

## 6. ZUSAMMENFASSUNG

IL-12 wird aus den Untereinheiten p35 und p40 aufgebaut, wobei p40 auch in Assoziation mit p19 als IL-23 vorliegen kann. Daten von Patienten, die IL-12- oder IL-12-Rezeptor-Immundefizienzen aufweisen, widersprechen der Notwendigkeit von IL-12 für die Induktion von Th1-Immunantworten im Menschen. Dies führte zu der Vermutung, dass bei Menschen andere Mechanismen existieren, die eine IL-12-Defizienz kompensieren können. Dendritische Zellen (DCs) sind in der Lage, die Zytokine der IL-12-Familie zu produzieren und naive CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten zu aktivieren. Um die Bedeutung von IL-12 für die Induktion zellulärer Immunantworten zu untersuchen, wurden in der vorliegenden Arbeit IL-12-defiziente DCs aus monozytären Blutvorläuferzellen gewonnen und in vitro sowie in vivo hinsichtlich ihrer immunologischen Eigenschaften analysiert. Hierfür wurde der Rhesusaffe (*Macaca mulatta*) aufgrund seiner engen phylogenetischen und immunologischen Verwandtschaft zum Menschen als Tiermodell gewählt.

Um neben peripheren auch mukosale Immunantworten nach Reinjektion IL-12-defizienter DCs zu erfassen, wurde zunächst in Vorstudien untersucht, inwieweit funktional intakte Leukozyten aus mukosalen Gewebeproben von Rhesusaffen isoliert werden können. Magenbiopsate erwiesen sich aufgrund der niedrigen Zellzahlen und unzureichenden Reinheit der isolierten Zellen als ungeeignetes Ausgangsmaterial für funktionelle Untersuchungen. Dagegen konnten aus mukosalen Resektaten isolierte Leukozyten für funktionelle Untersuchungen antigenspezifischer Immunantworten verwendet werden.

Da Studien, die auf dem Einsatz ex vivo gewonnener, reinjizierter DCs basieren, eine relativ große Anzahl von DCs erfordern, wurden außerdem im Vorfeld Untersuchungen zur Mobilisierung von Monozyten in peripheren Blut der Spendertiere mittels rekombinanter humaner Zytokine durchgeführt. Die Behandlung von Rhesusaffen mit rhGM-CSF führte zu einer 30-fachen Steigerung der Monozytenzahl. Eine zweite Applikation von rhGM-CSF blieb jedoch bei vorbehandelten Tieren ohne Effekt aufgrund der Induktion neutralisierender Antikörper. Die Behandlungen mit rhG-CSF resultierten dagegen wiederholt in

einer 2-3-fachen Erhöhung der Monozytenzahl. Daher wurden die Tiere vor Gewinnung der Blutproben für die In-vivo-Experimente mit rhG-CSF behandelt.

Das immunomodulatorische synthetischen Polypeptid Glatirameracetat (GA) in Kombination mit dem c-AMP-Derivat, dibutyryl-cAMP (d-cAMP) aktivierte monozytenabgeleitete Rhesusaffen-DCs, ohne eine IL-12-Produktion hervorzurufen. GA/d-cAMP-aktivierte Zellen zeigten Charakteristika reifer DCs, darunter eine hohe Oberflächenexpression MHC-Klasse II- und kostimulatorischer Moleküle (CD40, CD80, CD86), von CD83 und CCR7, sowie eine reduzierte Endozytosekapazität. Die Phosphorylierung der p38-MAP-Kinase wurde in GA/d-cAMP-stimulierten DCs nicht induziert. Dementsprechend sezernierten diese Zellen signifikant weniger IL-12p40 ( $p < 0,001$ ) als zytokinaktivierte Zellen. Die Sekretion von CCL3 wurde jedoch nicht inhibiert, und die Zellen sezernierten kein IL-10. GA/d-cAMP-stimulierte DCs aktivierten effektiv antigenspezifische Th1-Gedächtniszellen in vitro. Nach In-Vitro-Stimulierung naiver CD4<sup>+</sup> T-Lymphozyten mit GA/d-cAMP-aktivierten, verglichen mit zytokinaktivierten DCs war der Anteil Th1-polarisierter Lymphozyten geringer.

36 h nach intradermaler, jedoch nicht nach subkutaner Applikation, wurden GA/d-cAMP-aktivierte fluorochrommarkierte DCs in den parakortikalen T-Zellarealen der drainierenden Lymphknoten nachgewiesen. GA/d-cAMP- und zytokinaktivierte proteinantigenbeladene DCs induzierten nach intradermaler Injektion qualitativ ähnliche Th-Immunantworten, die durch die Produktion von IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und IL-17 charakterisiert waren. Daneben führte die Applikation sowohl GA/d-cAMP- als auch zytokinaktivierter DCs zur Expansion peripherer CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischer T-Lymphozyten. Die qualitativ ähnlichen In-Vivo-Immunantworten nach Verabreichung IL-12-defizienter und IL-12-produzierender DCs könnten damit erklärt werden, dass nach Reinjektion weitere Faktoren, darunter Bestandteile extrazellulärer Matrix oder CD40-Ligand (CD40L), die Eigenschaften der DCs beeinflusst haben. So sezernierten GA/d-cAMP-aktivierte DCs nach In-Vitro-Restimulierung mit rekombinantem CD40L IL-12p40 und IL-23 in vergleichbaren Konzentrationen wie CD40L-restimulierte, zytokinaktivierte DCs.

