

Aus dem Institut für Virologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die Wirkung des Epstein-Barr-Virus-kodierten Interleukin-10
auf humane dendritische Zellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Dörte Irene Wieland

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. G. Schönrich
2. Prof. Dr. C. Scheibenbogen
3. Prof. Dr. med. H. Hengel

***Datum der Promotion:* 20.11.2009**

Gewidmet meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

| | |
|-------------------------------------------------------------------|-----------|
| I. EINLEITUNG | 8 |
| I.1. Das Epstein-Barr-Virus | 8 |
| I.1.1 Geschichte und Epidemiologie | 8 |
| I.1.2 Pathogenese..... | 8 |
| I.1.3 Klinik und Diagnostik | 9 |
| I.1.4 Assoziation mit malignen Erkrankungen..... | 10 |
| I.1.5 Einteilung der Herpesviren | 11 |
| I.1.6 Genom und Genomaufbau | 11 |
| I.1.7 Lytischer und latenter Infektionszyklus | 12 |
| I.1.7.1 Virusproteine | 12 |
| I.2 Aufgaben des Immunsystems | 13 |
| I.2.1 Einleitung..... | 13 |
| I.2.1.1 Die Angeborene Immunität | 13 |
| I.2.1.2 Die Adaptive Immunität..... | 14 |
| I.2.2 Antigen-präsentierende Zellen..... | 14 |
| I.2.2.1 Dendritische Zellen | 14 |
| I.2.2.2 Reifung dendritischer Zellen | 16 |
| I.2.2.3 Einfluss dendritischer Zellen auf die Immunantwort..... | 17 |
| I.2.3 T-Lymphozyten | 18 |
| I.2.4 Antivirale Immunantwort..... | 19 |
| I.3 Virale Evasionsmechanismen | 19 |
| I.3.1 Einleitung..... | 19 |
| I.3.2 Inhibition und Modulation der angeborenen Immunantwort..... | 20 |
| I.3.3 Beeinflussung der adaptiven Immunantwort..... | 20 |
| I.3.4 Inhibition der Apoptose..... | 20 |
| I.4. Interleukin-10 | 21 |
| I.4.1 Einleitung..... | 21 |
| I.4.2 Biologische Aktivität von Interleukin-10 | 22 |
| I.4.2.1 Effekt auf dendritische Zellen | 22 |
| I.4.2.2 Effekt auf T-Zellen..... | 22 |
| I.4.3 Virale Interleukin-10 Homologe | 23 |
| I.4.3.1 Epstein-Barr-Virus Interleukin-10 | 23 |
| I.5. Zielstellung | 24 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| II. MATERIAL UND METHODEN..... | 25 |
| II.1. Material..... | 25 |
| II.1.1 Antibiotika..... | 25 |
| II.1.2 Antikörper..... | 25 |
| II.1.3 Beads..... | 26 |
| II.1.4 Chemikalien und Enzyme..... | 26 |
| II.1.5 Geräte..... | 27 |
| II.1.6 Kits..... | 27 |
| II.1.7 Lösungen und Puffer..... | 28 |
| II.1.8 Plastikwaren..... | 29 |
| II.1.9 Proteine..... | 29 |
| II.1.10 Liganden..... | 29 |
| II.1.11 Zellen..... | 29 |
| II.1.12 Zellkulturmedien und Zusätze..... | 30 |
| II.1.13 Zytokine..... | 31 |
| II.2 Methoden..... | 31 |
| II.2.1 Gewinnung dendritischer Zellen..... | 31 |
| II.2.2 FACS-Analyse..... | 32 |
| II.2.2.1 FACS-Analyse dendritischer Zellen..... | 32 |
| II.2.2.2 FACS-Analyse reifer dendritischer Zellen..... | 33 |
| II.2.2.3 FACS-Analyse unreifer dendritischer Zellen..... | 34 |
| II.2.2.4 Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen von ebvIL10..... | 35 |
| II.2.3 Apoptoseassay..... | 35 |
| II.2.4 Funktionelle Assays..... | 36 |
| II.2.4.1 Isolation von T-Zellen..... | 36 |
| II.2.4.2 Dendritische Zellen und T-Zell-Assay..... | 36 |
| II.2.4.3 Dendritische Zellen und PBMC-Assay..... | 37 |
| II.2.4.4 HLA-A2 spezifische Antigenpräsentation durch dendritische Zellen..... | 38 |
| II.2.5 ELISA..... | 40 |
| II.2.5.1 IFN γ -ELISA..... | 40 |
| II.2.5.2 IL6 ELISA..... | 41 |
| II.2.5.3 IL12 ELISA..... | 41 |
| II.2.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen..... | 41 |
| II.2.7 Statistische Methoden..... | 41 |
| III. ERGEBNISSE..... | 42 |
| III.1. Einfluss von ebvIL10 auf den Phänotyp dendritischer Zellen..... | 42 |
| III.1.1 Wirkung von ebvIL10 auf LPS - exponierte dendritische Zellen..... | 44 |

| | |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| III.1.1.1 Effekt von ebvIL10 auf Moleküle der Antigenpräsentation | 44 |
| III.1.1.2 Einfluss von ebvIL10 auf kostimulatorische Oberflächenmoleküle | 45 |
| III.1.1.3 Auswirkung von ebvIL10 auf Adhäsionsmoleküle dendritischer Zellen..... | 47 |
| III.1.1.4 Expression der Indolamin 2,3-Dioxygenase unter Einfluss von ebvIL10 | 50 |
| III.1.1.5 Dosis-abhängiger Effekt von ebvIL10 | 51 |
| III.1.1.6 Zwei verschiedene Gruppen IL10-sensitiver Moleküle auf dendritischen Zellen..... | 54 |
| III.1.2 Wirkung von ebvIL10 auf reife dendritische Zellen | 55 |
| III.1.3 Effekt von ebvIL10 auf unreife dendritische Zellen | 56 |
| III.2 Einfluss von ebvIL10 auf reifungsassoziierte Veränderungen der Funktion dendritischer Zellen..... | 57 |
| III.2.1 Modulation der Produktion von IL6 und IL12 durch ebvIL10..... | 57 |
| III.2.2 Beeinflussung der stimulatorischen Kapazität von DC durch ebvIL10 | 59 |
| III.2.3 Effekt von ebvIL10 auf die Fähigkeit dendritischer Zellen, die Interferon γ Produktion von T-Zellen zu stimulieren | 61 |
| III.2.4 Wirkung von ebvIL10 auf die Fähigkeit von DC, T-Zellen zu aktivieren..... | 62 |
| III.3. Einfluss von ebvIL10 auf die Apoptoserate von DC in Gegenwart eines inflammatorischen Signals | 63 |
| IV. DISKUSSION..... | 65 |
| IV.1 Modulation des Phänotyps dendritischer Zellen durch ebvIL10 | 65 |
| IV.1.1 Wirkung von ebvIL10 auf Moleküle der Antigenpräsentation, Kostimulation und Adhäsion | 65 |
| IV.1.2 Beeinflussung der DC-SIGN Expression auf dendritischen Zellen durch ebvIL10 | 66 |
| IV.1.3 Auswirkung von ebvIL10 auf die Expression von IDO..... | 67 |
| IV.1.4 Dosisabhängiger Effekt von ebvIL10 auf die Expression von ICAM1 | 67 |
| IV.1.5 Einfluss von ebvIL10 auf dendritische Zellen in verschiedenen Reifungsstadien..... | 68 |
| IV.1.6 Zusammenfassung | 68 |
| IV.2 Wirkung von ebvIL10 auf reifungsinduzierte Funktionsänderungen dendritischer Zellen..... | 69 |
| IV.2.1 Effekt von ebvIL10 auf die Produktion wichtiger Zytokine..... | 69 |
| IV.2.2 Einfluss von ebvIL10 auf die Fähigkeit dendritischer Zellen, CD3+ Zellen und T-Zellen zu stimulieren | 69 |
| IV.3 Einfluss von ebvIL10 auf die Apoptoserate dendritischer Zellen | 70 |
| IV.4 Verwendung von ebvIL10 bei Autoimmunerkrankungen und in der Transplantationsmedizin | 71 |
| IV.5 Rolle von ebvIL10 bei der Immunevasion des Epstein-Barr-Virus | 72 |
| IV.6 Zusammenfassung und Ausblick | 73 |
| V. ZUSAMMENFASSUNG | 75 |

| | |
|----------------------------------------------|-----------|
| VI. ABSTRACT | 77 |
| VII. LITERATURVERZEICHNIS..... | 78 |
| VIII. ANHANG | 85 |
| VIII.1 Abkürzungsverzeichnis | 85 |
| VIII.2 Publikationsverzeichnis..... | 87 |
| VIII.3 Danksagung..... | 88 |
| VIII. 4 Lebenslauf | 89 |
| VIII.5 Erklärung an Eides Statt | 90 |

I. Einleitung

I.1. Das Epstein-Barr-Virus

I.1.1 Geschichte und Epidemiologie

Ausschlaggebend für die Entdeckung des Epstein-Barr-Virus (EBV) war die Beobachtung von Denis Burkitt in den fünfziger Jahren des letzten Jahrhunderts, dass ein bestimmter Lymphomtyp, das später nach ihm benannte Burkitt-Lymphom, bei Kindern in Ost- und Zentralafrika besonders häufig auftrat. Er postulierte eine infektiöse Genese. Tony Epstein und Yvonne Barr gelang es 1964, aus diesen Lymphomen B-Zelllinien zu isolieren und darin herpesvirusähnliche Partikel nachzuweisen, die jedoch keinem der bis dahin bekannten Erregern aus der Familie der Herpes Viren entsprachen. Damit war das Epstein-Barr-Virus entdeckt und wurde nach seinen Entdeckern benannt.

Die Erwartung, dass das Virus vor allem in den Endemiegebieten des Burkitt-Lymphoms nachweisbar sein müsste, bestätigte sich nicht. Es zeigte sich in epidemiologischen Untersuchungen, dass das Epstein-Barr-Virus ubiquitär verbreitet ist. In den Industrienationen erreicht die Durchseuchung bis zum 15. Lebensjahr etwa 40% und steigt dann steil auf 80-90% im Erwachsenenalter an. In Entwicklungsländer beträgt die Durchseuchung aufgrund der niedrigeren Hygienestandards schon im Kleinkindalter praktisch 100% [1] [2].

I.1.2 Pathogenese

Der hauptsächliche Übertragungsweg des Epstein-Barr-Virus ist das Küssen, daher auch der Name „kissing disease“. Das Virus wird über den Speichel ausgeschieden und übertragen. Im Mundraum infiziert das Virus Epithelzellen des Oro- und Nasopharynx, sein Hauptangriffsort sind aber B-Lymphozyten. Die Infektion vermittelt eine polyklonale Aktivierung der B-Zellen mit der Folge einer massiven Immunantwort, die sich vor allem gegen Zellen richtet, die virale Proteine des produktiven Zyklus synthetisieren. In infizierten Gedächtnis-B-Lymphozyten dagegen etabliert sich eine latente Infektion. Diese Zellen entgehen der Immunantwort und stellen das Virusreservoir. *In vitro* besitzen diese Zellen die Eigenschaft, zu immortalisierten Zelllinien auszuwachsen. Dies wird aber *in vivo* durch das zelluläre Immunsystem verhindert (Abb. 1).

