Immunreaktionen zu ermöglichen bzw. nicht zu hemmen. Insgesamt legen die gewonnenen *in vitro* Ergebnisse nahe, dass die Bildung regulatorischer DCs und die verstärkte Induktion bzw. Expansion von Tregs durch

ein trp-verarmtes Mikromilieu im Gewebe, einen bedeutenden Mechanismus (Rückkopplungsmechanismus) darstellen könnte, in demIDO zur Induktion und Aufrechterhaltung von Toleranz beiträgt. Darüber hinaus sind Tregs wiederum in der LageIDO in APCs zu induzieren. Diese Suppressorkaskade könnte ein Netzwerk bilden, in dem Tregs zusammen mit DC<sub>regs</sub> interagieren und somit eine Grundlage für einen effektiven inhibitorischen Rückkopplungsmechanismus der Toleranz schaffen, um T-Zellantworten zu kontrollieren. Dieser Rückkopplungsmechanismus könnte somit beispielsweise *in vivo* das Ausbreiten einer Entzündung begrenzen und Folgeschäden im Gewebe reduzieren. Dieser Toleranzmechanismus hat vermutlich einen entscheidenden Einfluss auf Verlauf und Ausgang der Immunantwort. Die genaue Kenntnis der Mechanismen, die für die *in vitro* Induktion regulatorischer DCs verantwortlich sind, könnte eine Basis für therapeutische Ansätze darstellen.



**Abb. 25: Potentieller Mechanismus zur Regulation des Immunsystems durch trp-Depletion und die Rolle der dendritischen Zellen:** Ein trp-verarmtes Mikromilieu in Folge hoher IDO Aktivität im Gewebe begünstigt die Bildung regulatorischer (tolerogener) DC<sub>regs</sub>, die zur verstärkten Generierung von Tregs führt. Tregs sind wiederum in der Lage IDO in APCs zu induzieren. Die Interaktion zwischen DC<sub>regs</sub> und Tregs ist daher für die Amplifikation inhibitorischer Signale während der Toleranzinduktion verantwortlich, was letztendlich zu Inhibition der T-Zellproliferation führt. IDO könnte somit durch diesen Rückkopplungsmechanismus beispielsweise *in vivo* das Ausbreiten einer Entzündung begrenzen und Folgeschäden im Gewebe reduzieren.



## 5 LITERATUR

- Adams, A.B., Shirasugi, N., Jones, T.R., Williams, M.A., Durham, M.M., Ha, J., Dong, Y., Guo, Z., Newell, K.A., Pearson, T.C. *et al.* 2003. Conventional immunosuppression is compatible with costimulation blockade-based, mixed chimerism tolerance induction. *Am. J. Transplant.* **3**:895-901.
- Adams, T.E., Bodmer, J.G., and Bodmer, W.F. 1983. Production and characterization of monoclonal antibodies recognizing the alpha-chain subunits of human Ia alloantigens. *Immunology.* **50**:613-624.
- Adler, H.S. and Steinbrink, K. 2007. Tolerogenic dendritic cells in health and disease: friend and foe! *Eur. J. Dermatol.* **17**:476-491.
- Agagué, S., Perrin-Cocon, L., Coutant, F., Andre, P., and Lotteau, V. 2006. 1-Methyl-tryptophan can interfere with TLR signaling in dendritic cells independently of IDO activity. *J. Immunol.* **177**:2061-2071.
- Agnello, D., Lankford, C.S., Bream, J., Morinobu, A., Gadina, M., O'Shea, J.J., and Frucht, D.M. 2003. Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J. Clin. Immunol.* **23**:147-161.
- Akagawa, K.S., Takasuka, N., Nozaki, Y., Komuro, I., Azuma, M., Ueda, M., Naito, M., and Takahashi, K. 1996. Generation of CD1+RelB+ dendritic cells and tartrate-resistant acid phosphatase-positive osteoclast-like multinucleated giant cells from human monocytes. *Blood.* **88**:4029-4039.
- Akbar, A.N., Taams, L.S., Salmon, M., and Vukmanovic-Stejic, M. 2003. The peripheral generation of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *Immunology.* **109**:319-325.
- Akbar, A.N., Vukmanovic-Stejic, M., Taams, L.S., and Macallan, D.C. 2007. The dynamic co-evolution of memory and regulatory CD4+ T cells in the periphery. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:231-237.
- Akbari, O., DeKruyff, R.H., and Umetsu, D.T. 2001. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat. Immunol.* **2**:725-731.
- Akbari, O. and Umetsu, D.T. 2004. Role of regulatory dendritic cells in allergy and asthma. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **4**:533-538.
- Akdis, C.A., Joss, A., Akdis, M., and Blaser, K. 2001. Mechanism of IL-10-induced T cell inactivation in allergic inflammation and normal response to allergens. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **124**:180-182.
- Al-Alwan, M.M., Liwski, R.S., Haeryfar, S.M., Baldrige, W.H., Hoskin, D.W., Rowden, G., and West, K.A. 2003. Cutting edge: dendritic cell actin cytoskeletal polarization during immunological synapse formation is highly antigen-dependent. *J. Immunol.* **171**:4479-4483.
- Albert, M.L., Pearce, S.F., Francisco, L.M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R.L., and Bhardwaj, N. 1998. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha5beta1 and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **188**:1359-1368.
- Alderson, M.R., Tough, T.W., vis-Smith, T., Braddy, S., Falk, B., Schooley, K.A., Goodwin, R.G., Smith, C.A., Ramsdell, F., and Lynch, D.H. 1995. Fas ligand mediates activation-induced cell death in human T lymphocytes. *J. Exp. Med.* **181**:71-77.
- Alegre, M.L., Frauwirth, K.A., and Thompson, C.B. 2001. T-cell regulation by CD28 and CTLA-4. *Nat. Rev. Immunol.* **1**:220-228.

- Alexopoulou, L., Holt, A.C., Medzhitov, R., and Flavell, R.A. 2001. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature*. **413**:732-738.
- Aliprantis, A.O., Yang, R.B., Mark, M.R., Suggett, S., Devaux, B., Radolf, J.D., Klimpel, G.R., Godowski, P., and Zychlinsky, A. 1999. Cell activation and apoptosis by bacterial lipoproteins through toll-like receptor-2. *Science*. **285**:736-739.
- Almeida, A.R., Legrand, N., Papiernik, M., and Freitas, A.A. 2002. Homeostasis of peripheral CD4+ T cells: IL-2R alpha and IL-2 shape a population of regulatory cells that controls CD4+ T cell numbers. *J. Immunol.* **169**:4850-4860.
- Amsen, D. and Kruisbeek, A.M. 1998. Thymocyte selection: not by TCR alone. *Immunol. Rev.* **165**:209-229.
- Anderson, C.L. 1989. Human IgG Fc receptors. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **53**:63-71.
- Appleman, L.J., van Puijenbroek, A.A., Shu, K.M., Nadler, L.M., and Boussiotis, V.A. 2002. CD28 costimulation mediates down-regulation of p27kip1 and cell cycle progression by activation of the PI3K/PKB signaling pathway in primary human T cells. *J. Immunol.* **168**:2729-2736.
- Ardavin, C., Wu, L., Li, C.L., and Shortman, K. 1993. Thymic dendritic cells and T cells develop simultaneously in the thymus from a common precursor population. *Nature*. **362**:761-763.
- Ardeshtna, K.M., Pizzey, A.R., Devereux, S., and Khwaja, A. 2000. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. **96**:1039-1046.
- Assenmacher, M., Schmitz, J., and Radbruch, A. 1994. Flow cytometric determination of cytokines in activated murine T helper lymphocytes: expression of interleukin-10 in interferon-gamma and in interleukin-4-expressing cells. *Eur. J. Immunol.* **24**:1097-1101.
- Austyn, J.M. 1992. Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. *Semin. Immunol.* **4**:227-236.
- Bachmann, M.F. and Oxenius, A. 2007. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again. *EMBO Rep.* **8**:1142-1148.
- Bakke, O. and Nordeng, T.W. 1999. Intracellular traffic to compartments for MHC class II peptide loading: signals for endosomal and polarized sorting. *Immunol. Rev.* **172**:171-187.
- Ball, H.J., Sanchez-Perez, A., Weiser, S., Austin, C.J., Astelbauer, F., Miu, J., McQuillan, J.A., Stocker, R., Jermiin, L.S., and Hunt, N.H. 2007. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase-like protein found in humans and mice. *Gene*. **396**:203-213.
- Ball, H.J., Yuasa, H.J., Austin, C.J., Weiser, S., and Hunt, N.H. 2008. Indoleamine 2,3-dioxygenase-2; a new enzyme in the kynurenine pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol. Epub@2008 Jan 11*.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., and Palucka, K. 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:767-811.
- Banchereau, J. and Steinman, R.M. 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. **392**:245-252.
- Barral, D.C. and Brenner, M.B. 2007. CD1 antigen presentation: how it works. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:929-941.

- Battaglia, M. and Roncarolo, M.G. 2004. The role of cytokines (and not only) in inducing and expanding T regulatory type 1 cells. *Transplantation*. **77**:16-18.
- Bauer, T.M., Jiga, L.P., Chuang, J.J., Randazzo, M., Opelz, G., and Terness, P. 2005. Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo. *Transpl. Int.* **18**:95-100.
- Beatty, W.L., Belanger, T.A., Desai, A.A., Morrison, R.P., and Byrne, G.I. 1994. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect. Immun.* **62**:3705-3711.
- Beissert, S., Schwarz, A., and Schwarz, T. 2006. Regulatory T cells. *J. Invest Dermatol.* **126**:15-24.
- Belladonna, M.L., Grohmann, U., Guidetti, P., Volpi, C., Bianchi, R., Fioretti, M.C., Schwarcz, R., Fallarino, F., and Puccetti, P. 2006. Kynurenine pathway enzymes in dendritic cells initiate tolerogenesis in the absence of functional IDO. *J. Immunol.* **177**:130-137.
- Bellón, T., Kitzig, F., Sayos, J., and Lopez-Botet, M. 2002. Mutational analysis of immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs of the Ig-like transcript 2 (CD85j) leukocyte receptor. *J. Immunol.* **168**:3351-3359.
- Belz, G.T., Behrens, G.M., Smith, C.M., Miller, J.F., Jones, C., Lejon, K., Fathman, C.G., Mueller, S.N., Shortman, K., Carbone, F.R. *et al.* 2002. The CD8alpha(+) dendritic cell is responsible for inducing peripheral self-tolerance to tissue-associated antigens. *J. Exp. Med.* **196**:1099-1104.
- Bensinger, S.J., Bandeira, A., Jordan, M.S., Caton, A.J., and Laufer, T.M. 2001. Major histocompatibility complex class II-positive cortical epithelium mediates the selection of CD4(+)25(+) immunoregulatory T cells. *J. Exp. Med.* **194**:427-438.
- Bevan, M.J. 2007. Immunology. The cutting edge of T cell selection. *Science*. **316**:1291-1292.
- Boise, L.H., Minn, A.J., Noel, P.J., June, C.H., Accavitti, M.A., Lindsten, T., and Thompson, C.B. 1995. CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL. *Immunity*. **3**:87-98.
- Borish, L.C. and Steinke, J.W. 2003. 2. Cytokines and chemokines. *J. Allergy Clin. Immunol.* **111**:460-475.
- Botturi, K., Lacoeyille, Y., Thomas, P., Boniface, S., Reynaud-Gaubert, M., and Magnan, A. 2008. CTLA-4-mediated regulatory phenotype of T cells in tolerant lung recipients. *Eur. Respir. J.* **Epub@2008 Feb 6**.
- Boyum, A. 1984. Separation of lymphocytes, granulocytes, and monocytes from human blood using iodinated density gradient media. *Methods Enzymol.* **108:88-102**:88-102.
- Branchey, L., Weinberg, U., Branchey, M., Linkowski, P., and Mendlewicz, J. 1982. Simultaneous study of 24-hour patterns of melatonin and cortisol secretion in depressed patients. *Neuropsychobiology*. **8**:225-232.
- Breckenridge, D.G., Germain, M., Mathai, J.P., Nguyen, M., and Shore, G.C. 2003. Regulation of apoptosis by endoplasmic reticulum pathways. *Oncogene*. **22**:8608-8618.
- Brichard, V., van Pel, A., Wolfel, T., Wolfel, C., De, P.E., Lethe, B., Coulie, P., and Boon, T. 1993. The tyrosinase gene codes for an antigen recognized by autologous cytolytic T lymphocytes on HLA-A2 melanomas. *J. Exp. Med.* **178**:489-495.
- Brightbill, H.D., Libraty, D.H., Krutzik, S.R., Yang, R.B., Belisle, J.T., Bleharski, J.R., Maitland, M., Norgard, M.V., Plevy, S.E., Smale, S.T. *et al.* 1999. Host defense