Die in dieser Arbeit beschriebene Induktion ähnlicher Th-Immunantworten durch IL-12-defiziente und IL-12-produzierende DCs in vivo legt nahe, dass IL-12-defiziente DCs über andere Mechanismen, unter Umständen durch die Sekretion von IL-23, in der Lage sind, proinflammatorische Immunantworten zu induzieren.

## **SUMMARY**

IL-12 consists of a p35 and a p40 subunit, but p40 can also associate with a p19 subunit to form IL-23. Data from patients with IL-12- or IL-12-receptor immunodeficiencies argue against the requirement of IL-12 for the induction of Th1-immune responses in humans. Therefore, mechanisms may exist in humans, which can partially compensate for an IL-12-deficiency. Dendritic cells (DCs) are able to produce the cytokines of IL-12-family and to activate naïve CD4<sup>+</sup> T lymphocytes. To study the importance of IL-12 for the induction of cellular immune responses in primates, IL-12-deficient DCs were generated from monocytic blood precursors and analysed in vitro as well as in vivo regarding their immunological properties. Rhesus macaques (*Macaca mulatta*) were selected as the animal model because of their close phylogenetical and immunological relation to humans.

To be able to analyse besides systemic also mucosal immune responses, we first investigated whether functionally intact leukocytes could be isolated from mucosal tissues. Because of the low cell numbers and insufficient purity of the isolated cells, stomach biopsies were not suitable for functional studies. In contrast, leukocytes from jejunal or rectal sections could be used for studies of antigen-specific immune responses. Since experiments on the basis of ex-vivo generated, re-injected DCs require relatively high numbers of DCs, we examined additionally whether monocytes can be mobilized in the peripheral blood of the donor animals by the application of recombinant human cytokines. Following the treatment of rhesus macaques with rhGM-CSF a 30-times increase in monocyte numbers was observed. However, a second application of rhGM-CSF was ineffective in pre-treated animals due to the induction of neutralizing antibodies. In contrast, the treatment with rhG-CSF repeatedly resulted in a 2 to 3-times increase in monocytes numbers. Therefore, in the in-vivo-experiments the animals were treated with rhG-CSF prior to the collection of blood samples.

The immunomodulatory synthetic polypeptide glatirameracetate (GA) in combination with the cAMP-derivative, dibutyryl-cAMP (d-cAMP) activated monocyte-derived rhesus monkey DCs without the induction of IL-12 secretion. GA/d-cAMP-activated cells showed characteristics of mature DCs including high

surface expression of MHC class II- and co-stimulatory molecules (CD40, CD80, CD86), CD83 and CCR7 as well as reduced endocytic capacity. Phosphorylation of the p38 MAP kinase was not induced in GA/d-cAMP-activated DCs. Accordingly, these cells secreted significantly less IL-12p40 ( $p < 0,001$ ) than cytokine-activated cells. However, the secretion of CCL3 was not inhibited, and IL-10 was not produced by those cells. GA/d-cAMP-stimulated DCs efficiently activated antigen specific memory Th1 cells in vitro. The number of Th1-polarised lymphocytes was lower, when naive CD4<sup>+</sup> T lymphocytes were stimulated with GA/d-cAMP-activated DCs compared with cytokine-activated cells.

36 h after intradermal, but not after subcutaneous re-injection, GA/d-cAMP-activated fluorescence-labeled DCs were detected in the paracortical T-cell areas of the draining lymph nodes. Similarly re-injected, GA/d-cAMP- and cytokine-activated protein antigen-loaded DCs induced qualitatively similar Th-immune responses characterised by the production of IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-17. In addition, the application of both GA/d-cAMP- and cytokine-activated DCs was followed by an expansion of peripheral CD4<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatory T lymphocytes. The qualitatively similar immune responses in vivo observed after the administration of IL-12-deficient and IL-12-producing DCs could be explained by the fact that the DCs might have received additional stimuli after the re-injection, e.g., through molecules of the extracellular matrix or CD40 ligand (CD40L), which might have affected the properties of the DCs in vivo. In fact, GA/d-cAMP activated DCs subsequently exposed to recombinant CD40L in vitro secreted IL-12p40 and IL-23 to a similar extent as DCs previously stimulated with cytokines.

The induction of similar Th immune responses by IL-12-deficient and IL-12-producing DCs in vivo as described in this work indicates that IL-12-deficient DCs by means of other mechanisms, possibly through the secretion of IL-23, are capable of inducing proinflammatory immune responses.