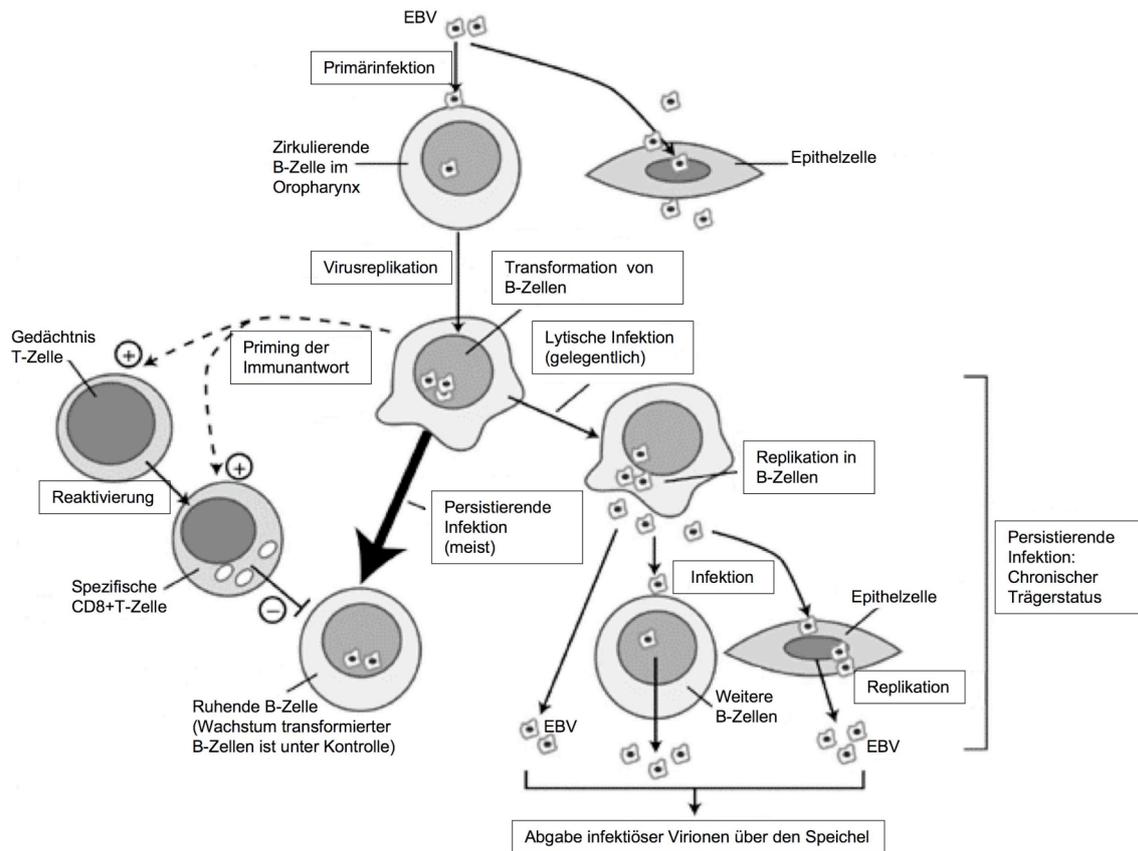


Abb. 1: Epstein-Barr-Virus-Infektion in immunkompetenten Virusträgern (mod. nach Expert Reviews in Molecular Medicine, 2001)

I.1.3 Klinik und Diagnostik

Bei einer Primärinfektion mit dem Epstein-Barr-Virus beträgt die Inkubationszeit etwa vier bis sechs Wochen. Während diese bei Kleinkindern meist inapparent verläuft, kommt es bei Adoleszenten und Erwachsenen in etwa der Hälfte der Fälle zum Bild einer infektiösen Mononukleose, dem Pfeiffer'schen Drüsenfieber, mit fieberhafter Angina tonsillaris, Pharyngitis, Schwellung der zervikalen, axillären und inguinalen Lymphknoten und einem typisch veränderten Blutbild mit Virozyten. Komplikationen stellen eine leichte Granulo- und Thrombozytopenie und eine Hepatitis mit Ikterus dar. Der Befall anderer Organe sowie die chronische Mononukleose mit anhaltender Virusreplikation sind selten [3].

Die Diagnose wird über das typische klinische Bild und das Labor gestellt. Im Blutbild findet sich eine Leukozytose mit 40-90% mononukleärer Zellen und Virozyten, die aktivierten T- und B-Lymphozyten entsprechen.

Serologisch lässt sich eine Antikörperreaktion nachweisen, da es durch die polyklonale

Aktivierung von B-Zellen in 80% der Fälle zum Auftreten heterophiler IgM-Antikörper kommt, die die Fähigkeit besitzen, Hammelerythrozyten zu agglutinieren (Paul-Bunnell-Reaktion). Die Therapie der Erkrankung ist rein symptomatisch mit guter Prognose bei immunkompetenten Patienten, während bei Immunschwäche schwere Verläufe zu beobachten sind.

I.1.4 Assoziation mit malignen Erkrankungen

Einen Großteil seiner klinischen Bedeutung erhält das Epstein-Barr-Virus durch seine Assoziation mit malignen Erkrankungen [4]. Diese erfüllen zwei wichtige Kriterien: Das Virusgenom kann in unterschiedlichen Tumoren gefunden werden und in viruspositiven Tumoren findet man das virale Genom in jeder Tumorzelle. Die Tumorentitäten sind in der Tabelle 1 im Einzelnen aufgeführt. Über die Mechanismen, wie EBV zur Tumorentwicklung beiträgt, ist wenig bekannt; bei der Tumorentwicklung scheinen jedoch zusätzlich verhaltens- und umweltspezifische Faktoren eine Rolle zu spielen.

Tabelle 1: EBV-assoziierte Tumoren

| Tumorart | Zelltyp | Häufigkeit EBV-positiver Tumoren [%] | Andere bekannte Kofaktoren |
|---------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Burkitt Lymphom | B-Zellen (zentrozytisch) | Endemisch: 95-100 Sporadisch: < 20 AIDS-assoziiert: 30-40 | Chromosomale Translokation; <i>Plasmodium falciparum</i> Malaria (Endemisches Burkitt-Lymphom); HIV (AIDS-assoziiert). |
| Immunoblastisches Lymphom | B-Zellen (lymphoblastisch) | 100 | Iatrogene Immunsuppression bei Patienten nach Transplantation; HIV-induzierte Immunsuppression. |
| Morbus Hodgkin | Sternberg-Reed Zellen | Mischform: 50-95 Nodulär-sklerosierend: 10-50 Lymphozytenreich: < 5 | |
| Nasopharynx Karzinom | Epithelzellen | 100 | Karzinogene in Ernährung und Umgebung? |
| T-Zell Lymphom | T-Zellen | > 95 | |

I.1.5 Einteilung der Herpesviren

Infektionen mit Herpesviren gibt es beim Menschen und bei vielen Wirbeltierarten. Die Symptome einer Infektion differieren stark, jedoch gleichen sich Partikelmorphologie und Eigenschaften. Herpesviren gehören zu den Viren mit einem doppelsträngigen DNA-Genom. Bisher sind acht humanpathogene Herpesviren bekannt, die sich in drei Unterfamilien, α -, β - und γ -Herpesviren, einteilen lassen. Beim Epstein-Barr-Virus Typ 1 und 2 handelt es sich um das Humane Herpes Virus 4, es ist ein Lymphokryptovirus und gehört zu den γ -Herpesviren.

I.1.6 Genom und Genomaufbau

Das Genom des Epstein-Barr-Virus liegt als lineare, doppelsträngige DNA in den Virionen vor und hat etwa eine Länge von etwa 170.000 Basenpaaren, allerdings besitzt jeder Virusstamm eine spezifische Anzahl verschiedener Wiederholungseinheiten und so ist die Länge bei den verschiedenen Stämmen heterogen.

Interne Repeats (IR1) teilen das Genom in einen kurzen und einen langen Abschnitt, U_S und U_L . Das U_L Segment wird durch drei weitere Repeats in eine U_2 , U_3 , U_4 und U_5 Region unterteilt (Abb. 2).

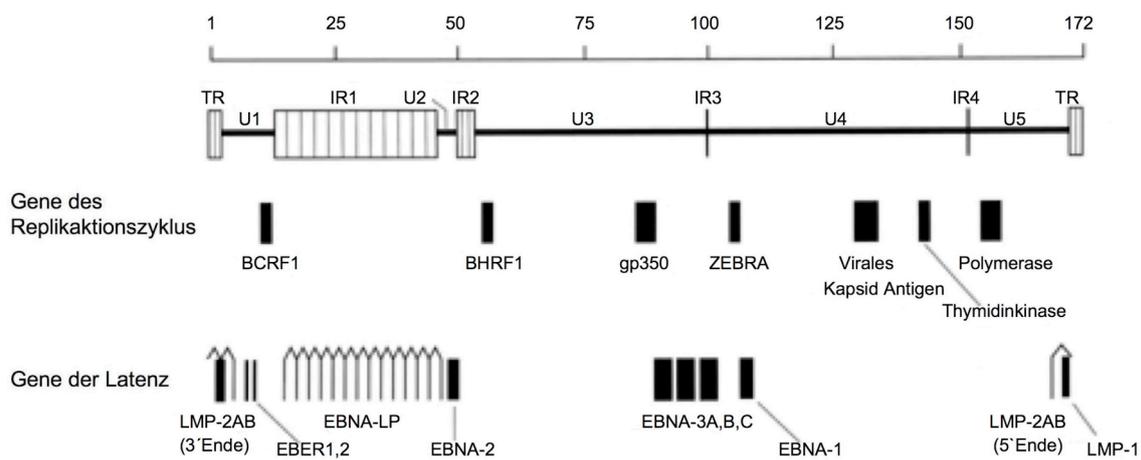


Abb. 2: Genom des Epstein-Barr-Virus

I.1.7 Lytischer und latenter Infektionszyklus

Das Epstein-Barr-Virus vermehrt sich *in vivo* lytisch unter anderem in Epithelzellen des Hals-Nasen-Rachenraums und in B-Zellen (siehe Abb.1), von denen man annimmt, dass während der akuten Erkrankung 0,1%-1% befallen sind [5]. Herpesviren adsorbieren durch ihre Oberflächenproteine an die Zelloberfläche, verschmelzen mit der Membran und liegen dann als Episom im Kernplasma vor.

Die Expression des Virusgenoms erfolgt in einem kaskadenartig regulierten Zyklus. Zuerst werden die „immediate early“-Proteine synthetisiert, die wichtige Regulatoren in der Zelle darstellen. Es folgt die Synthese der „delayed early“-Proteine, die für die Replikation des Virusgenoms erforderlich sind. Zeitgleich mit der erfolgenden DNA-Synthese werden die späten Virusproteine exprimiert. In der Zelle erfolgt nun der Zusammenbau zu infektiösen Virionen, die dann von der Zelloberfläche freigesetzt werden. Nach dem Abklingen der akuten Symptomatik der infektiösen Mononukleose kommt es zu einem Abfall der lytischen Virusreplikation im Oropharynx, jedoch nie zu einem kompletten Verschwinden, so dass sich auf den Schleimhäuten seropositiver Personen weiterhin EBV-DNA nachweisen lässt.

Die virale Latenz dahingegen stellt einen reversiblen Zustand dar, in dem das virale Genom in stabiler Kopienzahl in einer Zelle präsent ist und an die Tochterzellen weitergegeben wird, aber keine Produktion infektiöser Partikel erfolgt. Man nimmt an, dass die Rate latent infizierter Zellen bei 1-50 pro 10^6 B-Zellen liegt [6] [7], die das Reservoir für eine reaktivierte lytische Infektion darstellen. In normalen Spendern gibt es keine Hinweise auf Virusträgerschaft in nicht-B-Leukozyten. Die molekularen Vorgänge und Regulationsprozesse bei der Etablierung und Aufrechterhaltung der Latenz sowie bei der erneuten Reaktivierung sind weitgehend unverstanden. Es ist anzunehmen, dass das Virus die normale Zell-Physiologie ausnutzt und dabei auf die differenzierungsabhängige zelluläre Kontrolle zurückgreift, um unterschiedliche Programme viraler Genexpression zu aktivieren oder zu unterdrücken.

I.1.7.1 Virusproteine

Herpesviren besitzen eine hohe Kodierungskapazität und somit eine große Anzahl von Proteinen, die sie kodieren. Dabei lassen sich Proteine, die während des lytischen Replikationszyklus exprimiert werden, von denen des latenten unterscheiden.

Bei den Proteinen des lytischen Replikationszyklus handelt es sich zum einen um Strukturproteine, wie Membranproteine und Tegumentproteine, zum anderen erfolgt die Synthese von Nichtstrukturproteinen, wie Enzymen, die bei der DNA-Synthese und

Genomvermehrung aktiv sind, Transaktivatoren, die den Ablauf der lytischen Infektion regulieren und Proteinen mit Homologien zu zellulären Genprodukten (siehe auch I.4.3).

Die Proteine, die während des Stadiums der Latenz nachgewiesen werden können, dienen vor allem dazu, den nichtproduktiven Zyklus in B-Zellen zu etablieren und aufrechtzuerhalten. Es können bis zu neun verschiedene Proteine synthetisiert werden [2].