- mechanisms triggered by microbial lipoproteins through toll-like receptors. *Science*. **285**:732-736.
- Buer, J., Lanoue, A., Franzke, A., Garcia, C., von Boehmer, H., and Sarukhan, A. 1998. Interleukin 10 secretion and impaired effector function of major histocompatibility complex class II-restricted T cells anergized in vivo. *J. Exp. Med.* **187**:177-183.
- Burgdorf, S., Kautz, A., Bohnert, V., Knolle, P.A., and Kurts, C. 2007. Distinct pathways of antigen uptake and intracellular routing in CD4 and CD8 T cell activation. *Science*. **316**:612-616.
- Burgdorf, S. and Kurts, C. 2008. Endocytosis mechanisms and the cell biology of antigen presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **20** (1):89-95. **Epub@2008 Jan 30**.
- Burns, S., Hardy, S.J., Buddle, J., Yong, K.L., Jones, G.E., and Thrasher, A.J. 2004. Maturation of DC is associated with changes in motile characteristics and adherence. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **57**:118-132.
- Burns, S. and Thrasher, A.J. 2004. Dendritic cells: the bare bones of immunity. *Curr. Biol.* **14**:965-967.
- Busch, R., Rinderknecht, C.H., Roh, S., Lee, A.W., Harding, J.J., Burster, T., Hornell, T.M., and Mellins, E.D. 2005. Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression. *Immunol. Rev.* **207**:242-260.
- Castagna, M., Shayakul, C., Trotti, D., Sacchi, V.F., Harvey, W.R., and Hediger, M.A. 1997. Molecular characteristics of mammalian and insect amino acid transporters: implications for amino acid homeostasis. *J. Exp. Biol.* **200**:269-286.
- Caux, C., Zutter-Dambuyant, C., Schmitt, D., and Banchereau, J. 1992. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature*. **360**:258-261.
- Cella, M., Dohring, C., Samaridis, J., Dessing, M., Brockhaus, M., Lanzavecchia, A., and Colonna, M. 1997. A novel inhibitory receptor (ILT3) expressed on monocytes, macrophages, and dendritic cells involved in antigen processing. *J. Exp. Med.* **185**:1743-1751.
- Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I., and Lanzavecchia, A. 1999. Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *J. Exp. Med.* **189**:821-829.
- Chai, J.G., Bartok, I., Chandler, P., Vendetti, S., Antoniou, A., Dyson, J., and Lechler, R. 1999. Anergic T cells act as suppressor cells in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.* **29**:686-692.
- Chambers, C.A. and Allison, J.P. 1999. Costimulatory regulation of T cell function. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:203-210.
- Chang, C.C., Ciubotariu, R., Manavalan, J.S., Yuan, J., Colovai, A.I., Piazza, F., Lederman, S., Colonna, M., Cortesini, R., Ia-Favera, R. *et al.* 2002. Tolerization of dendritic cells by T(S) cells: the crucial role of inhibitory receptors ILT3 and ILT4. *Nat. Immunol.* **3**:237-243.
- Chapuis, F., Rosenzweig, M., Yagello, M., Ekman, M., Biberfeld, P., and Gluckman, J.C. 1997. Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur. J. Immunol.* **27**:431-441.
- Chaves, A.C., Ceravolo, I.P., Gomes, J.A., Zani, C.L., Romanha, A.J., and Gazzinelli, R.T. 2001. IL-4 and IL-13 regulate the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase activity and the control of *Toxoplasma gondii* replication in human fibroblasts activated with IFN-gamma. *Eur. J. Immunol.* **31**:333-344.



- Chen, L. 2004. Co-inhibitory molecules of the B7-CD28 family in the control of T-cell immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:336-347.
- Chen, W., Zhou, D., Torrealba, J.R., Waddell, T.K., Grant, D., and Zhang, L. 2005. Donor lymphocyte infusion induces long-term donor-specific cardiac xenograft survival through activation of recipient double-negative regulatory T cells. *J. Immunol.* **175**:3409-3416.
- Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A., and Weiner, H.L. 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* **265**:1237-1240.
- Clare-Salzler, M.J., Brooks, J., Chai, A., van Herle, K., and Anderson, C. 1992. Prevention of diabetes in nonobese diabetic mice by dendritic cell transfer. *J. Clin. Invest.* **90**:741-748.
- Conti, L., Cardone, M., Varano, B., Puddu, P., Belardelli, F., and Gessani, S. 2008. Role of the cytokine environment and cytokine receptor expression on the generation of functionally distinct dendritic cells from human monocytes. *Eur. J. Immunol.* **38**:750-762.
- Corrigan, A., O'Kennedy, R., and Smyth, H. 1979. Lymphocyte membrane alterations caused by nylon wool column separation. *J. Immunol. Methods.* **31**:177-182.
- Currier, A.R., Ziegler, M.H., Riley, M.M., Babcock, T.A., Telbis, V.P., and Carlin, J.M. 2000. Tumor necrosis factor-alpha and lipopolysaccharide enhance interferon-induced antichlamydial indoleamine dioxygenase activity independently. *J. Interferon Cytokine Res.* **20**:369-376.
- Curti, A., Pandolfi, S., Valzasina, B., Aluigi, M., Isidori, A., Ferri, E., Salvestrini, V., Bonanno, G., Rutella, S., Durelli, I. *et al.* 2007. Modulation of tryptophan catabolism by human leukemic cells results in the conversion of CD25<sup>-</sup> into CD25<sup>+</sup> T regulatory cells. *Blood.* **109**:2871-2877.
- Däubener, W. and MacKenzie, C.R. 1999. IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv. Exp. Med. Biol.* **467**:517-524.
- Däubener, W., Spors, B., Hucke, C., Adam, R., Stins, M., Kim, K.S., and Schroten, H. 2001. Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* **69**:6527-6531.
- Davidson, T.S., DiPaolo, R.J., Andersson, J., and Shevach, E.M. 2007. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3<sup>+</sup> T regulatory cells. *J. Immunol.* **178**:4022-4026.
- Davis, M.M. and Bjorkman, P.J. 1988. T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition. *Nature.* **334**:395-402.
- Depboylu, C., Reinhart, T.A., Takikawa, O., Imai, Y., Maeda, H., Mitsuya, H., Rausch, D., Eiden, L.E., and Weihe, E. 2004. Brain virus burden and indoleamine-2,3-dioxygenase expression during lentiviral infection of rhesus monkey are concomitantly lowered by 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine. *Eur. J. Neurosci.* **19**:2997-3005.
- DeSilva, D.R., Feeser, W.S., Tancula, E.J., and Scherle, P.A. 1996. Anergic T cells are defective in both jun NH2-terminal kinase and mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J. Exp. Med.* **183**:2017-2023.
- Dhein, J., Walczak, H., Baumler, C., Debatin, K.M., and Krammer, P.H. 1995. Autocrine T-cell suicide mediated by APO-1/(Fas/CD95). *Nature.* **373**:438-441.

- Dhodapkar, M.V., Steinman, R.M., Krasovsky, J., Munz, C., and Bhardwaj, N. 2001. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* **193**:233-238.
- Dieckmann, D., Bruett, C.H., Ploettner, H., Lutz, M.B., and Schuler, G. 2002. Human CD4(+)CD25(+) regulatory, contact-dependent T cells induce interleukin 10-producing, contact-independent type 1-like regulatory T cells [corrected]. *J. Exp. Med.* **196**:247-253.
- Dilioglou, S., Cruse, J.M., and Lewis, R.E. 2003a. Costimulatory function of umbilical cord blood CD14+ and CD34+ derived dendritic cells. *Exp. Mol. Pathol.* **75**:18-33.
- Dilioglou, S., Cruse, J.M., and Lewis, R.E. 2003b. Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. *Exp. Mol. Pathol.* **75**:217-227.
- Eisen, S.A., Wedner, H.J., and Parker, C.W. 1972. Isolation of pure human peripheral blood T-lymphocytes using nylon wool columns. *Immunol. Commun.* **1**:571-577.
- Epstein, M.M., Di, R.F., Jankovic, D., Sher, A., and Matzinger, P. 1995. Successful T cell priming in B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* **182**:915-922.
- Everson, M.P., Lemak, D.G., McGhee, J.R., and Beagley, K.W. 1997. FACS-sorted spleen and Peyer's patch dendritic cells induce different responses in Th0 clones. *Adv. Exp. Med. Biol.* **417**:357-362.
- Fafournoux, P., Bruhat, A., and Jousse, C. 2000. Amino acid regulation of gene expression. *Biochem. J.* **351**:1-12.
- Falb, D., Briner, T.J., Sunshine, G.H., Bourque, C.R., Luqman, M., Geffer, M.L., and Kamradt, T. 1996. Peripheral tolerance in T cell receptor-transgenic mice: evidence for T cell anergy. *Eur. J. Immunol.* **26**:130-135.
- Falcone, M. and Sarvetnick, N. 1999. Cytokines that regulate autoimmune responses. *Curr. Opin. Immunol.* **11**:670-676.
- Falcone, S., Cocucci, E., Podini, P., Kirchhausen, T., Clementi, E., and Meldolesi, J. 2006. Macropinocytosis: regulated coordination of endocytic and exocytic membrane traffic events. *J. Cell Sci.* **119**:4758-4769.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Hwang, K.W., Orabona, C., Vacca, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Fioretti, M.C., Alegre, M.L., and Puccetti, P. 2003. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**:1206-1212.
- Fallarino, F., Grohmann, U., Vacca, C., Bianchi, R., Orabona, C., Spreca, A., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. 2002a. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death. Differ.* **9**:1069-1077.
- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B.C., Cavener, D.R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Volpi, C. *et al.* 2006a. Tryptophan catabolism generates autoimmune-preventive regulatory T cells. *Transpl. Immunol.* **17**:58-60.
- Fallarino, F., Grohmann, U., You, S., McGrath, B.C., Cavener, D.R., Vacca, C., Orabona, C., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Volpi, C. *et al.* 2006b. The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells. *J. Immunol.* **176**:6752-6761.
- Fallarino, F., Asselin-Paturel, C., Vacca, C., Bianchi, R., Gizzi, S., Fioretti, M.C., Trinchieri, G., Grohmann, U., and Puccetti, P. 2004. Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J. Immunol.* **173**:3748-3754.
- Fallarino, F., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Marshall, B., Keskin, D.B., Mellor, A.L., Fioretti, M.C., Grohmann, U. *et al.* 2002b. Functional expression of

- indoleamine 2,3-dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells. *Int. Immunol.* **14**:65-68.
- Fearnley, D.B., McLellan, A.D., Mannering, S.I., Hock, B.D., and Hart, D.N. 1997. Isolation of human blood dendritic cells using the CMRF-44 monoclonal antibody: implications for studies on antigen-presenting cell function and immunotherapy. *Blood.* **89**:3708-3716.
- Ferber, I., Schonrich, G., Schenkel, J., Mellor, A.L., Hammerling, G.J., and Arnold, B. 1994. Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science.* **263**:674-676.
- Finger, E.B. and Bluestone, J.A. 2002. When ligand becomes receptor--tolerance via B7 signaling on DCs. *Nat. Immunol.* **3**:1056-1057.
- Fiorini, M., Vermi, W., Facchetti, F., Moratto, D., Alessandri, G., Notarangelo, L., Caruso, A., Grigolato, P., Ugazio, A.G., Notarangelo, L.D. *et al.* 2002. Defective migration of monocyte-derived dendritic cells in LAD-1 immunodeficiency. *J. Leukoc. Biol.* **72**:650-656.
- Flores-Romo, L. 2001. In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology.* **102**:255-262.
- Fontenot, J.D., Gavin, M.A., and Rudensky, A.Y. 2003. Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Nat. Immunol.* **4**:330-336.
- Förster, I. 1998. Controlling autoreactivity of CD4 T cells by local tolerance induction. *Dev. Immunol.* **6**:89-94.
- Fraser, J.D., Irving, B.A., Crabtree, G.R., and Weiss, A. 1991. Regulation of interleukin-2 gene enhancer activity by the T cell accessory molecule CD28. *Science.* **251**:313-316.
- Friedl, P., Brocker, E.B., and Zanker, K.S. 1998. Integrins, cell matrix interactions and cell migration strategies: fundamental differences in leukocytes and tumor cells. *Cell Adhes. Commun.* **6**:225-236.
- Frucht, D.M., Fukao, T., Bogdan, C., Schindler, H., O'Shea, J.J., and Koyasu, S. 2001. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* **22**:556-560.
- Frumento, G., Rotondo, R., Tonetti, M., Damonte, G., Benatti, U., and Ferrara, G.B. 2002. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Exp. Med.* **196**:459-468.
- Fu, S., Zhang, N., Yopp, A.C., Chen, D., Mao, M., Chen, D., Zhang, H., Ding, Y., and Bromberg, J.S. 2004. TGF-beta induces Foxp3 + T-regulatory cells from CD4 + CD25 - precursors. *Am. J. Transplant.* **4**:1614-1627.
- Fujigaki, S., Saito, K., Takemura, M., Maekawa, N., Yamada, Y., Wada, H., and Seishima, M. 2002. L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by Toxoplasma gondii infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infect. Immun.* **70**:779-786.
- Fujii, S., Liu, K., Smith, C., Bonito, A.J., and Steinman, R.M. 2004. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J. Exp. Med.* **199**:1607-1618.
- Galibert, L., Maliszewski, C.R., and Vandenabeele, S. 2001. Plasmacytoid monocytes/T cells: a dendritic cell lineage? *Semin. Immunol.* **13**:283-289.
- Gallucci, S., Lolkema, M., and Matzinger, P. 1999. Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat. Med.* **5**:1249-1255.

