

III.1.3 Effekt von ebvIL10 auf unreife dendritische Zellen

Wir untersuchten, ob ein Einfluss von ebvIL10 und hIL10 auf unreife DC besteht. Wir untersuchten dafür die Oberflächenmoleküle MHC I, CD86, ICAM1 und DC-SIGN. Wir konnten nachweisen, dass weder ebvIL10 noch hIL10 einen statistisch signifikanten Einfluss auf die untersuchten Oberflächenmoleküle hatte (Abb. 18).

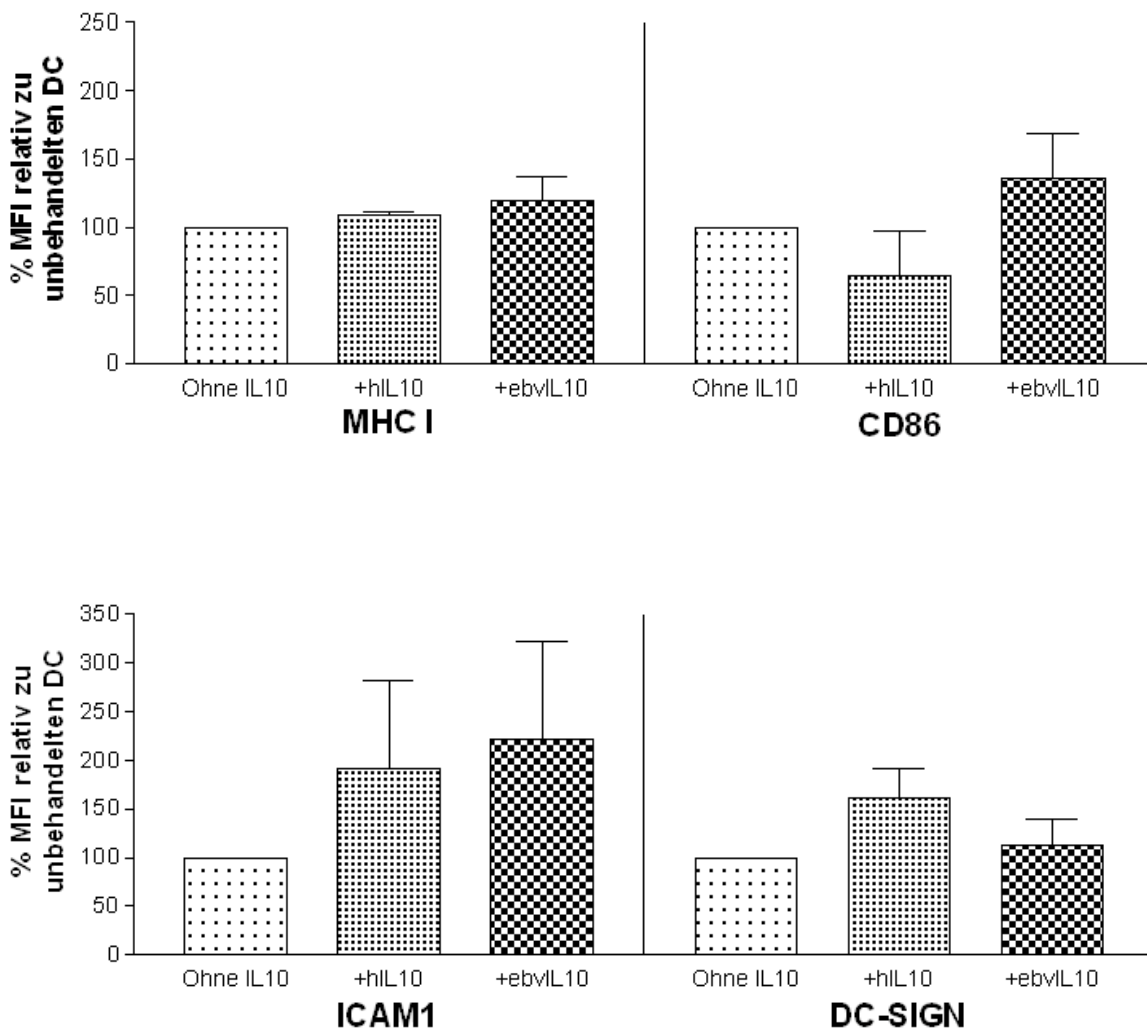


Abb. 18: Einfluss von ebvIL10 und hIL10 auf die Expression von MHC I, CD86, ICAM1 und DC-SIGN auf unreifen dendritischen Zellen.