I.2 Aufgaben des Immunsystems

I.2.1 Einleitung

Das Immunsystem der Vertebraten hat sich entwickelt, um den Wirt vor Pathogenen wie Bakterien, Viren und Parasiten, aber auch Tumorzellen zu schützen. Es besteht aus der Gesamtheit von Zellen, Geweben und Molekülen, die diese Resistenz vermitteln.

Man kann zwischen einer angeborenen unspezifischen und einer erworbenen spezifischen Immunantwort unterscheiden.

I.2.1.1 Die Angeborene Immunität

Die angeborene Immunität ist zu jedem Zeitpunkt präsent und vermittelt die schnelle und erste Reaktion auf eine Infektion. Diese Antwort ist notwendig und bestimmend für die Form der nachfolgenden Antwort des adaptiven Immunsystems.

Die angeborene Immunität umfasst vor allem Monozyten, Makrophagen, neutrophile und basophile Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Diese Zellen können Erreger anhand gemeinsamer, konservierter Strukturen, die von diesen exprimiert werden, erkennen [8]. Das verhindert zwar eine flexible Anpassung an Pathogene, ermöglicht aber eine schnelle Reaktion des Immunsystems. So können Mikroorganismen unspezifisch gebunden, phagozytiert und zerstört werden.

In der viralen Immunabwehr sind die NK-Zellen von besonderer Bedeutung, da sie sowohl inflammatorische Zytokine produzieren, als auch direkt zytotoxisch wirken [9].

Daneben gehören noch die Proteine des Komplementsystems, Lysozym und Zytokine zum angeborenen Immunsystem.

I.2.1.2 Die Adaptive Immunität

Die adaptive Immunität vermittelt die spätere, sehr effektive Antwort des Immunsystems. Sie kann sich im Gegensatz zur angeborenen Immunität an den Erreger anpassen und zeichnet sich durch Spezifität sowie die Fähigkeit zum spezifischen Langzeitgedächtnis aus.

Man unterscheidet zwischen der humoralen Immunität und der zellvermittelten Immunität. Die humorale Immunität wird über von B-Lymphozyten produzierte und sezernierte Antikörper vermittelt, während die Zell-vermittelte Immunität zur Abwehr intrazellulärer Erreger die Aufgabe von T-Lymphozyten ist.

Zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem bestehen wichtige Wechselwirkungen. So haben die Zellen der angeborenen Immunität die Fähigkeit, die adaptive Immunantwort zu verstärken und die adaptive Immunantwort bedient sich der Zellen und Moleküle der angeborenen Immunität.

I.2.2 Antigen-präsentierende Zellen

Professionelle Antigen-präsentierende Zellen (APZ) spielen eine wichtige Rolle im Immunsystem des Körpers, da sie besondere immunstimulatorische Eigenschaften besitzen. Zu den professionellen APZ zählen neben den DC auch Makrophagen und B-Zellen. Durch die Präsentation auf diesen Zellen werden Antigene für T-Zellen zugänglich. Daneben haben professionelle APZ die Fähigkeit, die notwendigen Signale bereit zu stellen, die für eine Aktivierung von naiven T-Zellen notwendig sind.

I.2.2.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind einzigartige professionelle APZ, die eine zentrale Rolle sowohl in der angeborenen, als auch der erworbenen Immunantwort spielen [10]. Sie können als einzige eine primäre Immunantwort induzieren und so auch immunologisches Gedächtnis hervorrufen. Ihre Aufgabe ist es, das Immunsystem zu alarmieren und die B- und T-Zellantwort zu regulieren. Sie stellen ein komplexes Zellsystem dar, das unter verschiedenen Umständen so unterschiedliche Antworten hervorrufen kann, wie Immunität oder Toleranz [11].

Wie in der Abbildung 3 zu sehen, stammen dendritische Zellen von Progenitorzellen im Knochenmark ab. Man unterscheidet myeloide und plasmazytoide DC, die lymphatisch sind. Im Blut sind verschiedene Subsets DC präsent, die anhand von Oberflächenmarkern zu unterscheiden sind [12]. Das System der DC ist aber sehr heterogen und besitzt eine große Plastizität. Diese erlaubt eine flexible Antwort auf die verschiedenen Pathogene.

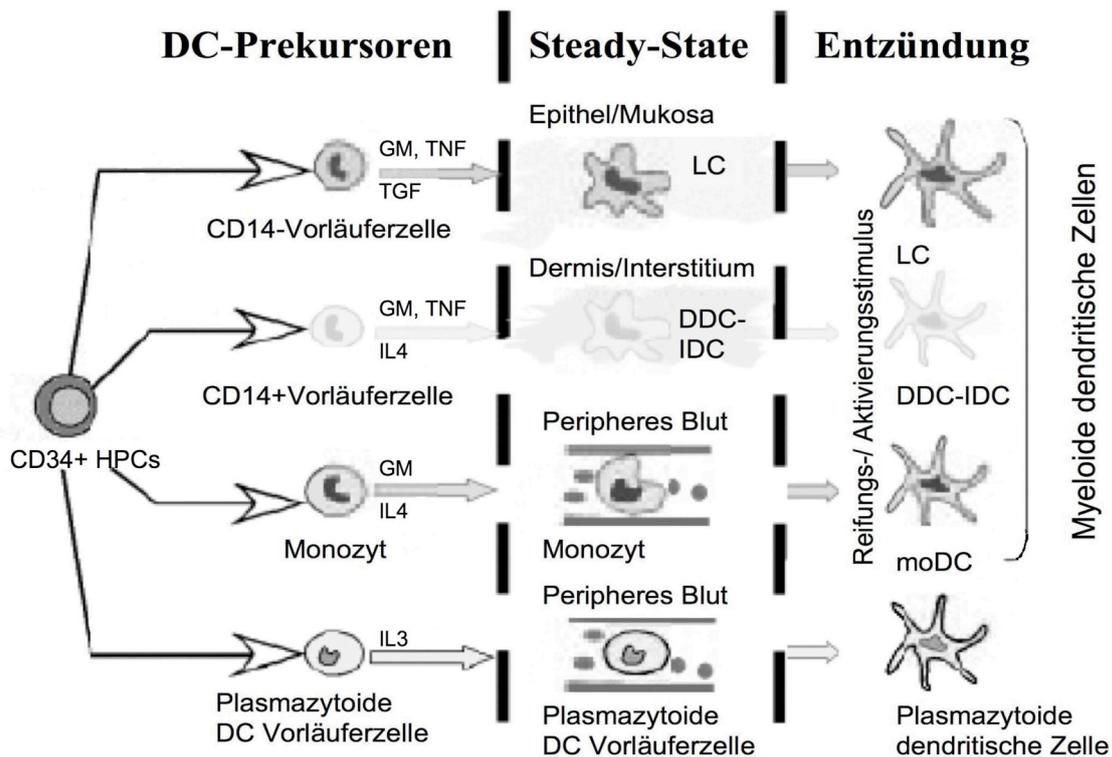


Abb. 3: Entwicklung von Subsets humaner dendritischer Zellen unter Zytokineinfluss *in vitro* (mod. nach M. Rossi et al., 2005), (HPCs, humane Progenitorzellen; LC, Langerhanszelle; DDC-IDC, dermale/interstitielle dendritische Zelle; moDC, Monozyten-abgeleitete DC; GM, GM-CSF; TNF, TNF α ; TGF, TGF β).

In situ befinden sich DC in den meisten peripheren Geweben, vor allem an den Grenzflächen mit der Außenwelt, wo sie 1-2% der Gesamtzellzahl ausmachen, in T- und B-zellreichen Zonen primärer und sekundärer lymphatischer Organe, in mukösen Membranen, im Blut und in der Lymphe. Dort nehmen sie als unreife DC (iDC) mit hoher Phagozytoseaktivität über verschiedene Mechanismen körpereigene und fremde Antigene auf [13], die auf MHC-Klasse-I- und II-Moleküle geladen werden. Unreife DC präsentieren die aufgenommenen Antigene jedoch ineffizient.

Für die Auslösung einer Immunantwort sind zwei Signale in der Interaktion zwischen DC und T-Zellen notwendig. Neben der Erkennung des MHC-Komplexes auf DC durch einen antigenspezifischen T-Zellrezeptor, wird als zweites das sogenannte „Danger Signal“ benötigt. Erst dieses induziert in unreifen DC phänotypische und funktionelle Veränderungen, welche eine Stimulation von T-Zellen ermöglicht.

I.2.2.2 Reifung dendritischer Zellen

Den Prozess der Reifung können *in vivo* viele verschiedene Faktoren auslösen, beeinflussen und regulieren. Dazu gehören pathogenassoziierte Moleküle wie LPS [8], bakterielle DNA und doppelsträngige RNA, die lokale Balance zwischen proinflammatorischen (TNF, IL1, IL6, Prostaglandinen) und antiinflammatorischen Signalen (IL10, TGF β) sowie T-Zell-Signale über CD40-abhängige und unabhängige Wege.

Die Reifung ist ein kontinuierlicher Prozess. Nach Auftreten eines „Danger Signals“ ändert sich die Effizienz der Antigenaufnahme. DC regulieren ihre endozytische Kapazität herab, die Peptidbeladung und die Halbwertszeit von MHC-Komplexen wird erhöht und auch die Expression kostimulatorischer Moleküle auf der Zelloberfläche verstärkt (Abb. 4). Dabei beschränken DC die Antigen-Präsentation auf die Antigene, die während der Reifung aufgenommen wurden und begünstigen so die Stimulation von T-Zellen, die spezifisch für potentiell gefährliche Antigene sind [13].

Daneben erfolgt eine Veränderung der Zellmorphologie mit einem Verlust adhäsiver Strukturen und dem Erreichen hoher Mobilität. Die DC wandern in sekundäre lymphatische Organe und bilden dort als nunmehr reife DC zusammen mit T-Zellen Kluster und aktivieren diejenigen, die spezifisch für das Antigen sind, das am Ort der Entzündung aufgenommen wurde. Bereits eine geringe Anzahl DC reicht aus, um eine starke Immunantwort bzw. klonale Expansion zu generieren [14]. Des Weiteren kommt es zu einer Ausschüttung großer Mengen an Zytokinen, die wiederum Makrophagen, Neutrophile, NK-Zellen und weitere unreife DC rekrutieren.

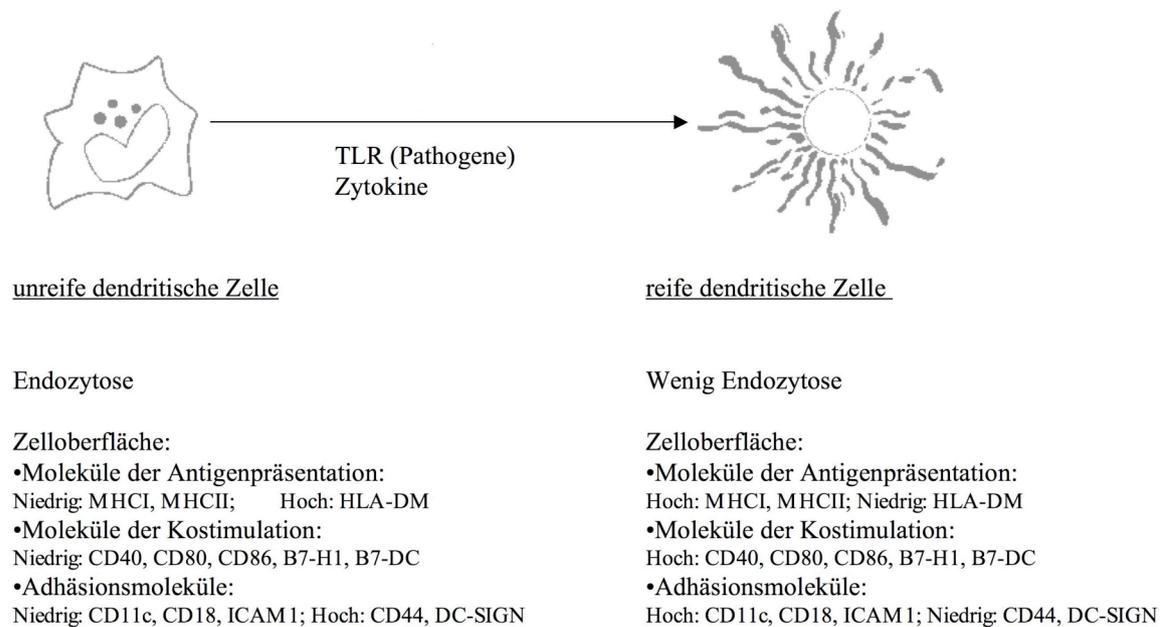


Abb. 4: Unterschiede zwischen reifen und unreifen dendritischen Zellen (mod. nach Banchemer et al., 1998), (TLR, Toll-like Rezeptor).