- Galy, A., Travis, M., Cen, D., and Chen, B. 1995. Human T, B, natural killer, and dendritic cells arise from a common bone marrow progenitor cell subset. *Immunity*. **3**:459-473.
- Geenen, V., Kecha, O., Brilot, F., Hansenne, I., Renard, C., and Martens, H. 2001. Thymic T-cell tolerance of neuroendocrine functions: physiology and pathophysiology. *Cell Mol. Biol. (Noisy. -le-grand)*. **47**:179-188.
- Gilliet, M. and Liu, Y.J. 2002. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* **195**:695-704.
- Gimmi, C.D., Freeman, G.J., Gribben, J.G., Gray, G., and Nadler, L.M. 1993. Human T-cell clonal anergy is induced by antigen presentation in the absence of B7 costimulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:6586-6590.
- Gonzalo, J.A., Delaney, T., Corcoran, J., Goodearl, A., Gutierrez-Ramos, J.C., and Coyle, A.J. 2001. Cutting edge: the related molecules CD28 and inducible costimulator deliver both unique and complementary signals required for optimal T cell activation. *J. Immunol.* **166**:1-5.
- Gotoh, T., Oyadomari, S., Mori, K., and Mori, M. 2002. Nitric oxide-induced apoptosis in RAW 264.7 macrophages is mediated by endoplasmic reticulum stress pathway involving ATF6 and CHOP. *J. Biol. Chem.* **277**:12343-12350.
- Greenwald, R.J., Boussiotis, V.A., Lorschach, R.B., Abbas, A.K., and Sharpe, A.H. 2001. CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo. *Immunity*. **14**:145-155.
- Gregg, R., Smith, C.M., Clark, F.J., Dunnion, D., Khan, N., Chakraverty, R., Nayak, L., and Moss, P.A. 2005. The number of human peripheral blood CD4+ CD25high regulatory T cells increases with age. *Clin. Exp. Immunol.* **140**:540-546.
- Griffith, T.S., Brunner, T., Fletcher, S.M., Green, D.R., and Ferguson, T.A. 1995. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*. **270**:1189-1192.
- Grohmann, U., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Orabona, C., Ayroldi, E., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. 1998. IL-12 acts directly on DC to promote nuclear localization of NF-kappaB and primes DC for IL-12 production. *Immunity*. **9**:315-323.
- Grohmann, U., Bianchi, R., Belladonna, M.L., Silla, S., Fallarino, F., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. 2000. IFN-gamma inhibits presentation of a tumor/self peptide by CD8 alpha- dendritic cells via potentiation of the CD8 alpha+ subset. *J. Immunol.* **165**:1357-1363.
- Grohmann, U., Fallarino, F., Bianchi, R., Orabona, C., Vacca, C., Fioretti, M.C., and Puccetti, P. 2003. A defect in tryptophan catabolism impairs tolerance in nonobese diabetic mice. *J. Exp. Med.* **198**:153-160.
- Grohmann, U., Orabona, C., Fallarino, F., Vacca, C., Calcinaro, F., Falorni, A., Candeloro, P., Belladonna, M.L., Bianchi, R., Fioretti, M.C. *et al.* 2002. CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo. *Nat. Immunol.* **3**:1097-1101.
- Grohmann, U., Volpi, C., Fallarino, F., Bozza, S., Bianchi, R., Vacca, C., Orabona, C., Belladonna, M.L., Ayroldi, E., Nocentini, G. *et al.* 2007. Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy. *Nat. Med.* **13**:579-586.
- Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. 2002. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:621-677.
- Guery, J.C., Ria, F., and Adorini, L. 1996. Dendritic cells but not B cells present antigenic complexes to class II-restricted T cells after administration of protein in adjuvant. *J. Exp. Med.* **183**:751-757.

- Gunn, M.D. 2003. Chemokine mediated control of dendritic cell migration and function. *Semin. Immunol.* **15**:271-276.
- Guo, M. and Hay, B.A. 1999. Cell proliferation and apoptosis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **11**:745-752.
- Harding, H.P., Novoa, I., Zhang, Y., Zeng, H., Wek, R., Schapira, M., and Ron, D. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell.* **6**:1099-1108.
- Harding, H.P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P.D., Calfon, M., Sadri, N., Yun, C., Popko, B., Paules, R. *et al.* 2003. An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress. *Mol. Cell.* **11**:619-633.
- Harris, J.P. and Ryan, A.F. 1995. Fundamental immune mechanisms of the brain and inner ear. *Otolaryngol. Head Neck Surg.* **112**:639-653.
- Hayashi, T., Beck, L., Rossetto, C., Gong, X., Takikawa, O., Takabayashi, K., Broide, D.H., Carson, D.A., and Raz, E. 2004. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* **114**:270-279.
- Hengartner, M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* **407**:770-776.
- Heyes, M.P., Achim, C.L., Wiley, C.A., Major, E.O., Saito, K., and Markey, S.P. 1996. Human microglia convert l-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid. *Biochem. J.* **320**:595-597.
- Heyes, M.P., Brew, B.J., Saito, K., Quearry, B.J., Price, R.W., Lee, K., Bhalla, R.B., Der, M., and Markey, S.P. 1992. Inter-relationships between quinolinic acid, neuroactive kynurenines, neopterin and beta 2-microglobulin in cerebrospinal fluid and serum of HIV-1-infected patients. *J. Neuroimmunol.* **40**:71-80.
- Heyes, M.P., Ellis, R.J., Ryan, L., Childers, M.E., Grant, I., Wolfson, T., Archibald, S., and Jernigan, T.L. 2001. Elevated cerebrospinal fluid quinolinic acid levels are associated with region-specific cerebral volume loss in HIV infection. *Brain.* **124**:1033-1042.
- Heyes, M.P., Saito, K., Lackner, A., Wiley, C.A., Achim, C.L., and Markey, S.P. 1998. Sources of the neurotoxin quinolinic acid in the brain of HIV-1-infected patients and retrovirus-infected macaques. *FASEB J.* **12**:881-896.
- Higuchi, K., Kuno, S. and Hayaishi, O. 1963. Enzymatic formation of D-kynurenine. *Federation Proc.* **22**:243.
- Hill, M., Tanguy-Royer, S., Royer, P., Chauveau, C., Asghar, K., Tesson, L., Lavainne, F., Remy, S., Brion, R., Hubert, F.X. *et al.* 2007. IDO expands human CD4+CD25high regulatory T cells by promoting maturation of LPS-treated dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **37**:3054-3062.
- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. 2003. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science.* **299**:1057-1061.
- Hsieh, C.S., Zheng, Y., Liang, Y., Fontenot, J.D., and Rudensky, A.Y. 2006. An intersection between the self-reactive regulatory and nonregulatory T cell receptor repertoires. *Nat. Immunol.* **7**:401-410.
- Hunger, R.E., Sieling, P.A., Ochoa, M.T., Sugaya, M., Burdick, A.E., Rea, T.H., Brennan, P.J., Belisle, J.T., Blauvelt, A., Porcelli, S.A. *et al.* 2004. Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J. Clin. Invest.* **113**:701-708.
- Hwu, P., Du, M.X., Lapointe, R., Do, M., Taylor, M.W., and Young, H.A. 2000. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J. Immunol.* **164**:3596-3599.

- Inaba, K., Inaba, M., Deguchi, M., Hagi, K., Yasumizu, R., Ikehara, S., Muramatsu, S., and Steinman, R.M. 1993. Granulocytes, macrophages, and dendritic cells arise from a common major histocompatibility complex class II-negative progenitor in mouse bone marrow. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **90**:3038-3042.
- Itoh, M., Takahashi, T., Sakaguchi, N., Kuniyasu, Y., Shimizu, J., Otsuka, F., and Sakaguchi, S. 1999. Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance. *J. Immunol.* **162**:5317-5326.
- Jäättelä, M. and Tschopp, J. 2003. Caspase-independent cell death in T lymphocytes. *Nat. Immunol.* **4**:416-423.
- Jameson, S.C. 2002. Maintaining the norm: T-cell homeostasis. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:547-556.
- Janeway, C.A.Jr. and Bottomly, K. 1994. Signals and signs for lymphocyte responses. *Cell.* **76**:275-285.
- Jenkins, M.K. and Schwartz, R.H. 1987. Antigen presentation by chemically modified splenocytes induces antigen-specific T cell unresponsiveness in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* **165**:302-319.
- Jiang, S., Tugulea, S., Pennesi, G., Liu, Z., Mulder, A., Lederman, S., Harris, P., Cortesini, R., and Suciuc-Foca, N. 1998. Induction of MHC-class I restricted human suppressor T cells by peptide priming in vitro. *Hum. Immunol.* **59**:690-699.
- Jiang, W., Swiggard, W.J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R.M., and Nussenzweig, M.C. 1995. The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature.* **375**:151-155.
- Johnson, J.G. and Jenkins, M.K. 1994. The role of anergy in peripheral T cell unresponsiveness. *Life Sci.* **55**:1767-1780.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Kakirman, H., Stassen, M., Knop, J., and Enk, A.H. 2002. Infectious tolerance: human CD25(+) regulatory T cells convey suppressor activity to conventional CD4(+) T helper cells. *J. Exp. Med.* **196**:255-260.
- Jonuleit, H., Schmitt, E., Stassen, M., Tuettenberg, A., Knop, J., and Enk, A.H. 2001. Identification and functional characterization of human CD4(+)CD25(+) T cells with regulatory properties isolated from peripheral blood. *J. Exp. Med.* **193**:1285-1294.
- Ju, S.T., Panka, D.J., Cui, H., Ettinger, R., el-Khatib, M., Sherr, D.H., Stanger, B.Z., and Marshak-Rothstein, A. 1995. Fas(CD95)/FasL interactions required for programmed cell death after T-cell activation. *Nature.* **373**:444-448.
- Ju, X.S., Hacker, C., Scherer, B., Redecke, V., Berger, T., Schuler, G., Wagner, H., Lipford, G.B., and Zenke, M. 2004. Immunoglobulin-like transcripts ILT2, ILT3 and ILT7 are expressed by human dendritic cells and down-regulated following activation. *Gene* **331**:159-164.
- Jung, T., Schauer, U., Heusser, C., Neumann, C., and Rieger, C. 1993. Detection of intracellular cytokines by flow cytometry. *J. Immunol. Methods.* **159**:197-207.
- Kane, L.P., Andres, P.G., Howland, K.C., Abbas, A.K., and Weiss, A. 2001. Akt provides the CD28 costimulatory signal for up-regulation of IL-2 and IFN-gamma but not TH2 cytokines. *Nat. Immunol.* **2**:37-44.
- Katsnelson, A. 2006. Kicking off adaptive immunity: the discovery of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **203**:1622.
- Khanna, A., Morelli, A.E., Zhong, C., Takayama, T., Lu, L., and Thomson, A.W. 2000. Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo. *J. Immunol.* **164**:1346-1354.