iDC wurden für zwei Tage mit 25 ng/ml IL10 (hIL10 oder ebvIL10) behandelt oder ohne Zytokin belassen. Die Expression der Moleküle wurde nach zwei Tagen mittels FACS-Analyse bestimmt. Die MFI unbehandelter iDC wurde als 100% gesetzt. Der relative Prozentsatz der MFI ist auf der y-Achse als Mean +/- SEM aufgetragen. Die Ergebnisse repräsentieren drei oder mehr Experimente (für ICAM1 zwei Experimente) mit DC unterschiedlicher Spender.

III.2 Einfluss von ebvIL10 auf reifungsassoziierte Veränderungen der Funktion dendritischer Zellen

III.2.1 Modulation der Produktion von IL6 und IL12 durch ebvIL10

Wir untersuchten den Effekt von ebvIL10 und hIL10 auf die Produktion der wichtigen Zytokine IL6 und IL12.

Auf die Sekretion von IL6 bestand kein signifikanter Einfluss von ebvIL10 und hIL10 (Abb. 19). Es zeigte sich, dass ebvIL10 wenig Einfluss auf die Produktion zellulären IL12s hatte, während hIL10 diese supprimierte (Abb. 20).

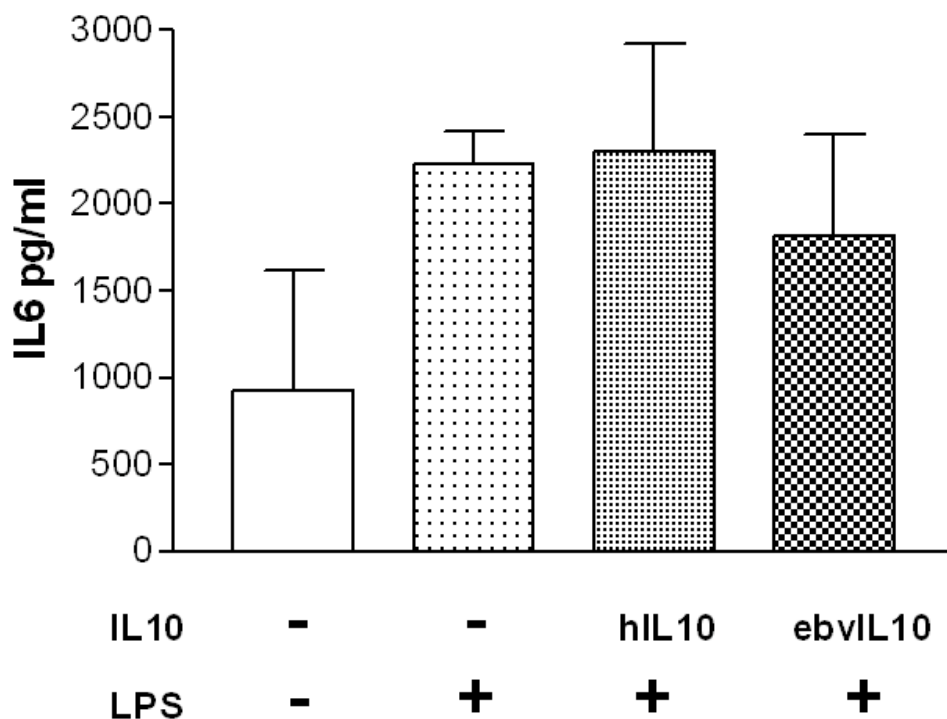


Abb. 19: Modulation der Produktion von IL6 durch IL10.

Der Überstand von DC wurde gesammelt. Diese waren zuvor zwei Tage mit 1 µg/ml LPS und in Abwesenheit oder Anwesenheit von 25 ng/ml IL10 (hIL10 oder ebvIL10) behandelt worden. Die Menge an IL6 im Überstand wurde mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mean +/- SEM angegeben und ergeben sich aus drei Experimenten mit DC unterschiedlicher Spender.