I.2.2.3 Einfluss dendritischer Zellen auf die Immunantwort

DC vermitteln nicht nur die Information über eine bestehende Infektion, zusätzlich beeinflussen sie ebenfalls das Ergebnis einer Immunantwort [13].

DC-Zellpopulationen produzieren unterschiedliche Zytokine als Antwort auf unterschiedliche Stimuli. Damit geben sie Informationen über die Art des infektiösen Agens weiter [15], auch der Typ der T-Zell-Antwort ist abhängig von dem Aktivierungsstimulus der DC [12]. Neben der Aktivierung von naiven T-Zellen können DC auch direkt sowohl naive als auch Gedächtnis B-Zellen aktivieren. Sie verstärken die Differenzierung aktivierter Gedächtniszellen zu antikörpersezernierenden Zellen und die Differenzierung naiver B-Zellen zu Plasmazellen [16].

Weiterhin spielen DC eine wichtige Rolle in der Antwort des angeborenen Immunsystems durch NK-Zellen und natürliche Killer-T-Zellen (NKT-Zellen). NKT-Zellen stellen eine Subpopulation von T-Zellen dar, die in der frühen Phase der Immunantwort aktiviert werden. Sie weisen sowohl Eigenschaften des angeborenen als auch des erworbenen Immunsystems auf. DC verändern die Funktion von NKT-Zellen [17] und sind die potentesten Stimulatoren der NK-Zell-Proliferation und Zytotoxizität. Weiterhin sind DC essentiell bei der

Toleranzinduktion, nicht nur im Thymus, sondern auch in der Peripherie [18].

Zusammengefasst können dendritische Zellen eine Immunantwort induzieren, erhalten und regulieren, wobei DC die antigenunspezifische und die antigenspezifische Immunantwort verbinden.

I.2.3 T-Lymphozyten

Ein wesentliches Kriterium der erworbenen Immunität ist die spezifische Abwehr von Pathogenen und die Ausbildung von immunologischem Gedächtnis. Diese Eigenschaften werden von T- und B-Lymphozyten vermittelt.

Jeder T-Lymphozyt verfügt über einen spezifischen polymorphen Antigenrezeptor (TZR), der Bruchstücke von Antigenen erkennt, die in Form von kurzen Peptiden an Moleküle des Haupthistokompatibilitätskomplexes (MHC) gebunden sind. Die T-Lymphozyten werden in zwei Gruppen unterteilt: CD8⁺T-Zellen erkennen Antigene die auf MHC-Klasse-I-Molekülen präsentiert werden und besitzen nach der Aktivierung zytotoxische Effektorfunktionen. Dagegen erkennen CD4⁺T-Zellen Peptide, die durch MHC-Klasse-II-Moleküle gebunden werden. Nach einer primären Immunantwort werden die meisten aktivierten Zellen zwar eliminiert; es werden jedoch einige wenige Gedächtniszellen gebildet, die bei einer späteren Auseinandersetzung mit dem gleichen Keim für eine schnellere und effizientere Immunantwort sorgen.

CD4⁺T-Helferzellen können sich als Effektorzellen zu unterschiedlichen Subsets differenzieren, die voneinander verschiedene Zytokine mit verschiedenen Funktionen produzieren. Bei den am besten definierten Subsets handelt es sich um die Th1- und die Th2-Zellen. Die Th1-Zellen sind für die zellvermittelte Immunantwort verantwortlich und produzieren als wichtigstes Zytokin Interferon- γ ; Th2-Zellen stimulieren vor allem die humorale Immunität und produzieren IL4. Die Entwicklung von Th1-Zellen und Th2-Zellen ist kein zufälliger Prozess, sondern wird durch Stimuli reguliert, die auf CD4⁺T-Zellen bei Antigenkontakt einwirken.

Makrophagen und humane monozytäre DC reagieren auf Kontakt mit vielen Bakterien und Viren mit der Produktion von IL12. Dies fördert die Differenzierung von T-Zellen zu Zellen des Th1-Subsets. Unter dem Einfluss von Zytokinen auf DC ist es aber möglich, dass sich die Art der Immunantwort ändert und eine Th2-Antwort bewirkt wird [19] [20].

I.2.4 Antivirale Immunantwort

Alle Viren replizieren sich in infizierten Zellen, da sie keinen eigenen metabolischen oder biosynthetischen Apparat besitzen. In der Zelle ist das Virus für Antikörper nicht erreichbar und kann nur durch Zerstörung oder Modifikation der Zelle eliminiert werden. Diese Aufgabe der Körperabwehr wird von zytotoxischen CD8⁺T-Zellen wahrgenommen. Sie werden von DC und anderen Antigen-Präsentierenden-Zellen spezifisch aktiviert, die entweder endogen produzierte oder von apoptotischen infizierten Zellen phagozytierte (Crosspriming) virale Proteine präsentieren [21]. CD8⁺T-Zellen leiten bei befallenen Zellen die Apoptose ein und verstärken durch Zytokinausschüttung die antivirale Immunantwort.

Die Bestandteile des humoralen und angeborenen Immunsystems tragen zur Kontrolle einer Virusinfektion ebenfalls signifikant bei, indem Antikörper und die Komponenten des Komplementsystems extrazellulär befindliche Viren binden, auf diese Weise markieren und so für andere Bestandteile des Immunsystems erkennbar machen. Essentiell, besonders bei einer Infektion mit Herpesviren, sind weiterhin die Induktion von Zytokinen sowie die Aktivierung von Makrophagen und NK-Zellen [22].

I.3 Virale Evasionsmechanismen

I.3.1 Einleitung

Viele Herpes-Viren, wie etwa das Varizella-Zoster-Virus, das Cytomegalie-Virus und auch das Epstein-Barr-Virus, etablieren eine lebenslange Infektion, besitzen aber im immunkompetenten Organismus nur eine begrenzte Pathogenität. Es handelt sich um einen dynamischen Prozess zwischen Virus und Wirt, in dem das Virus die Fähigkeit zur Koexistenz entwickelt hat und das Immunsystem versucht, der Infektion zu begegnen, ohne dem Wirt Schaden zu zufügen [21].

Um zu existieren, ist es für das Virus notwendig sich fortzupflanzen. Im Verlauf entstehen so Proteine, die für den Körper als fremd erkennbar sind und das Virus für das Immunsystem angreifbar machen. Viren haben vielfältige Strategien entwickelt, um den immunologischen Kontrollmechanismen des Körpers zu entgehen bzw. das Immunsystem so lange zu schwächen, bis das sich das Virus ausreichend repliziert hat, um an neue Wirte weitergegeben werden zu können (virale Immunevasion).

Virale Genprodukte greifen in viele Aspekte des angeborenen, humoralen und zell-

vermittelten Bereichs des Immunsystems ein. Es ist bemerkenswert, dass die verschiedenen Virusfamilien ähnliche immunologische Prinzipien als Angriffspunkte gewählt haben [23]. Man nimmt an, dass im Falle der Herpesviren, die Gene, die für die virale Immunevasion verantwortlich sind, mehr als 50% des Genoms ausmachen [24]. In diesem Rahmen möchte ich mich auf das Epstein-Barr-Virus beschränken und nachfolgend einen Überblick über die Evasionmechanismen geben, die im Zusammenhang mit dieser Arbeit wichtig sind.

I.3.2 Inhibition und Modulation der angeborenen Immunantwort

Zytokine sind sezernierte, sehr potente Polypeptide, die zu den ersten Mediatoren gehören, die in Folge einer Virusinfektion vom Körper produziert werden. Sie induzieren und koordinieren die antivirale Antwort des Immunsystems. Dementsprechend ist eine Beeinträchtigung oder aber auch Abwandlung ihrer Funktion von direktem Nutzen für das Virus. Eine Reihe Zytokine sind von besonderer Bedeutung und ein häufiger Angriffspunkt viraler Evasionsmechanismen. Dazu gehören: IL1, IL12, TNF, Typ-I-Interferone (INF α/β), INF γ und einige Chemokine.

Einen weiteren wichtigen Mechanismus stellt die Sekretion eines viralen IL10-Homolog dar, auf das ich unter IV. genauer eingehen möchte.

I.3.3 Beeinflussung der adaptiven Immunantwort

Auf Seiten der erworbenen Immunität kommt vor allem den virusspezifischen, zytotoxischen T-Zellen eine besondere Bedeutung zu, denen über MHC-Klasse-I-Moleküle auf der Oberfläche virale Peptide präsentiert werden. Die negative Beeinflussung der Expression von Oberflächenmolekülen durch Viren ist ein viel verwendeter Mechanismus und wird auf jeder möglichen Stufe erreicht: Modulation der Transkription, Proteinsynthese, beschleunigter Abbau, intrazelluläre Retention und schnellere Entfernung von der Zelloberfläche [9].

Ein Beispiel dieses Mechanismus für das Epstein-Barr-Virus ist das Protein EBNA-1 (EBV nuclear antigen-1). Es vermittelt einen Eingriff auf der Stufe der Proteolyse. EBNA-1 ist refraktär gegenüber einem Abbau im Proteasom und kann so nicht über MHC-Klasse-I-Moleküle präsentiert werden.

I.3.4 Inhibition der Apoptose

Sich replizierende Viren können zu einer Erkennung durch zytotoxische T-Zellen und natürliche Killerzellen führen oder direkt den programmierten Zelltod der von ihnen infizierten Zellen auslösen. Da ein vorzeitiger Zelltod die Zeit für die Produktion neuer

Virionen begrenzen würde, haben Viren Mechanismen entwickelt, um die zelluläre Kontrolle der Apoptose zu beeinflussen.

Als Beispiel sei das vom Epstein-Barr-Virus kodierte Membranprotein LMP-1 genannt. Es interagiert mit den Apoptose-induzierenden Proteinen TRAF (TNF-R-associated factor) und TRADD (TNF-R-associated death domain) und verhindert so einen über den CD95-Ligand und TNF-Weg vermittelten Zelltod [22]. Des Weiteren kodiert EBV das Protein EBNA-4, das eine Hochregulation von Bcl-2 bewirkt sowie zwei virale Bcl-2 Homologe. Bcl-2 ist ein wichtiges zelluläres Regulationsprotein der Apoptose. Es verändert die Empfänglichkeit für Apoptose-Signale und schützt so vor dem programmierten Zelltod.

I.4. Interleukin-10

I.4.1 Einleitung

Interleukin-10 (IL10) wurde zuerst als „Cytokine Synthesis Inhibitory Factor“ (CSIF) beschrieben, der von murinen Th2-T-Zellen produziert wird und in der Lage ist, die Aktivierung und Zytokinproduktion von Th1-T-Zellen zu inhibieren [25].

Die offenen Leserahmen für IL10 liegen beim Menschen auf Chromosom 1 und kodieren ein sezerniertes Protein mit einem Gewicht von etwa 17-18 kDa. Jeweils zwei Peptide bilden über eine nicht-kovalente Bindung ein Homodimer. IL10 gehört zur Gruppe der Zytokine, die das Zusammenwirken der humoralen und der zellulären Immunantwort regulieren und koordinieren. Es handelt sich um kleine, lösliche Proteine, die ihre biologische Aktivität über eine Bindung an spezifische Rezeptoren entfalten und die das Verhalten oder die Eigenschaften der Zielzelle verändern. Die Mehrzahl von ihnen wird von immunologisch aktiven Zellen gebildet und sezerniert. IL10 reguliert die Expression von mehr als 300 Genen [26].

Exprimiert wird der IL10-Rezeptor von den meisten hämatopoetischen Zellen, allerdings nur in einer Größenordnung von einigen hundert pro Zelle [27]. Er besteht aus zwei Untereinheiten, IL10-R1 und IL10-R2, die zur Familie der Interferon-Rezeptoren gehören. Bei dem IL10-R1 handelt es sich um die Ligand-bindende Untereinheit, die zelluläres IL10 N-terminal mit hoher Affinität bindet. IL10-R2 stellt eine zusätzliche Untereinheit dar, die wenig zur Bindungsaffinität beiträgt, sondern am Signalweg beteiligt ist. Beide Untereinheiten sind jedoch für die Signaltransduktion notwendig. Diese erfolgt vor allem über

das JAK/STAT System [28].