- Khattri, R., Cox, T., Yasayko, S.A., and Ramsdell, F. 2003. An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells. *Nat. Immunol.* **4**:337-342.
- Kim, D.K., Kanai, Y., Chairoungdua, A., Matsuo, H., Cha, S.H., and Endou, H. 2001. Expression cloning of a Na<sup>+</sup>-independent aromatic amino acid transporter with structural similarity to H<sup>+</sup>/monocarboxylate transporters. *J. Biol. Chem.* **276**:17221-17228.
- Kim-Schulze, S., Scotto, L., Vlad, G., Piazza, F., Lin, H., Liu, Z., Cortesini, R., and Suciufoca, N. 2006. Recombinant Ig-like transcript 3-Fc modulates T cell responses via induction of Th anergy and differentiation of CD8+ T suppressor cells. *J. Immunol.* **176**:2790-2798.
- Kingsley, C.I., Karim, M., Bushell, A.R., and Wood, K.J. 2002. CD25+CD4+ regulatory T cells prevent graft rejection: CTLA-4- and IL-10-dependent immunoregulation of alloresponses. *J. Immunol.* **168**:1080-1086.
- Klein, L. and Kyewski, B. 2000. "Promiscuous" expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity? *J. Mol. Med.* **78**:483-494.
- Koch, S., Kohl, K., Klein, E., von Bubnoff, D., and Bieber, T. 2006. Skin homing of Langerhans cell precursors: adhesion, chemotaxis, and migration. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**:163-168.
- Kohl, K., Untersuchungen zur Ontogenese von Langerhans Zellen und zu ihrer Immigration in die humane Epidermis. 2007. [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online/math\\_nat\\_fak/2007/kohl\\_kristine/index.htm](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online/math_nat_fak/2007/kohl_kristine/index.htm)
- Kretschmer, K., Apostolou, I., Hawiger, D., Khazaie, K., Nussenzweig, M.C., and von Boehmer, H. 2005. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat. Immunol.* **6**:1219-1227.
- Kudo, Y. and Boyd, C.A. 2001. Characterisation of L-tryptophan transporters in human placenta: a comparison of brush border and basal membrane vesicles. *J. Physiol.* **531**:405-416.
- Kurts, C., Carbone, F.R., Barnden, M., Blanas, E., Allison, J., Heath, W.R., and Miller, J.F. 1997. CD4+ T cell help impairs CD8+ T cell deletion induced by cross-presentation of self-antigens and favors autoimmunity. *J. Exp. Med.* **186**:2057-2062.
- Kwidzinski, E., Bunse, J., Aktas, O., Richter, D., Mutlu, L., Zipp, F., Nitsch, R., and Bechmann, I. 2005. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and down-regulates autoimmune inflammation. *FASEB J.* **19**:1347-1349.
- Ladi, E., Yin, X., Chtanova, T., and Robey, E.A. 2006. Thymic microenvironments for T cell differentiation and selection. *Nat. Immunol.* **7**:338-343.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **227**:680-685.
- Lämmermann, T., Bader, B.L., Monkley, S.J., Worbs, T., Wedlich-Soldner, R., Hirsch, K., Keller, M., Forster, R., Critchley, D.R., Fassler, R. *et al.* 2008. Rapid leukocyte migration by integrin-independent flowing and squeezing. *Nature.* **453**:51-55.
- Lanzavecchia, A. 1996. Mechanisms of antigen uptake for presentation. *Curr. Opin. Immunol.* **8**:348-354.
- Lee, G.K., Park, H.J., Macleod, M., Chandler, P., Munn, D.H., and Mellor, A.L. 2002. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology.* **107**:452-460.
- Lehmann, J., Huehn, J., de la, R.M., Maszyzna, F., Kretschmer, U., Krenn, V., Brunner, M., Scheffold, A., and Hamann, A. 2002. Expression of the integrin alpha Ebeta 7 identifies

- unique subsets of CD25<sup>+</sup> as well as CD25<sup>-</sup> regulatory T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**:13031-13036.
- LeMaout, J., Zafaranloo, K., Le, D.C., and Carosella, E.D. 2005. HLA-G up-regulates ILT2, ILT3, ILT4, and KIR2DL4 in antigen presenting cells, NK cells, and T cells. *FASEB J.* **19**:662-664.
- Levings, M.K., Bacchetta, R., Schulz, U., and Roncarolo, M.G. 2002. The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **129**:263-276.
- Levings, M.K., Sangregorio, R., Galbiati, F., Squadrone, S., de Waal, M.R., and Roncarolo, M.G. 2001. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J. Immunol.* **166**:5530-5539.
- Li, J., Liu, Z., Jiang, S., Cortesini, R., Lederman, S., and Suci-Foca, N. 1999. T suppressor lymphocytes inhibit NF-kappa B-mediated transcription of CD86 gene in APC. *J. Immunol.* **163**:6386-6392.
- Li, W., Whaley, C.D., Mondino, A., and Mueller, D.L. 1996. Blocked signal transduction to the ERK and JNK protein kinases in anergic CD4<sup>+</sup> T cells. *Science.* **271**:1272-1276.
- Link, H. and Xiao, B.G. 2001. Rat models as tool to develop new immunotherapies. *Immunol. Rev.* **184**:117-128.
- Linsley, P.S., Brady, W., Grosmaire, L., Aruffo, A., Damle, N.K., and Ledbetter, J.A. 1991. Binding of the B cell activation antigen B7 to CD28 costimulates T cell proliferation and interleukin 2 mRNA accumulation. *J. Exp. Med.* **173**:721-730.
- Liu, K., Iyoda, T., Saternus, M., Kimura, Y., Inaba, K., and Steinman, R.M. 2002. Immune tolerance after delivery of dying cells to dendritic cells in situ. *J. Exp. Med.* **196**:1091-1097.
- Liu, Y. and Janeway, C.A.Jr. 1992. Cells that present both specific ligand and costimulatory activity are the most efficient inducers of clonal expansion of normal CD4 T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **89**:3845-3849.
- Liu, Y.J. 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell.* **106**:259-262.
- Lombardi, G., Sidhu, S., Batchelor, R., and Lechler, R. 1994. Anergic T cells as suppressor cells in vitro. *Science.* **264**:1587-1589.
- Lopez-Lastra, M., Rivas, A., and Barria, M.I. 2005. Protein synthesis in eukaryotes: the growing biological relevance of cap-independent translation initiation. *Biol. Res.* **38**:121-146.
- Lutz, M.B. and Schuler, G. 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* **23**:445-449.
- Mahnke, K., Qian, Y., Knop, J., and Enk, A.H. 2003. Induction of CD4<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup> regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood.* **101**:4862-4869.
- Malek, T.R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P., and Kong, L. 2002. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rbeta-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity.* **17**:167-178.
- Manavalan, J.S., Kim-Schulze, S., Scotto, L., Naiyer, A.J., Vlad, G., Colombo, P.C., Marboe, C., Mancini, D., Cortesini, R., and Suci-Foca, N. 2004. Alloantigen specific CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup>FOXP3<sup>+</sup> T suppressor cells induce ILT3<sup>+</sup>ILT4<sup>+</sup> tolerogenic endothelial cells, inhibiting alloreactivity. *Int. Immunol.* **16**:1055-1068.
- Manavalan, J.S., Rossi, P.C., Vlad, G., Piazza, F., Yamilina, A., Cortesini, R., Mancini, D., and Suci-Foca, N. 2003. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl. Immunol.* **11**:245-258.



- Maneglier, B., Rogez-Kreuz, C., Spreux-Varoquaux, O., Malleret, B., Therond, P., Samah, B., Drouet, I., Dormont, D., Advenier, C., and Clayette, P. 2007. Comparative effects of two type I interferons, human IFN- $\alpha$  and ovine IFN- $\tau$  on indoleamine-2,3-dioxygenase in primary cultures of human macrophages. *Fundam. Clin. Pharmacol.* **21**:29-34.
- Manlapat, A.K., Kahler, D.J., Chandler, P.R., Munn, D.H., and Mellor, A.L. 2007. Cell-autonomous control of interferon type I expression by indoleamine 2,3-dioxygenase in regulatory CD19+ dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **37**:1064-1071.
- Maraskovsky, E., Brasel, K., Teepe, M., Roux, E.R., Lyman, S.D., Shortman, K., and McKenna, H.J. 1996. Dramatic increase in the numbers of functionally mature dendritic cells in Flt3 ligand-treated mice: multiple dendritic cell subpopulations identified. *J. Exp. Med.* **184**:1953-1962.
- Mariathasan, S., Jones, R.G., and Ohashi, P.S. 1999. Signals involved in thymocyte positive and negative selection. *Semin. Immunol.* **11**:263-272.
- Marks, R. and Kopf, A.W. 1995. Cancer of the skin in the next century. *Int. J. Dermatol.* **34**:445-447.
- Martin-Orozco, N. and Dong, C. 2006. New battlefields for costimulation. *J. Exp. Med.* **203**:817-820.
- Matzinger, P. 1994. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu. Rev. Immunol.* **12**:991-1045.
- Maytin, E.V., Ubeda, M., Lin, J.C., and Habener, J.F. 2001. Stress-inducible transcription factor CHOP/gadd153 induces apoptosis in mammalian cells via p38 kinase-dependent and -independent mechanisms. *Exp. Cell Res.* **267**:193-204.
- Mazzoni, A. and Segal, D.M. 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J. Leukoc. Biol.* **75**:721-730.
- McGuirk, P., McCann, C., and Mills, K.H. 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by *Bordetella pertussis*. *J. Exp. Med.* **195**:221-231.
- McHugh, R.S., Whitters, M.J., Piccirillo, C.A., Young, D.A., Shevach, E.M., Collins, M., and Byrne, M.C. 2002. CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor. *Immunity.* **16**:311-323.
- Mellman, I. and Steinman, R.M. 2001. Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* **106**:255-258.
- Mellor, A.L., Baban, B., Chandler, P.R., Manlapat, A., Kahler, D.J., and Munn, D.H. 2005. Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling. *J. Immunol.* **175**:5601-5605.
- Mellor, A.L. and Munn, D.H. 1999. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol. Today.* **20**:469-473.
- Mellor, A.L. and Munn, D.H. 2004. IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:762-774.
- Mellor, A.L. and Munn, D.H. 2008. Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nat. Rev. Immunol.* **8**:74-80.
- Menges, M., Rossner, S., Voigtlander, C., Schindler, H., Kukutsch, N.A., Bogdan, C., Erb, K., Schuler, G., and Lutz, M.B. 2002. Repetitive injections of dendritic cells matured

- with tumor necrosis factor alpha induce antigen-specific protection of mice from autoimmunity. *J. Exp. Med.* **195**:15-21.
- Metz, R., Duhadaway, J.B., Kamasani, U., Laury-Kleintop, L., Muller, A.J., and Prendergast, G.C. 2007. Novel tryptophan catabolic enzyme IDO2 is the preferred biochemical target of the antitumor indoleamine 2,3-dioxygenase inhibitory compound D-1-methyl-tryptophan. *Cancer Res.* **67**:7082-7087.
- Mirshahidi, S., Huang, C.T., and Sadegh-Nasseri, S. 2001. Anergy in peripheral memory CD4(+) T cells induced by low avidity engagement of T cell receptor. *J. Exp. Med.* **194**:719-731.
- Miyara, M. and Sakaguchi, S. 2007. Natural regulatory T cells: mechanisms of suppression. *Trends Mol. Med.* **13**:108-116.
- Moffett, J.R. and Namboodiri, M.A. 2003. Tryptophan and the immune response. *Immunol. Cell Biol.* **81**:247-265.
- Morelli, A.E. and Thomson, A.W. 2007. Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:610-621.
- Moskophidis, D., Lechner, F., Pircher, H., and Zinkernagel, R.M. 1993. Virus persistence in acutely infected immunocompetent mice by exhaustion of antiviral cytotoxic effector T cells. *Nature.* **362**:758-761.
- Mosmann, T.R., Schumacher, J.H., Street, N.F., Budd, R., O'Garra, A., Fong, T.A., Bond, M.W., Moore, K.W., Sher, A., and Fiorentino, D.F. 1991. Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4+ T cells. *Immunol. Rev.* **123**:209-229.
- Munn, D.H. and Mellor, A.L. 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase and tumor-induced tolerance. *J. Clin. Invest.* **117**:1147-1154.
- Munn, D.H., Shafizadeh, E., Attwood, J.T., Bondarev, I., Pashine, A., and Mellor, A.L. 1999. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J. Exp. Med.* **189**:1363-1372.
- Munn, D.H., Sharma, M.D., Baban, B., Harding, H.P., Zhang, Y., Ron, D., and Mellor, A.L. 2005. GCN2 kinase in T cells mediates proliferative arrest and anergy induction in response to indoleamine 2,3-dioxygenase. *Immunity.* **22**:633-642.
- Munn, D.H., Sharma, M.D., Lee, J.R., Jhaver, K.G., Johnson, T.S., Keskin, D.B., Marshall, B., Chandler, P., Antonia, S.J., Burgess, R. *et al.* 2002. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science.* **297**:1867-1870.
- Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C., and Mellor, A.L. 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science.* **281**:1191-1193.
- Nagineni, C.N., Pardhasaradhi, K., Martins, M.C., Detrick, B., and Hooks, J.J. 1996. Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. *Infect. Immun.* **64**:4188-4196.
- Narasimhan, J., Staschke, K.A., and Wek, R.C. 2004. Dimerization is required for activation of eIF2 kinase Gcn2 in response to diverse environmental stress conditions. *J. Biol. Chem.* **279**:22820-22832.
- Nettelbreker, E., Zeidler, H., Bartels, H., Dreses-Werringloer, U., Däubener, W., Holtmann, H., and Kohler, L. 1998. Studies of persistent infection by *Chlamydia trachomatis* serovar K in TPA-differentiated U937 cells and the role of IFN-gamma. *J. Med. Microbiol.* **47**:141-149.
- Neumann, J. and Koch, N. 2006. A novel domain on HLA-DRbeta chain regulates the chaperone role of the invariant chain. *J. Cell Sci.* **119**:4207-4214.

- Neumann, J., König, A., and Koch, N. 2007. Detection of aberrant association of DM with MHC class II subunits in the absence of invariant chain. *Int. Immunol.* **19**:31-39.
- Neurauter, G., Zangerle, R., Widner, B., Quirchmair, G., Sarcletti, M., and Fuchs, D. 2003. Effective antiretroviral therapy reduces degradation of tryptophan in patients with HIV-1 infection. *Adv. Exp. Med. Biol.* **527**:317-323.
- Niederhorn, J.Y. 2007. Immune mechanisms of corneal allograft rejection. *Curr. Eye Res.* **32**:1005-1016.
- Nimmerjahn, F. and Ravetch, J.V. 2007. Fc-receptors as regulators of immunity. *Adv. Immunol.* **96**:179-204.
- Nossal, G.J. 1994. Negative selection of lymphocytes. *Cell.* **76**:229-239.
- Oyadomari, S. and Mori, M. 2004. Roles of CHOP/GADD153 in endoplasmic reticulum stress. *Cell Death. Differ.* **11**:381-389.
- Page, D.M., Kane, L.P., Allison, J.P., and Hedrick, S.M. 1993. Two signals are required for negative selection of CD4+CD8+ thymocytes. *J. Immunol.* **151**:1868-1880.
- Parry, R.V., Chemnitz, J.M., Frauwirth, K.A., Lanfranco, A.R., Braunstein, I., Kobayashi, S.V., Linsley, P.S., Thompson, C.B., and Riley, J.L. 2005. CTLA-4 and PD-1 receptors inhibit T-cell activation by distinct mechanisms. *Mol. Cell Biol.* **25**:9543-9553.
- Penna, G., Roncari, A., Amuchastegui, S., Daniel, K.C., Berti, E., Colonna, M., and Adorini, L. 2005. 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* **106**:3490-3497.
- Pfefferkorn, E.R. and Guyre, P.M. 1984. Inhibition of growth of *Toxoplasma gondii* in cultured fibroblasts by human recombinant gamma interferon. *Infect. Immun.* **44**:211-216.
- Picca, C.C. and Caton, A.J. 2005. The role of self-peptides in the development of CD4+CD25+ regulatory T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **17**:131-136.
- Picca, C.C., Larkin, J., III, Boesteanu, A., Lerman, M.A., Rankin, A.L., and Caton, A.J. 2006. Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection. *Immunol. Rev.* **212**:74-85.
- Pickl, W.F., Majdic, O., Kohl, P., Stockl, J., Riedl, E., Scheinecker, C., Bello-Fernandez, C., and Knapp, W. 1996. Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J. Immunol.* **157**:3850-3859.
- Popov, A., Abdullah, Z., Wickenhauser, C., Saric, T., Driesen, J., Hanisch, F.G., Domann, E., Raven, E.L., Dehus, O., Hermann, C. *et al.* 2006. Indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells form suppurative granulomas following *Listeria monocytogenes* infection. *J. Clin. Invest.* **116**:3160-3170.
- Popov, A. and Schultze, J.L. 2008. IDO-expressing regulatory dendritic cells in cancer and chronic infection. *J. Mol. Med.* **86**:145-160.
- Prechtel, A.T. and Steinkasserer, A. 2007. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch. Dermatol. Res.* **299**:59-69.
- Puccetti, P. and Grohmann, U. 2007. IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation. *Nat. Rev. Immunol.* **7**:817-823.
- Puig-Kroger, A., Relloso, M., Fernandez-Capetillo, O., Zubiaga, A., Silva, A., Bernabeu, C., and Corbi, A.L. 2001. Extracellular signal-regulated protein kinase signaling pathway negatively regulates the phenotypic and functional maturation of monocyte-derived human dendritic cells. *Blood.* **98**:2175-2182.

- Pulendran, B., Tang, H., and Denning, T.L. 2008. Division of labor, plasticity, and crosstalk between dendritic cell subsets. *Curr. Opin. Immunol.* **20**:61-67.
- Ramsdell, F., Lantz, T., and Fowlkes, B.J. 1989. A nondeletional mechanism of thymic self tolerance. *Science.* **246**:1038-1041.
- Randolph, G.J. 2001. Dendritic cell migration to lymph nodes: cytokines, chemokines, and lipid mediators. *Semin. Immunol.* **13**:267-274.
- Randolph, G.J., Jakubzick, C., and Qu, C. 2007a. Antigen presentation by monocytes and monocyte-derived cells. *Curr. Opin. Immunol.* **20**:52-60.
- Randolph, G.J., Ochando, J., and Partida-S Nchez. 2007b. Migration of Dendritic Cell Subsets and their Precursors. *Annu. Rev. Immunol.* **26**:293-316.
- Randolph, G.J., Sanchez-Schmitz, G., and Angeli, V. 2005. Factors and signals that govern the migration of dendritic cells via lymphatics: recent advances. *Springer Semin. Immunopathol.* **26**:273-287.
- Ravetch, J.V. and Lanier, L.L. 2000. Immune inhibitory receptors. *Science.* **290**:84-89.
- Reid, C.D., Fryer, P.R., Clifford, C., Kirk, A., Tikerpae, J., and Knight, S.C. 1990. Identification of hematopoietic progenitors of macrophages and dendritic Langerhans cells (DL-CFU) in human bone marrow and peripheral blood. *Blood.* **76**:1139-1149.
- Rescigno, M., Martino, M., Sutherland, C.L., Gold, M.R., and Ricciardi-Castagnoli, P. 1998. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J. Exp. Med.* **188**:2175-2180.
- Ridge, J.P., Di, R.F., and Matzinger, P. 1998. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature.* **393**:474-478.
- Rissoan, M.C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal, M.R., and Liu, Y.J. 1999. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* **283**:1183-1186.
- Rizoli, S.B., Rotstein, O.D., Parodo, J., Phillips, M.J., and Kapus, A. 2000. Hypertonic inhibition of exocytosis in neutrophils: central role for osmotic actin skeleton remodeling. *Am. J. Physiol Cell Physiol.* **279**:C619-C633.
- Robinson, C.M., Hale, P.T., and Carlin, J.M. 2005. The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. *J. Interferon Cytokine Res.* **25**:20-30.
- Robinson, C.M., Hale, P.T., and Carlin, J.M. 2006. NF-kappa B activation contributes to indoleamine dioxygenase transcriptional synergy induced by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *Cytokine.* **35**:53-61.
- Rocha, B. and von, B.H. 1991. Peripheral selection of the T cell repertoire. *Science.* **251**:1225-1228.
- Roelofs-Haarhuis, K., Wu, X., Nowak, M., Fang, M., Artik, S., and Gleichmann, E. 2003. Infectious nickel tolerance: a reciprocal interplay of tolerogenic APCs and T suppressor cells that is driven by immunization. *J. Immunol.* **171**:2863-2872.
- Romani, L., Fallarino, F., De, L.A., Montagnoli, C., D'Angelo, C., Zelante, T., Vacca, C., Bistoni, F., Fioretti, M.C., Grohmann, U. *et al.* 2008. Defective tryptophan catabolism underlies inflammation in mouse chronic granulomatous disease. *Nature.* **451**:211-215.
- Roncarolo, M.G., Gregori, S., Battaglia, M., Bacchetta, R., Fleischhauer, K., and Levings, M.K. 2006. Interleukin-10-secreting type 1 regulatory T cells in rodents and humans. *Immunol. Rev.* **212**:28-50.
- Roncarolo, M.G., Levings, M.K., and Traversari, C. 2001. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* **193**:5-9.

- Rudd, C.E. 2008. The reverse stop-signal model for CTLA4 function. *Nat. Rev. Immunol.* **8**:153-160.
- Rutella, S., Bonanno, G., Procoli, A., Mariotti, A., de Ritis, D.G., Curti, A., Danese, S., Pessina, G., Pandolfi, S., Natoni, F. *et al.* 2006. Hepatocyte growth factor favors monocyte differentiation into regulatory interleukin (IL)-10++IL-12low/neg accessory cells with dendritic-cell features. *Blood.* **108**:218-227.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B., and Erlich, H.A. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science.* **239**:487-491.
- Saito, K., Nagamura, Y., Ohta, Y., Sasaki, E., and Ishiguro, I. 1991. Characterization of the L-tryptophan transport system in the liver of growing rats. *Life Sci.* **49**:527-534.
- Sakaguchi, S. 2000. Regulatory T cells: key controllers of immunologic self-tolerance. *Cell.* **101**:455-458.
- Sakaguchi, S. 2005. Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nat. Immunol.* **6**:345-352.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. 1995. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J. Immunol.* **155**:1151-1164.
- Sakurai, K., Zou, J.P., Tschetter, J.R., Ward, J.M., and Shearer, G.M. 2002. Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **129**:186-196.
- Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. 1995. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**:389-400.
- Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **179**:1109-1118.
- Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C.R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. 1998. Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* **28**:2760-2769.
- Salomon, B. and Bluestone, J.A. 2001. Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation. *Annu. Rev. Immunol.* **19**:225-252.
- Sanchez-Fueyo, A., Weber, M., Domenig, C., Strom, T.B., and Zheng, X.X. 2002. Tracking the immunoregulatory mechanisms active during allograft tolerance. *J. Immunol.* **168**:2274-2281.
- Saunders, D., Lucas, K., Ismaili, J., Wu, L., Maraskovsky, E., Dunn, A., and Shortman, K. 1996. Dendritic cell development in culture from thymic precursor cells in the absence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* **184**:2185-2196.
- Scheler, M., Wenzel, J., Tuting, T., Takikawa, O., Bieber, T., and von, B.D. 2007. Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO): the antagonist of type I interferon-driven skin inflammation? *Am. J. Pathol.* **171**:1936-1943.
- Schroecksadel, K., Zangerle, R., Bellmann-Weiler, R., Garimorth, K., Weiss, G., and Fuchs, D. 2007. Indoleamine-2, 3-dioxygenase and other interferon-gamma-mediated pathways in patients with human immunodeficiency virus infection. *Curr. Drug Metab.* **8**:225-236.