I.4.2 Biologische Aktivität von Interleukin-10

IL10 ist ein pleiotropes Zytokin mit vielfältigen Effekten auf die meisten Zellen myeloiden Ursprungs. Es kann von vielen verschiedenen Zellen auf einen Aktivierungsstimulus hin gebildet werden. Vor allem wird es von Monozyten, T-Zellen, B-Zellen und Mastzellen produziert und erst spät in der Immunantwort sezerniert [29] [30]. Seine Hauptaufgabe scheint die Begrenzung und letztendliche Terminierung einer entzündlichen Immunantwort zu sein [28]. Vor allem durch transkriptionale und posttranskriptionale Mechanismen [26] hemmt es die Produktion der meisten induzierbaren, am Prozess der Entzündung beteiligten Chemokine, Prostaglandine und vieler Zytokine, darunter IL2, INF, TNF und IL4 [31]. IL10 hemmt auf tiefgreifende Weise ein breites Spektrum von Funktionen aktivierter Makrophagen und Monozyten, darunter die Expression von MHC-Klasse-II- und kostimulatorischen Moleküle der B7-Familie wie CD80/CD86 [32].

Neben seinen immunsuppressiven Effekten hat IL10 aber auch Einfluss auf das Wachstum und die Differenzierung von B-Zellen [33], zytotoxischen T-Zellen und T-Helfer-Zellen, Mastzellen und DC [31].

I.4.2.1 Effekt auf dendritische Zellen

IL10 moduliert die Expression von Zytokinen, löslichen Mediatoren und Oberflächenmolekülen von Zellen myeloiden Ursprungs, mit wichtigen Konsequenzen für deren Fähigkeit, eine Immunantwort einzuleiten und aufrecht zu erhalten.

Das Hinzufügen von IL10 während des Aktivierungsschrittes inhibiert die Reifung von DC. Deshalb spielt IL10 eine wichtige Rolle in der Immuntoleranz. DC werden über ihre Fähigkeit naive T-Zellen zu aktivieren und eine Immunantwort einzuleiten definiert. Eine Vorbehandlung mit IL10 bewirkt eine Umwandlung unreifer DC in tolerogene APZ und induziert so Anergie in CD4+-und CD8+T-Zellen [34]. Daneben bewirkt es eine Inhibition von Antigenprozessierung und Präsentation, da es die Steigerung der Proteasenaktivität, die durch Reifungssignale induziert wird, hemmt.

Auf reife DC (mDC) hat IL10 keinen bekannten Effekt.

I.4.2.2 Effekt auf T-Zellen

Die Inhibition der Aktivierung CD4+T-Zellen durch IL10, scheint vor allem über eine Herunterregulierung der Funktion antigen-präsentierender Zellen zustande zu kommen [35].

Jedoch hat IL10 auch direkten Einfluss auf T-Zellen, es inhibiert die Proliferation [36] und die Produktion von IL-5 und IL-2 [37]. Der Effekt auf CD8+T-Zellen ist differenzierter und vom Status der Aktivierung abhängig. Es ergeben sich sowohl stimulierende als auch inhibitorische Effekte [38]. Daneben spielt IL10 eine Schlüsselrolle in der Funktion und Differenzierung von regulatorischen T-Zellen, die eine Rolle in der Kontrolle der Immunantwort und der Toleranz *in vivo* spielen.

I.4.3 Virale Interleukin-10 Homologe

Da für eine große Vielfalt an Viren gezeigt werden konnte, dass sie entweder die IL10-Produktion der Wirtszelle stimulieren, oder aber ein Homolog kodieren, kann man annehmen, dass es sich hierbei um eine wichtige Überlebensstrategie handelt [31]. Bei der Expression eines IL10-Homologs handelt es sich um einen viralen Evasionsmechanismus, den man vor allem bei DNA-Viren findet. IL10-Homologe wurden in den Genomen des Epstein-Barr-Virus (EBV), des Equinen Herpesvirus Typ 2 (EHV2), des Poxvirus Orf [39] und des Cytomegalie-Virus (CMV) [40] gefunden. Die Homologie zum humanen IL10 kann sehr hoch sein. Es ist wahrscheinlich, dass es sich bei den viralen IL10-Genen um übernommene, zelluläre Gene handelt, die vom Wirt „gestohlen“ und im Verlauf den Bedürfnissen des Virus angepasst wurden.

I.4.3.1 Epstein-Barr-Virus Interleukin-10

Das IL10-Homolog des Epstein-Barr-Virus (ebvIL10) wurde 1990 entdeckt und wird vom offenen Leserahmen BCRF-1 (Bam HI fragment C rightward reading frame no. 1) des Virus kodiert [41]. Es handelt es sich um ein nichtglykosiliertes Polypeptid mit einem Gewicht von 17 kDa, das zu 84% mit dem humanen IL10 identisch ist. Ähnlich dem humanen IL10 (hIL10), bilden zwei Polypeptide ein Dimer, das an die IL10R1-Untereinheit des IL10-Rezeptors bindet [42], jedoch mit einer wenigstens 20-fach schwächeren Affinität (Tabelle 2) [43]. Kristallografische Untersuchungen ergaben im Vergleich zu hIL10 Unterschiede in der Konformation vor allem im N-terminalen Bereich [44].

Tabelle 2: Unterschiede zwischen hIL10 und ebvIL10.

| | Humanes IL10 | Epstein-Barr-Virus IL10 |
|-------------------------------|-----------------|----------------------------------|
| Größe | 178 Aminosäuren | 170 Aminosäuren |
| Introns | 4 | 0 |
| Übereinstimmung mit hIL10 [%] | - | 84 |
| Dimerbildung | Dimer | Dimer |
| IL10R1 Rezeptoraffinität | - | 20fach reduziert gegenüber hIL10 |

ebvIL10 wird während der lytischen Phase der Infektion exprimiert und sezerniert [45]. Es ist anzunehmen, dass es sich bei den Zielzellen des Zytokins um B-Zellen, Makrophagen/Monozyten und DC handelt, da diese in diesem Abschnitt des Infektionszyklus des Epstein-Barr-Virus relevant sind.

Bekannt ist, dass ebvIL10 einige der stimulatorischen Effekte des hIL10 auf humane B-Zellen besitzt [33]. Dagegen ist die Fähigkeit die IL2-Produktion aktivierter CD4+T-Zellen zu inhibieren schwächer ausgeprägt als bei hIL10 [43]. Bisher wurde jedoch nicht untersucht welche Wirkung das ebvIL10 auf DC ausübt.

I.5. Zielstellung

Die folgenden Fragen sollten mit der Analyse des Epstein-Barr-Virus Interleukin-10 beantwortet werden:

1. Hat ebvIL10 eine Auswirkung auf den Phänotyp dendritischer Zellen während der LPS-induzierten Reifung?
2. Hat ebvIL10 einen messbaren Einfluss auf die Funktion dendritischer Zellen in Gegenwart eines inflammatorischen Signals?
3. Wie wirkt sich ebvIL10 auf die Apoptoserate dendritischer Zellen während der LPS-induzierten Reifung aus?
4. Wie verhalten sich die Untersuchungsergebnisse für ebvIL10 im Vergleich zu humanem IL10?

II. Material und Methoden

II.1. Material

II.1.1 Antibiotika

| | |
|--------------|---------------------|
| Penicillin | Biochrom KG, Berlin |
| Streptomycin | Biochrom KG, Berlin |

II.1.2 Antikörper

Erstantikörper:

| | |
|---------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------|
| Anti-CD11c (B-ly6) | BD PharMingen, Heidelberg |
| Anti-CD18 (Klon 6.7) | BD PharMingen, Heidelberg |
| Anti-CD40 (Klon lob7/6) | BD PharMingen, Heidelberg |
| Anti-CD54 (Klon HA58) ICAM | BD PharMingen, Heidelberg |
| Anti-CD86 (Klon IT2.2) | BD PharMingen, Heidelberg |
| Anti-DC-SIGN (Klon DCN46) | BD PharMingen, Heidelberg |
| Anti-HLA-DM (Klon MaP.DM1) | BD PharMingen, Heidelberg |
| Isotyp-Matched-Kontroll Antikörper | BD PharMingen, Heidelberg |
| Anti-MHCI (Klon W6/32) | Serotec, Düsseldorf |
| Anti-CD44 (Klon F10-44-2) | Cymbus Biotechnology, Chandlers Ford, United Kingdom |
| Anti-B7-H1 (Klon MIH1) | eBioscience, San Diego, USA |
| Anti-B7DC (Klon MIH18) | eBioscience, San Diego, USA |
| Anti-CD80 (Klon MAB104) | Coulter-Immunotech, Hamburg |
| CyChrome-konjugiertes anti-CD3 | BD PharMingen, Heidelberg |
| FITC-kojugiertes anti-CD69 | BD PharMingen, Heidelberg |
| Polyklonale rabbit Anti-Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) | Chemicon International, Hofheim |
| Zweitantikörper: | |
| Polyklonaler Goat FITC-anti mouse IgG (Fluoreszeinisothiozyanat) | Southern Biotechnology, Birmingham, United Kingdom |
| Polyklonaler Goat PE-anti mouse IgG (Phycoerythrin) | Southern Biotechnology, Birmingham, United Kingdom |

II.1.3 Beads

| | |
|--------------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| Anti-human Goat IgG Dynabeads | Dynal Biotech, Hamburg |
| MACS CD14+ Microbeads, (Antikörpergekoppelte magnetische Beads) | Milteny Biotec, Bergisch Gladbach |

II.1.4 Chemikalien und Enzyme

| | |
|-------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| Aqua dest. | |
| Bovine Serum Albumine (BSA) | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Dimethylsulfoxid (DMSO) | Roth, Karlsruhe |
| Ethylendiamintetraacetat (EDTA) | Merck, Darmstadt |
| Ficoll-Paque, Dichte: 1.077g/l | Amersham Biosciences, Buckinghamshire, United Kingdom |
| Flächendesinfektionsmittel Descosept | Dr. Schumacher, Melsungen |
| Formaldehyd (HCHO) | Fluka AG, Buchs, Schweiz |
| Glutamin | Biochrom KG, Berlin |
| Händedesinfektionsmittel Sterillium | Bode Chemie, Hamburg |
| Imidazol | Merck, Darmstadt |
| Methanol (C ₁ H ₃ OH) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumazid (NaN ₃) | Roth, Karlsruhe |
| Natrimchlorid (NaCl) | Roth, Karlsruhe |
| Natriumhydrogenphosphat (Na ₂ HPO ₄) | Merck, Darmstadt |
| Phenol | Merck, Darmstadt |
| Salzsäure (HCl) | Roth, Karlsruhe |
| Schwefelsäure 1M (H ₂ SO ₄) | Roth, Karlsruhe |
| Streptavidin-Pox | Dianova, Hamburg |
| SuperFasLigand | Alexis Biochemicals, Lausen, Schweiz |
| Tris Buffered Saline (TBS) | Merck, Darmstadt |
| Trisaminomethan | Merck, Darmstadt |
| Tris(Hydroxymethyl)- aminomethanyhydrochlorid (Tris-HCl) | Merck, Darmstadt |
| Trypanblau | Sigma-Aldrich, Deisenhofen |
| Trypsin | Biochrom KG, Berlin |
| Tween 20 | Merck, Darmstadt |