- Schroten, H., Spors, B., Hucke, C., Stins, M., Kim, K.S., Adam, R., and Däubener, W. 2001. Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of *Staphylococcus aureus* by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Neuropediatrics*. **32**:206-210.
- Schwartz, R.H. 1989. Acquisition of immunologic self-tolerance. *Cell*. **57**:1073-1081.
- Schwartz, R.H. 2003. T cell anergy. *Annu. Rev. Immunol.* **21**:305-334.
- Schwartz, R.H. 2005. Natural regulatory T cells and self-tolerance. *Nat. Immunol.* **6**:327-330.
- Seddon, B. and Mason, D. 2000. The third function of the thymus. *Immunol. Today*. **21**:95-99.
- Seeman, P. 1974. Ultrastructure of membrane lesions in immune lysis, osmotic lysis and drug-induced lysis. *Fed. Proc.* **33**:2116-2124.
- Sei, S., Saito, K., Stewart, S.K., Crowley, J.S., Brouwers, P., Kleiner, D.E., Katz, D.A., Pizzo, P.A., and Heyes, M.P. 1995. Increased human immunodeficiency virus (HIV) type 1 DNA content and quinolinic acid concentration in brain tissues from patients with HIV encephalopathy. *J. Infect. Dis.* **172**:638-647.
- Seymour, R.L., Ganapathy, V., Mellor, A.L., and Munn, D.H. 2006. A high-affinity, tryptophan-selective amino acid transport system in human macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **80**:1320-1327.
- Sharma, M.D., Baban, B., Chandler, P., Hou, D.Y., Singh, N., Yagita, H., Azuma, M., Blazar, B.R., Mellor, A.L., and Munn, D.H. 2007. Plasmacytoid dendritic cells from mouse tumor-draining lymph nodes directly activate mature Tregs via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* **117**:2570-2582.
- Shevach, E.M. 2000. Regulatory T cells in autoimmunity\*. *Annu. Rev. Immunol.* **18**:423-449.
- Shevach, E.M. 2001. Certified professionals: CD4(+)CD25(+) suppressor T cells. *J. Exp. Med.* **193**:F41-F46.
- Shevach, E.M. 2002. CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers. *Nat. Rev. Immunol.* **2**:389-400.
- Shimizu, J., Yamazaki, S., Takahashi, T., Ishida, Y., and Sakaguchi, S. 2002. Stimulation of CD25(+)CD4(+) regulatory T cells through GITR breaks immunological self-tolerance. *Nat. Immunol.* **3**:135-142.
- Shiroishi, M., Tsumoto, K., Amano, K., Shirakihara, Y., Colonna, M., Braud, V.M., Allan, D.S., Makadzange, A., Rowland-Jones, S., Willcox, B. *et al.* 2003. Human inhibitory receptors Ig-like transcript 2 (ILT2) and ILT4 compete with CD8 for MHC class I binding and bind preferentially to HLA-G. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**:8856-8861.
- Shortman, K. and Heath, W.R. 2001. Immunity or tolerance? That is the question for dendritic cells. *Nat. Immunol.* **2**:988-989.
- Shutt, D.C., Daniels, K.J., Carolan, E.J., Hill, A.C., and Soll, D.R. 2000. Changes in the motility, morphology, and F-actin architecture of human dendritic cells in an in vitro model of dendritic cell development. *Cell Motil. Cytoskeleton.* **46**:200-221.
- Smith, K.G., Tarlinton, D.M., Doody, G.M., Hibbs, M.L., and Fearon, D.T. 1998. Inhibition of the B cell by CD22: a requirement for Lyn. *J. Exp. Med.* **187**:807-811.
- Sohn, S.J., Thompson, J., and Winoto, A. 2007. Apoptosis during negative selection of autoreactive thymocytes. *Curr. Opin. Immunol.* **19**:510-515.
- Soldati, T. and Schliwa, M. 2006. Powering membrane traffic in endocytosis and recycling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **7**:897-908.

- Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonecchi, R., and Mantovani, A. 1998. Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* **161**:1083-1086.
- Sprent, J., Lo, D., Gao, E.K., and Ron, Y. 1988. T cell selection in the thymus. *Immunol. Rev.* **101**:173-190.
- Sprent, J. and Surh, C.D. 2002. T cell memory. *Annu. Rev. Immunol.* **20**:551-579.
- Sprent, J. and Webb, S.R. 1995. Intrathymic and extrathymic clonal deletion of T cells. *Curr. Opin. Immunol.* **7**:196-205.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. 1992. Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *J. Exp. Med.* **176**:287-292.
- Steinman, R.M. 1991. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu. Rev. Immunol.* **9**:271-296.
- Steinman, R.M. and Banchereau, J. 2007. Taking dendritic cells into medicine. *Nature.* **449**:419-426.
- Steinman, R.M. and Cohn, Z.A. 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137**:1142-1162.
- Steinman, R.M. and Swanson, J. 1995. The endocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **182**:283-288.
- Streilein, J.W. 1999. Immunologic privilege of the eye. *Springer Semin. Immunopathol.* **21**:95-111.
- Stumptner-Cuvelette, P. and Benaroch, P. 2002. Multiple roles of the invariant chain in MHC class II function. *Biochim. Biophys. Acta.* **1542**:1-13.
- Suciu-Foca, N. and Cortesini, R. 2007. Central role of ILT3 in the T suppressor cell cascade. *Cell Immunol.* **248**:59-67.
- Suciu-Foca, N., Manavalan, J.S., and Cortesini, R. 2003. Generation and function of antigen-specific suppressor and regulatory T cells. *Transpl. Immunol.* **11**:235-244.
- Suffia, I., Reckling, S.K., Salay, G., and Belkaid, Y. 2005. A role for CD103 in the retention of CD4+CD25+ Treg and control of *Leishmania major* infection. *J. Immunol.* **174**:5444-5455.
- Süss, G. and Shortman, K. 1996. A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* **183**:1789-1796.
- Szabolcs, P., Avigan, D., Gezelter, S., Ciocon, D.H., Moore, M.A., Steinman, R.M., and Young, J.W. 1996. Dendritic cells and macrophages can mature independently from a human bone marrow-derived, post-colony-forming unit intermediate. *Blood.* **87**:4520-4530.
- Taams, L.S., Boot, E.P., van Eden, W., and Wauben, M.H. 2000. 'Anergic' T cells modulate the T-cell activating capacity of antigen-presenting cells. *J. Autoimmun.* **14**:335-341.
- Taams, L.S., van Rensen, A.J., Poelen, M.C., van Els, C.A., Besseling, A.C., Wagenaar, J.P., van Eden, W., and Wauben, M.H. 1998. Anergic T cells actively suppress T cell responses via the antigen-presenting cell. *Eur. J. Immunol.* **28**:2902-2912.
- Takahashi, T., Tagami, T., Yamazaki, S., Uede, T., Shimizu, J., Sakaguchi, N., Mak, T.W., and Sakaguchi, S. 2000. Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) T cells.

- regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4. *J. Exp. Med.* **192**:303-310.
- Takikawa, O., Habara-Ohkubo, A., and Yoshida, R. 1990. IFN-gamma is the inducer of indoleamine 2,3-dioxygenase in allografted tumor cells undergoing rejection. *J. Immunol.* **145**:1246-1250.
- Tanchot, C., Rosado, M.M., Agenes, F., Freitas, A.A., and Rocha, B. 1997. Lymphocyte homeostasis. *Semin. Immunol.* **9**:331-337.
- Tang, Q., Henriksen, K.J., Boden, E.K., Tooley, A.J., Ye, J., Subudhi, S.K., Zheng, X.X., Strom, T.B., and Bluestone, J.A. 2003. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J. Immunol.* **171**:3348-3352.
- Tappertzhofen, B., Die duale Funktion der Proteine Cytohesin-1 und CYTIP in der Migration humaner dendritischer Zellen. 2007. [http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss\\_online/math\\_nat\\_fak/2007/tappertzhofen\\_barbara/index.htm](http://hss.ulb.uni-bonn.de/diss_online/math_nat_fak/2007/tappertzhofen_barbara/index.htm)
- Taylor, R.C., Cullen, S.P., and Martin, S.J. 2008. Apoptosis: controlled demolition at the cellular level. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **9**:231-241
- Terness, P., Bauer, T.M., Rose, L., Dufter, C., Watzlik, A., Simon, H., and Opelz, G. 2002. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J. Exp. Med.* **196**:447-457.
- Thomson, C.W., Lee, B.P., and Zhang, L. 2006. Double-negative regulatory T cells: non-conventional regulators. *Immunol. Res.* **35**:163-178.
- Tivol, E.A., Borriello, F., Schweitzer, A.N., Lynch, W.P., Bluestone, J.A., and Sharpe, A.H. 1995. Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4. *Immunity.* **3**:541-547.
- Tone, M., Tone, Y., Babik, J.M., Lin, C.Y., and Waldmann, H. 2002. The role of Sp1 and NF-kappa B in regulating CD40 gene expression. *J. Biol. Chem.* **277**:8890-8897.
- Torkar, M., Norgate, Z., Colonna, M., Trowsdale, J., and Wilson, M.J. 1998. Isotypic variation of novel immunoglobulin-like transcript/killer cell inhibitory receptor loci in the leukocyte receptor complex. *Eur. J. Immunol.* **28**:3959-3967.
- Trombetta, E.S., Ebersold, M., Garrett, W., Pypaert, M., and Mellman, I. 2003. Activation of lysosomal function during dendritic cell maturation. *Science.* **299**:1400-1403.
- Turka, L.A. and Walsh, P.T. 2008. IL-2 signaling and CD4+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells. *Front Biosci.* **13**:1440-1446.
- Umlauf, S.W., Beverly, B., Lantz, O., and Schwartz, R.H. 1995. Regulation of interleukin 2 gene expression by CD28 costimulation in mouse T-cell clones: both nuclear and cytoplasmic RNAs are regulated with complex kinetics. *Mol. Cell Biol.* **15**:3197-3205.
- Uyttenhove, C., Pilotte, L., Theate, I., Stroobant, V., Colau, D., Parmentier, N., Boon, T., and Van den Eynde, B.J. 2003. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat. Med.* **9**:1269-1274.
- van Kooyk, Y. and Figdor, C.G. 2000. Avidity regulation of integrins: the driving force in leukocyte adhesion. *Curr. Opin. Cell Biol.* **12**:542-547.
- Van, P.L., Ibraghimov, A., and Abbas, A.K. 1996. The roles of costimulation and Fas in T cell apoptosis and peripheral tolerance. *Immunity.* **4**:321-328.
- Vasu, C., Prabhakar, B.S., and Holterman, M.J. 2004. Targeted CTLA-4 engagement induces CD4+CD25+CTLA-4high T regulatory cells with target (allo)antigen specificity. *J. Immunol.* **173**:2866-2876.



- Veldman, C., Hohne, A., Dieckmann, D., Schuler, G., and Hertl, M. 2004. Type I regulatory T cells specific for desmoglein 3 are more frequently detected in healthy individuals than in patients with pemphigus vulgaris. *J. Immunol.* **172**:6468-6475.
- Verrey, F., Jack, D.L., Paulsen, I.T., Saier, M.H., Jr., and Pfeiffer, R. 1999. New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J. Membr. Biol.* **172**:181-192.
- Vicente-Manzanares, M. and Sanchez-Madrid, F. 2004. Role of the cytoskeleton during leukocyte responses. *Nat. Rev. Immunol.* **4**:110-122.
- Vlad, G., Piazza, F., Colovai, A., Cortesini, R., Della, P.F., Suci-Foca, N., and Manavalan, J.S. 2003. Interleukin-10 induces the upregulation of the inhibitory receptor ILT4 in monocytes from HIV positive individuals. *Hum. Immunol.* **64**:483-489.
- von Bergwelt-Baildon, M.S., Popov, A., Saric, T., Chemnitz, J., Classen, S., Stoffel, M.S., Fiore, F., Roth, U., Beyer, M., Debey, S. *et al.* 2006. CD25 and indoleamine 2,3-dioxygenase are up-regulated by prostaglandin E2 and expressed by tumor-associated dendritic cells in vivo: additional mechanisms of T-cell inhibition. *Blood.* **108**:228-237.
- von Bubnoff, D., Bezold, G., Matz, H., Hanau, D., de la, S.H., and Bieber, T. 2003. Quantification of indoleamine 2,3-dioxygenase gene induction in atopic and non-atopic monocytes after ligation of the high-affinity receptor for IgE, Fc(epsilon)RI and interferon-gamma stimulation. *Clin. Exp. Immunol.* **132**:247-253.
- von Bubnoff, D., Fimmers, R., Bogdanow, M., Matz, H., Koch, S., and Bieber, T. 2004. Asymptomatic atopy is associated with increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and interleukin-10 production during seasonal allergen exposure. *Clin. Exp. Allergy.* **34**:1056-1063.
- von Bubnoff, D., Matz, H., Frahnert, C., Rao, M.L., Hanau, D., de la, S.H., and Bieber, T. 2002. FcepsilonRI induces the tryptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses. *J. Immunol.* **169**:1810-1816.
- Vukmanovic-Stejic, M., Zhang, Y., Cook, J.E., Fletcher, J.M., McQuaid, A., Masters, J.E., Rustin, M.H., Taams, L.S., Beverley, P.C., Macallan, D.C. *et al.* 2006. Human CD4+ CD25hi Foxp3+ regulatory T cells are derived by rapid turnover of memory populations in vivo. *J. Clin. Invest.* **116**:2423-2433.
- Wahl, S.M. 1994. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J. Exp. Med.* **180**:1587-1590.
- Walker, L.S., Chodos, A., Eggena, M., Doms, H., and Abbas, A.K. 2003a. Antigen-dependent proliferation of CD4+ CD25+ regulatory T cells in vivo. *J. Exp. Med.* **198**:249-258.
- Walker, M.R., Carson, B.D., Nepom, G.T., Ziegler, S.F., and Buckner, J.H. 2005. De novo generation of antigen-specific CD4+CD25+ regulatory T cells from human CD4+CD25- cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**:4103-4108.
- Walker, M.R., Kaspirowicz, D.J., Gersuk, V.H., Benard, A., Van Landeghen M., Buckner, J.H., and Ziegler, S.F. 2003b. Induction of FoxP3 and acquisition of T regulatory activity by stimulated human CD4+CD25- T cells. *J. Clin. Invest.* **112**:1437-1443.
- Wang, H.M. and Smith, K.A. 1987. The interleukin 2 receptor. Functional consequences of its bimolecular structure. *J. Exp. Med.* **166**:1055-1069.
- Watanabe, M., Suzuki, T., Taniguchi, M., and Shinohara, N. 1983. Monoclonal anti-Ia murine alloantibodies crossreactive with the Ia-homologues of other mammalian species including humans. *Transplantation.* **36**:712-718.
- Waterhouse, P., Penninger, J.M., Timms, E., Wakeham, A., Shahinian, A., Lee, K.P., Thompson, C.B., Griesser, H., and Mak, T.W. 1995. Lymphoproliferative disorders with early lethality in mice deficient in CtlA-4. *Science.* **270**:985-988.