II.1.5 Geräte

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------|--------------------------------------------------|
| Adsorptionsspektrometer | Sunrise Tecan, Langenhagen |
| Biofuge fresco | Heraeus, Hanau |
| Brutschrank IR Autoflow | NuAire, Plymouth, USA |
| Deckgläschen | Superior, Marienfeld |
| Fluoreszenzzytometer FACS-Calibur | BD Biosciences, Heidelberg |
| Kühlschrank: 4°C, -18°C, -70°C, Stickstoff | Liebherr, Biberach an der Riss Heraeus, Hanau |
| MACS Multistand und Magnet | Milteny-Biotec, Bergisch Gladbach |
| Megafuge 1-6 | Heraeus, Hanau |
| Mehrkanalpipette | Eppendorf, Hamburg |
| Membranpumpe | Vacuubrand, Wertheim |
| Minishaker MS1 | IKA, Staufen |
| Mikroskope: Axiovert 40C -Objektive: „A-Plan“ 5x/0,12 Pho CP-“Achromat”10x/0,25 Ph1 | Carl Zeiss, Jena |
| Multifuge 3 s-R | Heraeus, Hanau |
| pH-Meter | BTB, Weilheim |
| Pipetboy | Integra, Biosciences Fernwald |
| Pipetten | Eppendorf, Hamburg |
| Tischzentrifuge Centrifuge5415D | Eppendorf, Hamburg |
| Vortexer Reax 2006 | Heidolph, Schwabach |
| Waage | Sartorius AG, Göttingen |
| Wasserbad A100 | Lauda, Lauda Königshofen |
| Wippe Vibrax VXR | IKA, Staufen |
| Zählkammer Neubauer | Superior, Marienfeld |
| Zellkulturwerkbank | Gelaire Flow Laboratories, Meckenheim |

II.1.6 Kits

| | |
|------------------------|-------------------------|
| IFN γ ELISA Kit | ImmunoTools, Friesoythe |
| IL6 ELISA Kit | ImmunoTools, Friesoythe |
| IL12 ELISA Kit | R&D Systems, Wiesbaden |

II.1.7 Lösungen und Puffer

| | |
|--------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Phosphate Buffered Saline (PBS): | 137 mM NaCl 1.5 mM KH_2PO_4 2.7 mM KCl 4.0 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-H}_2\text{O}$ |
| Annexin-Puffer 10-fach: | 100 mM Hepes pH 7.4 1.4 M NaCl 50 mM CaCl_2 ad 1000 ml Aqua dest. |
| Annexin-Puffer 1-fach: | 100 ml 10-fach Annexin-Puffer 5% FCS 0.02 % NaN_3 ad 1000 ml Aqua dest. |
| Block-Lösung: | 10 ml FCS 90 ml PBS 0,5% Natriumazid |
| FACS Waschpuffer: | 100 ml Block 900 ml PBS |
| MACS Puffer: | 2 ml EDTA (0,2 mM) 2,5 ml FCS (0,5 %) 500 ml PBS (gekühlt, entgast) |
| ELISA Block: | 0,1 g Natriumazid (0,05%) 0,5 g 0,25% BSA 400 μl EDTA (1mM) 100 μl Tween 20 (0,05 %) 200 ml PBS |
| IFN γ ELISA: -Coating-Puffer: | 100 mM Bikarbonat-Puffer, pH 9.6 |
| -Block-Puffer: | PBS 5 % BSA |
| -Wasch-Puffer: | PBS 0.01 % Tween |
| -Dilution-Puffer: | Kulturmedium: iDC-Medium |
| -Streptavidin HRP-Konzentrat | |

-Substrat Lösung: TMB (3,5,3',5'-Tetramethylbenzidin)
-Stop-Solution: 0.2 M H₂SO₄

II.1.8 Plastikwaren

| | |
|------------------------------------------|-------------------------------------|
| Eppendorf Reaktionsgefäße | Eppendorf, Hamburg |
| FACS Röhrchen | Falcon, BD Biosciences, Heidelberg |
| Kryoröhrchen | Biochrom KG, Berlin |
| Küvetten | Eppendorf, Hamburg |
| Lochplatten (12'er, 24'er, 48'er, 96'er) | Falcon, BD Biosciences, Heidelberg |
| MACS LS+ Trennsäule | Milteny Biotec, Bergisch Gladbach |
| Maxisorp-Platte | Nunc, Wiesbaden |
| Parafilm | American National Can, Menasha, USA |
| Pipettenspitzen ohne Filter | Greiner, Kremsmünster, Österreich |
| Serologische Pipetten | Biochrom KG, Berlin |
| Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm) | Greiner, Kremsmünster, Österreich |
| Zentrifugenröhrchen (15 ml, 50 ml) | Nunc, Wiesbaden |

II.1.9 Proteine

AnnexinV FITC BD PharMingen, Heidelberg

II.1.10 Liganden

HCMV-pp65-Peptid, Asn Leu Val Ala Thr Val Pulse
(NLVPMVATV), HLA-A2 Essential
Toll-Like-Rezeptor-Ligand LPS (E.coli) Sigma-Aldrich, Deisenhofen

II.1.11 Zellen

Primärzellen:

- Dendritische Zellen
- T-Zellen
- Monozyten

Zelllinien:

- T-Zelllinie von Nils Rademacher spezifisch für HCMV pp65 Peptid, 12 Tages Zyklus

II.1.12 Zellkulturmedien und Zusätze

| | |
|-----------------------------------------|------------------------------|
| CellGro DC Medium | CellGenix, Freiburg |
| Dulbecco`s Modified Eagle Medium (DMEM) | Biochrom KG, Berlin |
| Roswell Park Memorial Institute (RPMI) | Biochrom KG, Berlin |
| (hitzeinaktiviert, 56°C, 30 min) | |
| Zusätze: EDTA, Konz. 2 mM | Biochrom KG, Berlin |
| Fetales Kälberserum (FCS) | Biochrom KG, Berlin |
| Hepes-Puffer 1M, pH 7.3 | Biochrom KG, Berlin |
| L-L-Glutamin, 200 mM | Biochrom KG, Berlin |
| Penicillin 100.000 Units/ml | Biochrom KG, Berlin |
| Streptomycin 10 mg/ml | Biochrom KG, Berlin |
| F-Medium: | 500 ml DMEM |
| | 50 ml FCS |
| | 6 ml Glutamin |
| | 100 IU/ml Penicillin |
| | 100 µg/ml Streptomycin |
| 2% PB: | 500 ml RPMI 1640 |
| | 10 ml hitzeinaktiviertes FCS |
| 5% PB: | 500 ml RPMI 1640 |
| | 25 ml hitzeinaktiviertes FCS |
| 10% PB: | 500 ml RPMI 1640 |
| | 50 ml hitzeinaktiviertes FCS |
| | 4.5 mM Glutamin |
| | 10 mM Hepes-Puffer |
| | 100 IU/ml Penicillin |
| | 100 µg/ml Streptomycin |
| 5% PB+EDTA: | 500 ml 5% PB |
| | 200 µl EDTA (Konz.: 2mM) |
| CellGro(K): | 500 ml CellGro |
| | 5 ml Glutamin |
| | 100 IU/ml Penicillin |
| | 100 µg/ml Streptomycin |

| | |
|-------------|-------------------------------|
| iDC-Medium: | 1 ml CellGro |
| | ½ µl GMCSF (Konz.: 1000 U/µl) |
| | 3 µl IL4 (Konz.: 70 U/µl) |

II.1.13 Zytokine

| | |
|-----------------------------------|--------------------------|
| IL4 | Relia Tech, Braunschweig |
| IL10 rekombinant (hIL10) | R&D Systems, Wiesbaden |
| Epstein-Barr-Virus IL10 (ebvIL10) | R&D Systems, Wiesbaden |
| GM-CSF | Relia Tech, Braunschweig |

II.2 Methoden

II.2.1 Gewinnung dendritischer Zellen

Ein Buffy Coat wurde auf ein Gesamtvolumen von 150 ml mit 5%PB + EDTA aufgefüllt. Mit jeweils 30 ml davon wurden 20 ml Ficoll in einem 50 ml Röhrchen überschichtet. Alle Reagenzien hatten Zimmertemperatur. Das Röhrchen wurde mit 3200 U/min 30 min bei 30°C ohne Bremse zentrifugiert. Die nach Zentrifugation entstandene Schicht der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMC) wurde vorsichtig isoliert und in ein neues Röhrchen transferiert, das restliche Zellpellet wurde verworfen. Anschließend wurden die gewonnenen PBMC gewaschen. Zuerst mit 5%PB + EDTA, die Zentrifugation erfolgte bei 2500 U/min für 10 min. Der Überstand wurde dekantiert und die PBMC in 5%PB resuspendiert und gewaschen, zentrifugiert wurde bei 2000 U/min 6 min. Der Überstand wurde verworfen und die abzentrifugierten PBMC in MACS (Magnetic assisted cell sorting) Puffer resuspendiert und erneut bei 4°C und 2000 U/min 4 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die PBMC in 1 ml MACS Puffer resuspendiert. Dazu wurden entsprechend der Angabe des Kits 200µl mit einem Anti-CD14 Antikörper gekoppelte magnetische Beads gegeben. Die Inkubationszeit betrug 10 min bei 4° C. Es folgte ein erneuter Waschschrift, indem das Röhrchen mit MACS Puffer aufgefüllt und bei 1800 U/min 4 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen in 3 ml MACS Puffer resuspendiert. Zwischenzeitig wurde die MACS LS+ Trennsäule präpariert. Sie wurde in die Magnetvorrichtung eingespannt und einmal mit 3 ml MACS Puffer vorgewaschen. Darauf folgend wurde die Zellsuspension in die Säule gegeben. Das Eluat wurde in einem gekühlten

Falcon-Gefäß aufgefangen. Dann wurde die Säule dreimal mit 3 ml MACS Puffer gespült. Das Eluat wurde verworfen oder für die Herstellung von T-Zellen verwendet (siehe II.2.4.1). Nachfolgend wurde die Trennsäule aus dem Magneten herausgelöst, mit 3 ml MACS Puffer gefüllt und dieser dann mittels eines Stempels durch die Säule in ein neues 15 ml Röhrchen gedrückt. Die Säule wurde auf gleiche Weise noch einmal nachgespült. In dem Röhrchen befanden sich die CD14⁺ Zellen. Diese wurden abzentrifugiert und zweimal mit PBS gewaschen, die Zentrifugation erfolgte bei 2000 U/min 4 min. Der Überstand wurde jeweils dekantiert und das Pellet weiter verwendet. Nach dem endgültigen Waschgang wurde das Zellpellet in 7 ml iDC-Medium Medium resuspendiert und die Zellen in einer Zellkulturschale bei 37° Celsius inkubiert. Nach 3 Tagen wurde die Hälfte des Mediums durch neues iDC-Medium ersetzt. Insgesamt betrug die Inkubationszeit 6 Tage bis die Zellen sich zu unreifen dendritischen Zellen entwickelt hatten, die daraufhin für die Experimente genutzt werden konnten.

II.2.2 FACS-Analyse

II.2.2.1 FACS-Analyse dendritischer Zellen

Zur Durchführung der FACS-Analysen wurden die präparierten iDC vorsichtig von der Zellkulturschale gespült und bei 2.000 U/min 4 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Zellpellet in einigen Millilitern iDC-Medium resuspendiert. Die gewonnenen iDC wurden in 4 Ansätze mit je 2 ml Medium und 3 Millionen Zellen in eine 24'er Lochplatte aufgeteilt. Zu dreien der Ansätze wurde 1 µg/ml Lipopolysaccharid (LPS) zugefügt, wodurch die Reifung erfolgte. Von diesen 3 Ansätzen wurde einer zusätzlich mit 25 ng/ml rekombinatem humanem Interleukin 10 (hIL10) und ein anderer mit 25 ng/ml Epstein-Barr Interleukin 10 (ebvIL10) versetzt (Abb. 5). Das LPS und das IL10 wurden vor Zugabe zu den entsprechenden Ansätzen gemischt und dann gleichzeitig zu den iDC gegeben. Die Zellen wurden 2 Tage im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Dann wurden die Zellen von der Platte gelöst, indem mit der Pipette mehrmals gespült und die Platte nachfolgend mit FACS Waschpuffer ausgewaschen wurde. Die Zellen wurden je nach Anzahl der gemessenen Oberflächenmoleküle auf FACS Röhrchen aufgeteilt. Dabei wurden pro Ansatz zwischen 50.000-300.000 Zellen verwendet. Nachfolgend wurde jeder Ansatz mit 3,5 ml eiskaltem FACS-Waschpuffer gewaschen und bei 2500 U/min 4 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Pellet in der Restflüssigkeit mittels kurzem Vortexen gelöst. Anschließend wurden die, in eiskalter Blocklösung gelösten,

primären Antikörper in einer Konzentration von 2 µg/ml dazu gegeben. Untersucht wurden die Moleküle der Antigenpräsentation (MHC I, MHC II, HLA-DM), der Kostimulation (CD40, CD80, CD86, B7-H1, B7-DC), der Adhäsion (CD11c, CD18, CD44, ICAM1, DC-SIGN) und der Toleranz (IDO). Als Negativkontrolle diente von jedem Ansatz eine Probe, die mit einem Kontrollantikörper gefärbt wurde. Die Zellen inkubierten 1 Stunde auf Eis und wurden nachfolgend erneut mit 3,5 ml eiskalter FACS-Waschlösung gewaschen und bei 2500 U/min 4 min abzentrifugiert. Das Pellet wurde mittels kurzem Vortexen gelöst und der ebenfalls in eiskalter Blocklösung gelösten PE- bzw. FITC gekoppelten Zweitantikörper in der gleichen Konzentration wie der Erstantikörper dazu gegeben. Der Ansatz inkubierte 1 Stunde auf Eis. Dann erfolgte ein letzter Waschschriff mit FACS-Waschlösung, die Zentrifugation erfolgte bei 2500 U/min, 4 min. Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl/Röhrchen 0.4% Formaldehyd in PBS fixiert. Die Messung erfolgte am FACS Gerät. Die Auswertung wurde mittels der CellQuest Software vorgenommen.

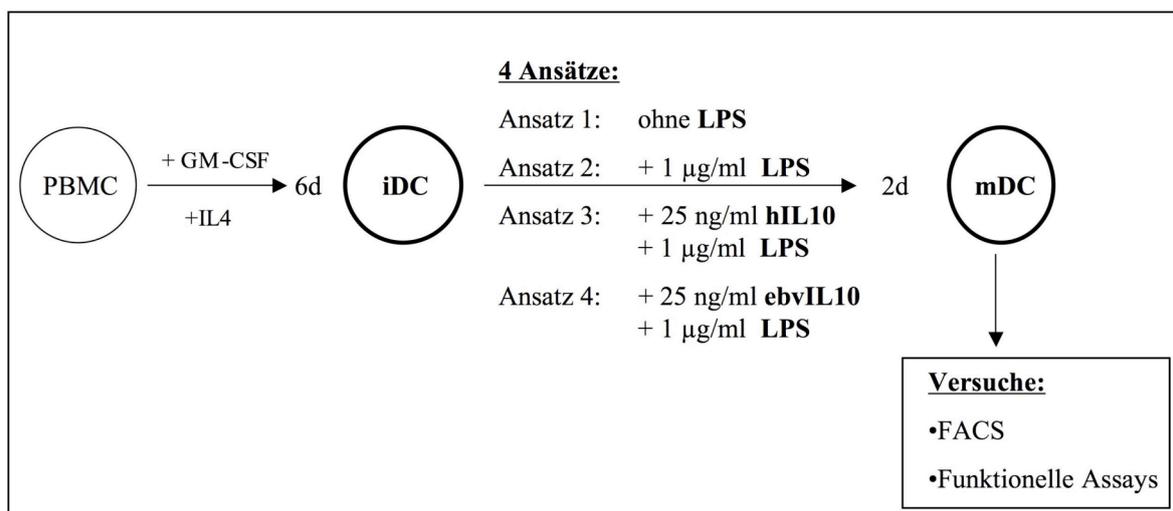


Abb. 5: Versuchsaufbau für die FACS-Analyse dendritischer Zellen. (PBMC, periphere mononukleäre Blutzellen; iDC, unreife dendritische Zellen; mDC, reife dendritische Zellen; GM-CSF, Granulozyten-Monozyten Koloniestimulierender Faktor; LPS, Lipopolysaccharid.)

II.2.2.2 FACS-Analyse reifer dendritischer Zellen

Unreife DC wurden abzentrifugiert und gezählt. Etwa 6 Mio. Zellen wurden in 6 ml iDC-Medium resuspendiert und LPS (1µg/ml) als Reifungsstimulus hinzu gegeben. Die Zellen inkubierten für 2 Tage im Brutschrank. Dann wurden die Zellen abzentrifugiert, in 6 ml iDC-Medium resuspendiert und in 3 Ansätze zu 2 Mio. Zellen auf eine 24'er Lochplatte aufgeteilt. Der erste Ansatz der reifen dendritischen Zellen blieb unbehandelt, zum zweiten wurden 25

ng/ml hIL10 und zum dritten 25 ng/ml ebvIL10 gegeben. Die nachfolgende Inkubationzeit betrug 2 Tage. Es folgte die FACS Färbung und Analyse (siehe II.2.2.1). Untersucht wurden die Oberflächenmoleküle MHC I und DC-SIGN (Abb. 6).

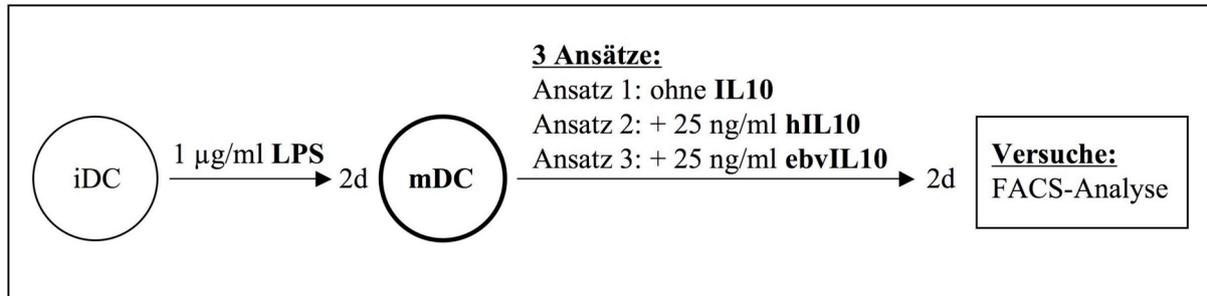


Abb. 6: Versuchsaufbau für die FACS-Analyse reifer dendritischer Zellen. (PBMC, periphere mononukleäre Blutzellen; iDC, unreife dendritische Zellen; mDC, reife dendritische Zellen; GM-CSF, Granulozyten-Monozyten Koloniestimulierender Faktor; LPS, Lipopolysaccharid.)

II.2.2.3 FACS-Analyse unreifer dendritischer Zellen

Unreife DC wurden abzentrifugiert und gezählt. Etwa 6 Mio. Zellen wurden in 6 ml iDC-Medium resuspendiert und auf 3 Ansätze zu 2 Mio. Zellen auf eine 24'er Lochplatte aufgeteilt. Zum ersten Ansatz wurde nichts hinzu gegeben, zum zweiten 25 ng/ml hIL10 und zum dritten 25 ng/ml ebvIL10. Die Zellen inkubierten für 2 Tage im Brutschrank, dann erfolgte die FACS Färbung und Analyse (siehe II.2.2.1). Untersucht wurden die Oberflächenmoleküle MHC I, CD86, ICAM1 und DC-SIGN (Abb. 7).

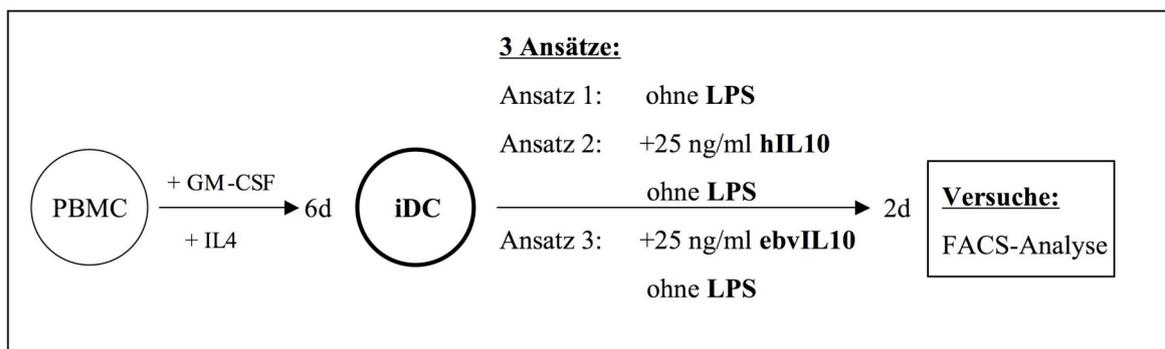


Abb. 7: Versuchsaufbau für die FACS-Analyse unreifer dendritischer Zellen. (PBMC, periphere mononukleäre Blutzellen; iDC, unreife dendritische Zellen; GM-CSF, Granulozyten-Monozyten Koloniestimulierender Faktor.)

II.2.2.4 Verdünnungsreihen mit unterschiedlichen Konzentrationen von ebvIL10

Für die Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen von ebvIL10 wurde der Versuchsaufbau analog II.2.2.1 verwendet. Neben der von uns üblicherweise verwendeten Konzentration von 25 ng/ml ebvIL10 wurden weitere Konzentrationen von ebvIL10 und hIL10 untersucht. Für die beiden Oberflächenmoleküle ICAM1 und DC-SIGN wurden Verdünnungsreihen von 0.001 ng/ml, 0.01 ng/ml, 0.1 ng/ml, 1 ng/ml, 10 ng/ml und 25 ng/ml ebvIL10 und hIL10 angefertigt. Für DC-SIGN wurden ebenfalls hohe Konzentrationen von ebvIL10 untersucht. Dafür wurden neben den Ansätzen analog zu II.2.2.1 die Konzentrationen 25 ng/ml, 50 ng/ml, 100 ng/ml und 200 ng/ml verwendet.

II.2.3 Apoptoseassay

Für das Apoptoseassay wurden iDC (siehe II.2.1) verwendet. Diese wurden zu 200.000/Wanne in 200µl iDC-Medium auf einer 96'er Platte in Ansätzen entsprechend Tabelle 3 stimuliert.

Tabelle 3: Versuchsaufbau Apoptoseassay

| | | | | |
|---------|-------------------------|------------------------|----------------------------------------------|------------------------------------------------|
| Reihe 1 | iDC - LPS - hIL10 | iDC + LPS (1 µg/ml) | iDC + LPS (1 µg/ml) + hIL10 (25 ng/ml) | iDC + LPS (1 µg/ml) + ebvIL10 (25 ng/ml) |
| Reihe 2 | iDC - LPS - hIL10 | iDC + LPS (1 µg/ml) | iDC + LPS (1 µg/ml) + hIL10 (25 ng/ml) | iDC + LPS (1 µg/ml) + ebvIL10 (25 ng/ml) |

Nach einem Tag wurde in Reihe 1 in jede Wanne 1 µg/ml SuperFasLigand gegeben, Reihe 2 blieb unbehandelt. Einen weiteren Tag später erfolgte eine AnnexinV-FITC Färbung. Dazu wurden die Zellen aus den Wannen gelöst, einmal mit Annexin-Waschpuffer gewaschen, bei 2500 U/min 4 min abzentrifugiert und dekantiert. Nachfolgend wurde Annexin in einer Konzentration von 2 µg/ml dazu gegeben. Nach einer Inkubationszeit von 2 Stunden wurden die Proben zweimal mit dem Annexin-Waschpuffer gewaschen (Zentrifugation bei 2500 U/min, 4 min) und dann mit 200 µl/Probe 0.4% Formaldehyd in PBS fixiert. Später wurden die Proben am Fluoreszenzzytometer gemessen und mittels CellQuest-Software ausgewertet.

II.2.4 Funktionelle Assays

II.2.4.1 Isolation von T-Zellen

Für die Isolation von T-Zellen wurde das CD14-negative Eluat der Buffy Coat Aufbereitung (siehe II.2.1) verwendet. Dieses wurde bei 2.000 U/min 4 min zentrifugiert, der Überstand verworfen und das gewonnene Zellpellet mit 5% PB+EDTA erneut gewaschen. Zur Entfernung von B-Zellen und Antigen-Präsentierenden-Zellen wurden gegen IgG gerichtete magnetische Dynabeads (Goat Anti-Human IgG) zu den Zellen gegeben.

Diese Beads mussten zuvor gereinigt werden, indem 1 ml der Beads mit 10 ml PBS gemischt und dann für 4 min in eine magnetische Separationseinheit gestellt wurden. Nachfolgend wurde das PBS vorsichtig, das Falcongefäß in der Separationseinheit belassend, dekantiert.