- Webb, S., Morris, C., and Sprent, J. 1990. Extrathymic tolerance of mature T cells: clonal elimination as a consequence of immunity. *Cell*. **63**:1249-1256.
- Weiner, H.L. 2001. Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells. *Immunol. Rev.* **182**:207-214.
- Weinlich, G., Murr, C., Richardsen, L., Winkler, C., and Fuchs, D. 2007. Decreased serum tryptophan concentration predicts poor prognosis in malignant melanoma patients. *Dermatology*. **214**:8-14.
- Weissman, D., Li, Y., Ananworanich, J., Zhou, L.J., Adelsberger, J., Tedder, T.F., Baseler, M., and Fauci, A.S. 1995. Three populations of cells with dendritic morphology exist in peripheral blood, only one of which is infectable with human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **92**:826-830.
- Wek, R.C., Jiang, H.Y., and Anthony, T.G. 2006. Coping with stress: eIF2 kinases and translational control. *Biochem. Soc. Trans.* **34**:7-11.
- Williams, M.A. and Bevan, M.J. 2007. Effector and memory CTL differentiation. *Annu. Rev. Immunol.* **25**:171-192.
- Wingender, G., Garbi, N., Schumak, B., Jungerkes, F., Endl, E., von, B.D., Steitz, J., Striegler, J., Moldenhauer, G., Tuting, T. *et al.* 2006. Systemic application of CpG-rich DNA suppresses adaptive T cell immunity via induction of IDO. *Eur. J. Immunol.* **36**:12-20.
- Wraight, C.J., van Ender, P., Moller, P., Lipp, J., Ling, N.R., MacLennan, I.C., Koch, N., and Moldenhauer, G. 1990. Human major histocompatibility complex class II invariant chain is expressed on the cell surface. *J. Biol. Chem.* **265**:5787-5792.
- Xia, Y., Wong, N.S., Fong, W.F., and Tideman, H. 2002. Upregulation of GADD153 expression in the apoptotic signaling of N-(4-hydroxyphenyl)retinamide (4HPR). *Int. J. Cancer.* **102**:7-14.
- Xie, G., Bonner, C.A., and Jensen, R.A. 2002. Dynamic diversity of the tryptophan pathway in chlamydiae: reductive evolution and a novel operon for tryptophan recapture. *Genome Biol.* **3**:research0051.
- Yamazaki, S., Iyoda, T., Tarbell, K., Olson, K., Velinzon, K., Inaba, K., and Steinman, R.M. 2003. Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells. *J. Exp. Med.* **198**:235-247.
- Young, J.W., Szabolcs, P., and Moore, M.A. 1995. Identification of dendritic cell colony-forming units among normal human CD34+ bone marrow progenitors that are expanded by c-kit-ligand and yield pure dendritic cell colonies in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* **182**:1111-1119.
- Young, N.T., Waller, E.C., Patel, R., Roghanian, A., Austyn, J.M., and Trowsdale, J. 2008. The inhibitory receptor LILRB1 modulates the differentiation and regulatory potential of human dendritic cells. *Blood.* **111**:3090-3096.
- Yu, Q., Kovacs, C., Yue, F.Y., and Ostrowski, M.A. 2004. The role of the p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase, and phosphoinositide-3-OH kinase signal transduction pathways in CD40 ligand-induced dendritic cell activation and expansion of virus-specific CD8+ T cell memory responses. *J. Immunol.* **172**:6047-6056.
- Yuasa, H.J., Takubo, M., Takahashi, A., Hasegawa, T., Noma, H., and Suzuki, T. 2007. Evolution of vertebrate indoleamine 2,3-dioxygenases. *J. Mol. Evol.* **65**:705-714.
- Zegarra-Moran, O., Folli, C., Manzari, B., Ravazzolo, R., Varesio, L., and Galletta, L.J. 2004. Double mechanism for apical tryptophan depletion in polarized human bronchial epithelium. *J. Immunol.* **173**:542-549.

- Zhang, K. and Kaufman, R.J. 2006. The unfolded protein response: a stress signaling pathway critical for health and disease. *Neurology*. **66**:102-109.
- Zhang, Z.X., Young, K., and Zhang, L. 2001. CD3+CD4-CD8- alpha-beta-TCR+ T cell as immune regulatory cell. *J. Mol. Med.* **79**:419-427.
- Zheng, Y. and Rudensky, A.Y. 2007. Foxp3 in control of the regulatory T cell lineage. *Nat. Immunol.* **8**:457-462.
- Zheng, Y., Zha, Y., and Gajewski, T.F. 2008. Molecular regulation of T-cell anergy. *EMBO Rep.* **9**:50-55.
- Zhou, L.J. and Tedder, T.F. 1995a. A distinct pattern of cytokine gene expression by human CD83+ blood dendritic cells. *Blood*. **86**:3295-3301.
- Zhou, L.J. and Tedder, T.F. 1995b. Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol.* **154**:3821-3835.
- Zhou, L.J. and Tedder, T.F. 1996. CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**:2588-2592.
- Ziegler-Heitbrock, H.W. and Ulevitch, R.J. 1993. CD14: cell surface receptor and differentiation marker. *Immunol. Today*. **14**:121-125.



## 6 ANHANG

### 6.1 Abkürzungen und Zeichen

7AAD	DNA-Farbstoff 7-Amino- Actinomycin-D
AB/AM	Antibiotika/Antimykotika
Abb.	Abbildung
APC	Antigen -präsentierende Zelle ( <i>antigen presenting cell</i> )
APC	Fluoreszenzfarbstoff Allophycocyanin
APS	Ammoniumperoxodisulfat
AS	Aminosäure
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Grad Celsius
CD	Differenzierungscluster ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	komplementäre DNA ( <i>complementary DNA</i> )
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer binding protein</i>
CFSE	Carboxyfluorescein-Succinimidyl Ester
CHOP	<i>C/EBP homologous protein</i>
C <sub>2</sub> H <sub>4</sub> O <sub>2</sub>	Essigsäure
CLIP	<i>class II invariant chain peptides</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
cm <sup>2</sup>	Quadratcentimeter
cpm	Ausschläge pro Minute ( <i>counts per minute</i> )
D	Dalton
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Desoxyribonucleinacid</i> )
dNTPs	Nukleosidtriphosphate
DCs	dendritische Zellen ( <i>dendritic cells</i> )
DCs <sub>reg</sub>	regulatorische (tolerogene) dendritische Zellen
iDCs	imature DCs
mDCs	mature DCs
DCs <sup>-trp</sup>	DCs generiert unter trp-Mangelbedingungen (5 µM)
DCs <sup>+trp</sup>	DCs generiert unter normlen Zellkulturbedingungen (30 µM)
DCs <sup>-glu</sup>	DCs generiert unter glu-Mangelbedingungen
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid, Gefrierschutzmittel
DN	doppelt negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DP	doppelt positiv
DPO	2,5-Diphenyloxazol
DTT	1,4-Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ER	Endoplasmatisches Retikulum

EtBr	Ethidiumbromid
Fa.	Firma
F(ab) <sub>2</sub> -Fragment	<i>fragment antigen binding</i>
FACS	Fluoreszenzaktivierte Zellsortierung
FAS	Todesrezeptor (CD95)
FcγRII	IgG Fc-Rezeptor Typ II (CD32)
FITC	Fluoreszenzfarbstoff: Fluorescein-Isothiocyanat
FKS	Fötales Kälberserum
Foxp3	Transkriptionsfaktor ( <i>forkhead boxP3</i> )
FSC	Vorwärtslichtstreuung ( <i>foward scatter</i> )
g	Erdbeschleunigung
GM-CSF	<i>Granulocyte macrophage stimulating factor</i>
GCN2	<i>General control non-depressing 2 protein kinase</i>
h	Stunde
HCl	Salzsäure
HLA	<i>human leukocyte antigen</i>
HRP	Meerrettich-Peroxidase ( <i>Horse-Raddish Peroxidase</i> )
Ig	Immunglobulin
ILT2	<i>Immunoglobulin-like transcript 2</i>
ILT3	<i>Immunoglobulin-like transcript 3</i>
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
li	Invariante Kette
IL	Interleukin
INF-γ	Interferon Gamma
IP	Immunpräzipitation
IRES	Interne Ribosomale Eintrittsstelle
ISR	<i>Integrated Stress Response</i>
kbp	Kilo Basenpaare
kDa	Kilo Dalton
KCl	Kaliumchlorid
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Kaliumdihydrogenphosphat
Lf	Flockungseinheit ( <i>limes flocculation</i> ) des Antigens; gibt den Gehalt des spezifischen Proteins an und ist ein Maß für die Immunreaktivität des Toxoids
l	links
glu	L-Glutamin
LPS	Lipopolysaccharid
M	molare Masse
MACS	<i>Magnetic cell sorting</i>
mAk	monoklonalen Antikörper
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
MHCI	MHC Klasse-I Moleküle

MHCII	MHC Klasse-II Moleküle
min.	Minuten
MLR	gemischte Lymphozytenreaktion ( <i>mixed lymphocyte reaction</i> )
MoDC	aus Monozyten generierte DC
mRNA	Messenger RNA
MW	Mittelwert
n	Stichprobe
NaCl	Natriumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (*2H <sub>2</sub> O)	Dinatriumphosphat
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Natriumphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (*2H <sub>2</sub> O)	Natriumdihydrogenphosphat
NaN <sub>3</sub>	Natriumazid
NP40	Nonidet P-40
OD	Optische Dichte
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PMSF	Phenylmethylsulphonyl Fluoride
PE	Phycoerythrin
Poly(I:C)	Polyinosin-Polycytidylsäure
PI	Propidiumjodid
PS	Phosphatidylserin
r	rechts
rFI	Relativer Fluoreszenzindex
RNA	Ribonukleinsäure
tRNA	Transfer-RNA
RNase	Ribonuklease
RPMI	Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>Sodiumdodecylsulphat</i> )
SEM	Standardfehler
SSC	Seitwärtslichtstreuung ( <i>sideward scatter</i> )
Me	2-Mercaptoethanol
Tab.	Tabelle
Taq-Polymerase	<i>Thermus aquaticus</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
T <sub>DCs</sub> <sup>-trp</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-Zellen nach 7-tägiger Antigenstimulation von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen durch DCs <sup>-trp</sup>
T <sub>DCs</sub> <sup>+trp</sup>	CD4 <sup>+</sup> CD25 <sup>+</sup> T-Zellen nach 7-tägiger Antigenstimulation von CD4 <sup>+</sup> T-Zellen durch DCs <sup>+trp</sup>

TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptoren
TMB	Tetra-Methyl-Benzidin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tregs	regulatorische T-Zellen
iTreg	induzierte regulatorische T-Zellen
nTreg	natürliche regulatorische T-Zellen
trp	Tryptophan
TT	Tetanus Toxoid
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
T-Zelle	T-Lymphozyt
T <sub>H</sub>	T-Helfer-Zellen
U	Unit(s) (Maß für biologische Aktivität)
UpM	Umdrehung pro Minute
UPR	<i>Unfolded Protein Response</i>
UV	Ultraviolett
vs.	versus
V	Volt



## 6.2 Antikörper

AK	Gekoppelt	Isotyp (Maus)	Klon	Herkunft
CD1a	RD1	IgG1	T6	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
CD14	PE	IgG2a	M5E2	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD14	APC	IgG2a	MΦP9	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
ILT3	PC5	IgG1	ZM3.8	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
CD3	PE	IgG1	UCHT1	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
CD4	FITC	IgG1	RPA-T4	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD4	APC	IgG1	RPA-T4	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD8	FITC	IgG1	HIT8a	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD25	PE	IgG1	M-A251	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD25	FITC	IgG1	M-A251	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Foxp3	Alexa Fluor® 647	IgG	259D	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
IgG1	RD1	IgG1	2T8-2F5	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
IgG1	FITC	IgG1	MOPC-21	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
IgG1	PE	IgG1	MOPC-21	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
IgG1	Alexa Fluor® 647	IgG1	MOPC-21	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
IgG1	APC	IgG1	MOPC-21	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
IgG1	PC5	IgG1	679.1Mc7	Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland
IgG2a	APC	IgG2a	X39	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
IgG2a	PE	IgG2a	G155-178	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD11a		IgG1	HI111	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD11b		IgG1	ICRF44	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD11c		IgG1	B-ly6	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD32		IgG2b	FLI8.26	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD40		IgG1	5C3	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD80		IgG1	L307.4	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CD83a		IgG2b	HB15a	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
CD95		IgG1	DX2	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
CLIP		IgG1	CerCLIP	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
ILT2		IgG2b	GHI/75	Beckton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
ILT3		IgG2a	293623	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
MHC I		IgG2b	W6/32	Norbert Koch, Bonn, Deutschland
MHC II		IgG2b	L243	Norbert Koch, Bonn, Deutschland
IDO		IgG1		Osamu Takikawa, Aichi, Japan
IgG	FITC Ziege			Dianova, Hamburg, Deutschland
F(ab') <sub>2</sub>	anti Maus			
IgG1		IgG1	MOPC-21	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
IgG2a		IgG2a	UPC-10	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
IgG2b		IgG2b	MOPC-141	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland



## 7 DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Frau PD Dr. Dagmar von Bubnoff für die Überlassung des Themas, sowie für die finanzielle als auch kreative wissenschaftliche Unterstützung während der gesamten Periode meiner Arbeit. In dieser Zeit wusste sie mich nicht nur stets in herausragender Weise zu betreuen, sondern hat mich in freundschaftlicher sowie in professioneller Weise motivieren und anleiten können, selbst aus der Ferne. Zudem möchte ich mich für ihre große und ausgezeichnete Hilfe bei der Niederschrift meiner Arbeit und bei der Verfassung der Veröffentlichung bedanken, die ohne ihren unermüdlichen Einsatz so nicht zustande gekommen wäre.

Besonders herzlich möchte ich mich bei Herrn Professor Thomas Bieber bedanken, für die stets gewährte Freizügigkeit, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und seine stete Diskussionsbereitschaft in wissenschaftlichen Fragen sowie für die wertvolle Hilfestellung während meiner Zeit an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie. Seine konstruktiven und fruchtbaren Vorschläge in unseren Laborbesprechungen waren von unschätzbarem Wert und haben mir sehr bei der Fertigstellung dieser Arbeit und Niederschrift der Veröffentlichung weitergeholfen. Ohne sein 'unbürokratisches' Einspringen als Betreuer bzw. seine übernommene Patenschaft hätte diese Arbeit so nicht gelingen können. Auch möchte ich mich für seine besondere Fähigkeit zur Motivation seiner Mitarbeiter und für die aufmunternden Worte bedanken, wenn im Labor einmal nicht alles nach Wunsch verlief.

Herrn Professor Waldemar Kolanus danke ich für seine Bereitschaft, die Betreuung dieser Arbeit an der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Bonn zu übernehmen. Auch möchte ich mich für die Möglichkeit bedanken, diese Dissertation im Rahmen des SFB 704 anzufertigen.

Bei Professor Karl-Heinz Scheidtmann bedanke ich mich für die bereitwillige Mitwirkung im Promotionsausschuss.

Herrn Professor Norbert Koch, Herrn Dr. Jürgen Neumann und Frau Angelika König danke ich für die ausgezeichnete Zusammenarbeit, Diskussionsbereitschaft und für die Einführung in proteinchemische Methoden sowie die Bereitstellung von Antikörpern.

Unserem Laborleiter Herrn Dr. Jörg Weißendorf gilt ein ganz besonderer Dank für seine kompetente Unterstützung bei der Klärung wissenschaftlicher Fragen sowie wertvollen methodischen Ratschlägen. An dieser Stelle sei für die gute Portion Humor gedankt und seine immerwährende Hilfsbereitschaft auch über den Laboralltag hinaus.

Bei den 'IDO Damen' Frau Dr. Marina Scheler und Frau Helene Wilms möchte ich mich ganz besonders für die großartige Zusammenarbeit während der vier Jahre bedanken. Durch Frau Dr. Scheler bekam ich Einblick in den klinischen Bereich der Hautklinik, und ihre fachliche Kompetenz und ihr Engagement haben mich tief beeindruckt. Die konstruktiven Gespräche und Anregungen und ihre niemals ermüdende Hilfsbereitschaft und Unterstützung bei allen, nicht nur wissenschaftlichen, Fragen haben mir sehr viel bedeutet.

Ein riesiges Dankeschön gilt Helene Wilms, dem Sonnenschein der Arbeitsgruppe. Ohne ihre tatkräftige Hilfe und ihren Forschergeist hätten meine Abschlussexperimente nicht so schnell gelingen können. Ich danke ihr außerdem für ihre Hilfsbereitschaft und Unterstützung nicht nur während der Arbeitszeit sowie für ihre liebevolle Freundschaft.

Frau Dr. Susanne Koch, unserer nie versiegenden kreativen Quelle für Forschung und Alltag, sei für die überaus fruchtbaren Ratschläge und für die konstruktive Kritik gedankt.

Ganz besonders herzlich danken möchte ich meiner ehemaligen Kollegin Kristine Kohl für die viele Hilfe und Geduld, die sie mir nicht nur am FACS-Gerät entgegengebracht hat. Ihr Verständnis und ihre unzähligen wissenschaftlichen Ratschläge während unserer gemeinsamen Zeit waren für mich von unschätzbarem Wert.

Besondere Anerkennung gebührt Frau Dr. Susanne Koch, Herrn Dr. Jörg Weißendorf, Frau Dr. Marina Scheler und Ingolf Rick, die viel Mühe und Zeit in das Korrekturlesen dieser Arbeit investiert haben.

Insbesondere erwähnen möchte ich aus dem Labor Immunbiologie Marina, Helene, Kristine, Stefanie, Antonia, Clarissa, Sylvia, Jörg, Susanne, Julia, Ulrike, Jana und Alica wegen der schönen Zeit, die wir nicht nur während der Arbeit miteinander verbracht haben. Ihnen sei ganz herzlich gedankt für das Aufrechterhalten eines entspannten und herzlichen Arbeitsklimas. Die Weihnachts- und Karnevalsfeiern in unserem Seminarraum werden mir immer in Erinnerung bleiben. Besonders möchte ich ihnen für viele gute Ratschläge sowie Hilfestellungen im Labor und für die wertvollen Gespräche danken. Heike Matz sei gedankt für die großartige Einarbeitung in immunbiologische Methoden zu Beginn meiner Promotionszeit.

Außerdem möchte ich mich bei all denen bedanken, die mir unterstützend und verständnisvoll zur Seite standen. Den freiwilligen und unzähligen Blutspendern, ohne die meine Experimente nie zustande gekommen wären, sei besonders herzlich gedankt!

Meinen Freunden Stefanie, Andreas, Michael, Maso, Steve, Volker, Peter, Julia, Christina, Uta, Verena, Jenny, Verena F, Indra, Corina, Meik, Pia, Lexa, Heidi, Arnhild, und Inge, möchte ich für die unvergesslichen Jahre der Studienzeit Bonn und das entgegengebrachte Verständnis für mein 'Untertauchen' in der Endphase der Promotionszeit danken.

Mein wirklich innigster Dank gilt meiner Familie. Vor allem aber möchte ich mich ganz besonders bei meiner Mutter für all die vielen Jahre des Verständnisses und des seelischen Beistandes bedanken. Meinen Geschwistern danke ich für den ungebrochenen Glauben an mich und an meine Arbeit. Ohne ihre Fürsorge, Toleranz und Geduld wäre es mir nie möglich gewesen, diese Dissertation anzufertigen.

Und schließlich hätte mir diese Arbeit niemals soviel Freude bereitet, wenn ich nicht die liebevolle und geduldige Unterstützung meines Freundes Ingolf gehabt hätte, der, wenn er nicht selber 'rumdokterte', doch einige einsame Stunden während dieser Zeit verbringen musste. Über die Promotionsphase hinaus haben sein stetiger Beistand in schwierigen Zeiten und seine überaus wertvollen Tipps mir sehr viel Kraft gegeben, deren Bedeutung zu beschreiben eine weitere Doktorarbeit füllen könnte.

## 8 ERKLÄRUNG

Diese Dissertation wurde im Sinne von §4 der Promotionsordnung vom 7.1.2004 im Zeitraum Februar 2004 bis Juni 2008 von Frau PD Dr. med. D. von Bubnoff und Herrn Prof. Dr. rer. nat. W. Kolanus betreut.

### **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus fremden Quellen direkt oder indirekt übernommenen Gedanken sind als solche kenntlich gemacht (gemäß §6 der Promotionsordnung vom 7.1.2004).

Bonn, den 02.06.2008

---

Manuela Brenk









## 10 PUBLIKATIONSLISTE

### PUBLIKATIONEN

Fleck, G., Brenk, M. and Misof, B. 2003. The discovery of the larva of *Micromacromia camerunica* Karsch, 1889, (Odonata: Anisoptera: Libellulidae): Taxonomic and phylogenetic implications. *Insect Syst. Evol.*

Fleck, G., Brenk, M. and Misof, B. 2006. DNA Taxonomy and the identification of immature insect stages: The true larva of *Tauriphila argo* Ris, 1861 (Odonata: Anisoptera: Libellulidae). *Ann. Soc. Entomol Fr.* 42 (1):91-98.

Fleck, G., Brenk, M. and Misof, B. Larval and molecular characters help to solve phylogenetic puzzles in the highly diverse dragonfly family *Libellulidae*: The Tetrathemistinae are a polyphyletic group. *ODE*. in press.

Fleck, G., Brenk, M., Wallnisch, C., Orland, M., Bleidißl, S., Ullrich, B., Misof, B. Promises and limitations of mixed nucleotide/doublet models in RNA phylogenies as exemplified on mt RNA sequences of anisopterous dragonflies. *J. Zool. Syst. Evol. Res.* in prep.

Brenk, M., Scheler, M., Koch, S., Neumann, J., Takikawa, O., Häcker, G., Bieber, T. and von Bubnoff D. Tryptophan-deprivation induces tolerogenic dendritic cells which favor the generation of T regulatory cells. in prep.

### VORTRÄGE

Brenk, M., Bieber, T. and von Bubnoff, D. Impaired stimulatory capacity by tryptophan deprived dendritic cells. European Congress of Immunology. Paris. 2006.

Brenk, M., Bieber, T. and von Bubnoff, D. Impaired stimulatory capacity by tryptophan deprived dendritic cells. European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Wien. 2006.

Brenk, M., Bieber, T. and von Bubnoff, D. Regulation des Immun-systems durch Tryptophan-Abbau: Rolle der antigen-präsentierenden Zellen. Bonner Interdisciplinary Immunology Interest group. 2006.

Brenk, M., Bieber, T. and von Bubnoff, D. Generierung von regulatorischen dendritischen Zellen durch Tryptophan-Mangel. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologischer Forschung. Freiburg. 2007.

Brenk, M., Bieber, T. and von Bubnoff, D. Tryptophan deprivation contributes to the generation of regulatory dendritic cells. European Academy of Allergology and Clinical Immunology. Göteborg. 2007.

Brenk, M., Bieber, T. and von Bubnoff, D. Generierung von regulatorischen dendritischen Zellen durch Tryptophan-Mangel. Junior Scientist Meeting, Sonderforschungsbereich 704 „Molekulare Mechanismen und chemische Modulation der lokalen Immunregulation“. Bonn. 2007.

#### POSTERBEITRÄGE

Brenk, M., Bieber, T. and von Bubnoff, D. Diminished stimulatory capacity of dendritic cells as a result of tryptophan depletion, Walberberg – Meeting. 2005.

Brenk, M., Bieber, T. and von Bubnoff, D. Diminished stimulatory capacity of dendritic cells as a result of tryptophan depletion. World Allergy Congress. München. 2005.

Brenk, M., Scheler, M., Wilms, H., Bieber, T. and von Bubnoff, D. Impaired stimulatory capacity by tryptophan-deprived dendritic cells. Symposium of the Collegium Internationale Allergologium. Malta. 2006.

Brenk, M., Scheler, M., Wilms, H., Bieber, T. and von Bubnoff, D. Tryptophan deprivation contributes to the generation of regulatory dendritic cells. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie. Heidelberg. 2007.