Die so gereinigten Beads wurden dann mit den Zellen in 5%PB+EDTA für etwa 30 min bei 4° C inkubiert, wobei das Falcongefäß zwischenzeitig immer wieder geschwenkt wurde. Dann wurde das Falcongefäß in die magnetische Separationseinheit auf Eis gestellt. Nach einigen Minuten konnten die freien, nicht magnetisch gebundenen Zellen abpipettiert und in ein neues Gefäß gegeben werden, welches ebenfalls in die Separationseinheit gestellt wurde. Insgesamt wurde der Vorgang viermal wiederholt. Danach wurden die freien Zellen in ein neues Falcongefäß überführt und bei 2.000 U/min für 4 min zentrifugiert. Es folgten zwei weitere Waschschrte mit PBS und 2%PB (Zentrifugation bei 2.000U/min, 4 min). Darauf folgend wurden die T-Zellen in PB 10 % resuspendiert und standen für Experimente zur Verfügung.

II.2.4.2 Dendritische Zellen und T-Zell-Assay

Verwendet wurden allogene DC, die in den bereits bekannten Ansätzen (siehe II.2.2.1) aus iDC gereift waren. Die DC wurden viermal mit PBS gewaschen und dann mit den allogenen T-Zellen in 10% PB Medium gemischt. Das Verhältnis betrug 1:100 (DC:T-Zellen) und wurde in einer 24'er Lochplatte entsprechend Tabelle 4 zusammen pipettiert. Als Positivkontrolle wurde zu einem Ansatz PHA (1 µg/ml) gegeben, als Negativkontrolle diente ein Ansatz mit ausschließlich T-Zellen.

Tabelle 4: Versuchsaufbau T-Zell-Assay

| | | | | | |
|------------------|----------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| T-Zellen +PHA | T-Zellen | T-Zellen + iDC (aus Ansatz: -LPS) | T-Zellen + iDC (aus Ansatz: +LPS) | T-Zellen + iDC (aus Ansatz: + 1 µg/ml LPS + 25ng/ml hIL10) | T-Zellen + iDC (aus Ansatz: + 1 µg/ml LPS + 25ng/ml ebvIL10) |
|------------------|----------|-----------------------------------------|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------|

Die Inkubationszeit betrug 5 Tage. Dann wurden die Zellen vorsichtig geerntet und mit eiskalter FACS-Waschlösung gewaschen (Zentrifugation bei 2.500U/min, 4 min). Daraufhin folgte eine Doppelfärbung mit CyChrome-konjugierten Anti-CD3- und FITC-markierten Anti-CD69-Antikörpern. Die Inkubationszeit betrug 1 Stunde auf Eis. Es folgte ein erneuter Waschschrift mit eiskalter FACS-Waschlösung (Zentrifugation bei 2.500 U/min, 4 min). Anschließend wurden die Zellen mit 200 µl/Röhrchen 0.4% Formaldehyd in PBS fixiert. Die Messung erfolgte am FACS Gerät. Die Auswertung erfolgte mittels der CellQuest Software.

II.2.4.3 Dendritische Zellen und PBMC-Assay

PBMC wurden entsprechend II.2.1 gewonnen. iDC wurden vorsichtig von der Zellkulturschale gespült und gezählt. Die Zellen wurden bei 2.000 U/min 4 min abzentrifugiert und das gewonnene Zellpellet in einigen Millilitern iDC-Medium resuspendiert. Die iDC wurden mit den PBMC im Verhältnis 25:1 (1,5 Mio. PBMC: 60.000 iDC) auf einer 24'er Platte gemischt. Die Vertiefungen wurden auf ein Gesamtvolumen von 2 ml mit iDC-Medium aufgefüllt. Nachfolgend wurden zeitgleich der Reifungsstimulus LPS und hIL10 oder ebvIL10 in unterschiedlichen Mengen in die entsprechenden Ansätze dazu gegeben (Tabelle 5). Die Platte wurde in den Brutschrank verbracht. Nach einer Inkubationszeit von 5 Tagen wurden die Zellen entnommen, mit einer Doppelfärbung mit einem PE-konjugierten-anti-CD69/FITC-gekoppelten-anti-CD3 Antikörper gefärbt und mittels FACS-Analyse gemessen (Methode FACS-Färbung siehe II.2.2.1).

Tabelle 5: Versuchsaufbau PBMC und DC-Assay

| | | | | |
|------|---------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|
| PBMC | PBMC + iDC | PBMC + iDC + LPS (1 µg/ml) | PBMC + iDC + LPS (1 µg/ml) + hIL10 (25 ng/ml) | PBMC + iDC + LPS (1 µg/ml) + ebvIL10 (25 ng/ml) |
|------|---------------|----------------------------------|--------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------|

II.2.4.4 HLA-A2 spezifische Antigenpräsentation durch dendritische Zellen

iDC wurden gezählt und in ein Eppendorfgefäß überführt. Die Zellen wurden zweimal mit PBS gewaschen, bei 4.800 U/min 4 min abzentrifugiert und nachfolgend in 10% PB resuspendiert. Die DC wurden zu 20.000/Vertiefung auf eine 96`er Rundbogenplatte aufgeteilt. Es erfolgte die zeitgleiche Zugabe von LPS und IL10 entsprechend Tabelle 6. Nachfolgend wurde der Ligand (HCMV-pp65-Peptid; Sequenz: Asn Leu Val Ala Thr Val Pulse) in einer Konzentration von 300 ng/ Probe in 50 µl 10% PB dazu gegeben. Nun erfolgte die Zugabe von allogenen HLA-A2 gematchten HCMV-reaktiven-T-Zellen einer T-Zell-Linie von N. Rademacher (Klinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Charité Berlin), die zuvor dreimal mit PBS gewaschen und abzentrifugiert worden waren.

Die Gesamtzellzahl betrug 200.000/Vertiefung in einem Verhältnis von 20.000 DC zu 180.000 T-Zellen (Tabelle 6). Abschließend wurde alle Vertiefungen auf ein Gesamtvolumen von 300 µl aufgefüllt und in den Brutschrank verbracht. Nach 3 Tagen wurde der Überstand abgenommen und die Konzentration von IFN γ mittels ELISA gemessen (siehe II.2.5.1).

Tabelle 6: Versuchsaufbau HLA-A2 spezifische Antigenpräsentation durch DC

| | | |
|---------------------------------------|-----------------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------|
| iDC | iDC + T-Zellen | iDC + T-Zellen + Ligand |
| iDC + LPS | iDC + T-Zellen + LPS | iDC + T-Zellen + LPS + Ligand |
| iDC + LPS + hIL10 (25 ng/ml) | iDC + T-Zellen + LPS + hIL10 (25 ng/ml) | iDC + T-Zellen + LPS + hIL10 (25 ng/ml) + Ligand |
| iDC + LPS + ebvIL10 (25 ng/ml) | iDC + T-Zellen + LPS + ebvIL10 (25 ng/ml) | iDC + T-Zellen + LPS + ebvIL10 (25 ng/ml) + Ligand |
| iDC + LPS + ebvIL10 (250 ng/ml) | iDC + T-Zellen + LPS + ebvIL10 (250 ng/ml) | iDC + T-Zellen + LPS + ebvIL10 (250 ng/ml) + Ligand |
| iDC + LPS + ebvIL10 (1 µg/ml) | iDC + T-Zellen + LPS + ebvIL10 (1 µg/ml) | iDC + T-Zellen + LPS + ebvIL10 (1 µg/ml) + Ligand |

II.2.5 ELISA

II.2.5.1 IFN γ -ELISA

Für die Beschichtung der ELISA-Platte wurde der entsprechende Antikörper des Kits mit dem Puffer (100 mM Bikarbonat Puffer, pH 9.6) 1:100 verdünnt. Von dieser Lösung wurden 100 μ l in jede Vertiefung einer NUNC MAXISORP Platte gegeben und über Nacht bei 2 - 8° C inkubiert. Am folgenden Tag wurde die Mikrotiter-Platte fünfmal mit PBS gewaschen und trocken geklopft. Dann wurde in jede Vertiefung 200 μ l Block-Puffer gegeben, die Platte abgedeckt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert. Nachfolgend wurde die Platte fünfmal mit ELISA-Waschpuffer gewaschen.

Nun wurde der Standard angefertigt. Dazu wurde nach Anweisung des Kits 500 μ l destilliertes Wasser zum Standard gegeben und 5 min zum Lösen des Pulvers belassen. Nachfolgend wurde eine Verdünnungsreihe mit DC-Medium erstellt. Die erste Konzentration des Standards entsprach 1:4000 und wurde in Zweierschritten bis 1:64.000 verdünnt. Der letzte und damit sechste Wert entsprach dem Leerwert.

Von dem Ansatz (siehe II.2.4.4) der DC wurden nach 2 Tagen Inkubation 50 μ l von dem Überstand entnommen, in 0,5 ml Eppendorf-Gefäße pipettiert und 6 min bei 6.800 U/min zentrifugiert. Von den Proben und den verschiedenen Ansätzen des Standards wurden je 50 μ l in die entsprechenden Vertiefungen gegeben. Die Wannchen wurden abgeklebt und die ELISA-Platte inkubiert 1 Stunde bei Raumtemperatur. In einem erneuten Waschschriff wurde die Platte fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und ausgeklopft. Nun wurde der biotinylierte Zweitantikörper des Kits 1:100 verdünnt und 100 μ l in jede Vertiefung gegeben. Die Platte wurde erneut abgeklebt und inkubiert für eine weitere Stunde bei Raumtemperatur. Die ELISA-Platte wurde dann mit Waschpuffer fünfmal gewaschen. Dann erfolgte die Inkubation mit dem Streptavidin-HRP-Konjugat S/POX (Streptavidin Peroxidase). Dieses wurde 1:2000 in DC-Medium verdünnt und 100 μ l in jede Vertiefung gegeben. Erneut wurde die Platte abgeklebt und inkubiert für weitere 30 min bei Raumtemperatur. Nach einem weiteren Waschschriff, in dem die Platte fünfmal mit Waschpuffer gewaschen wurde, folgte die Zugabe von 100 μ l des Substrats, TMB Substrat Solution. Die Inkubation erfolgte im Dunkeln für 30 min bis ein blauer Farbumschlag zu sehen war. Daraufhin wurde in jede Wanne 100 μ l Stop Solution (0.2 M H₂SO₄) gegeben und die Absorption innerhalb von 30 min im Absorptionsspektrometer bei 550-620 nm gemessen.

II.2.5.2 IL6 ELISA

Der IL6 ELISA wurde analog zu 2.9.1 entsprechend des für den Kit etablierten Verfahrens durchgeführt. Untersucht wurde der Überstand DC von dem Ansatz II.2.2.1. Nach 2 Tagen Inkubation wurden von dem Überstand 50 µl entnommen und analysiert. Gemessen wurde die Absorption bei 550-620 nm.

II.2.5.3 IL12 ELISA

Der IL12 ELISA wurde analog zu 2.9.1 entsprechend des für den Kit etablierten Verfahrens durchgeführt. Untersucht wurde der Überstand DC von dem Ansatz 2.2.1. Nach 2 Tagen Inkubation wurde von dem Ansatz 50 µl des Überstands entnommen und analysiert. Gemessen wurde die Absorption bei 550-620 nm.

II.2.6 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Einzufrierende Zellen wurden in PB-Medium gewaschen, in Einfriermedium (90% F-Medium, 10% DMSO) resuspendiert und in Kryoröhrchen sofort bei -70°C eingefroren. DMSO diffundiert in die Zellen, wo es die Zerstörung der Zellmembran durch die rasche Kristallbildung beim Einfrieren verhindert. Nach 5 Tagen wurden die Zellen zur längerfristigen Aufbewahrung in flüssigen Stickstoff transferiert.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut, in F-Medium aufgenommen, bei 2000 U/min 4 min zentrifugiert und anschließend in dem entsprechenden Medium resuspendiert.

II.2.7 Statistische Methoden

Für die Auswertung der Daten wurde der gepaarte Student's t-Test verwendet. Analysiert wurden die Unterschiede zwischen unreifen DC, die mit LPS behandelt wurden in Gegenwart oder Abwesenheit von IL10, sowie zwischen mit hIL10 und ebvIL10 behandelten DC.

Die mittels Durchflußzytometer erhobenen Daten wurden mit der CellQuest Software ausgewertet und konnten in einem Dotplot oder Histogramm dargestellt werden.

Als signifikant wurden p-Werte kleiner als 0,05 betrachtet.

Für die statistische Analyse wurde die Graph Pad Prism 3.0 Software verwendet.