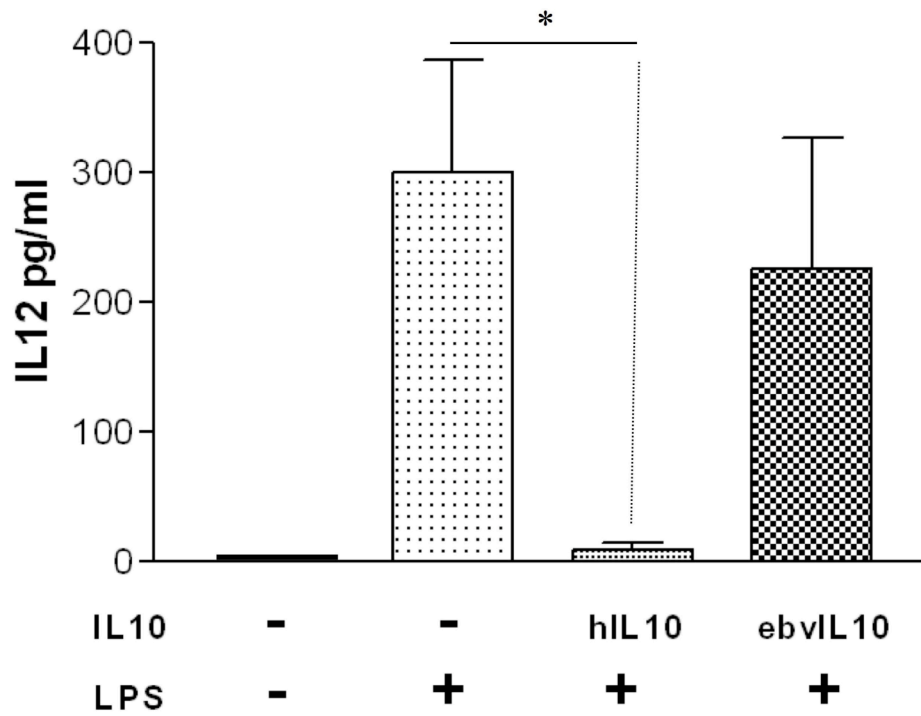


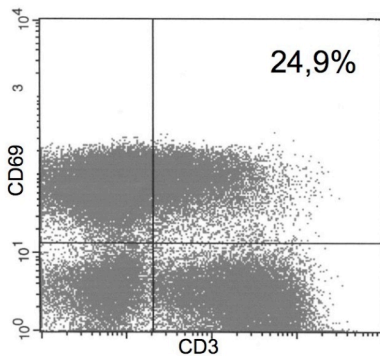
Abb. 20: Modulation der Produktion dendritischer Zellen von IL12 durch IL10.

Der Überstand von DC wurde gesammelt. Diese waren zuvor zwei Tage mit 1 µg/ml LPS und in Abwesenheit oder Anwesenheit von 25 ng/ml IL10 (hIL10 oder ebvIL10) behandelt worden. Daraus wurde die Menge an aktivem IL12 mittels ELISA bestimmt. Die Ergebnisse sind als Mean +/- SEM angegeben und ergeben sich aus drei Experimenten mit DC unterschiedlicher Spender.

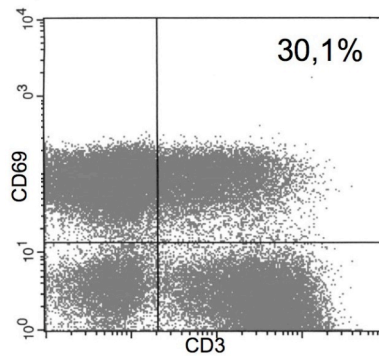
III.2.2 Beeinflussung der stimulatorischen Kapazität von DC durch ebvIL10

Wir untersuchten den Einfluss von ebvIL10 und hIL10 auf die Fähigkeit von DC, allogene T-Zellen zu aktivieren. Die FACS-Analyse des Aktivierungsmarker CD69 auf CD3+Zellen zeigte, dass allogene DC, die vorher mit LPS und hIL10 behandelt worden waren, nicht die volle stimulatorische Kapazität erreichten. ebvIL10 zeigte in diesem Versuch ähnliche Wirksamkeit (Abb. 21).

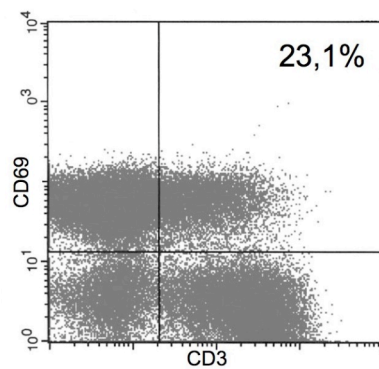
PBMC +
unbehandelte DC



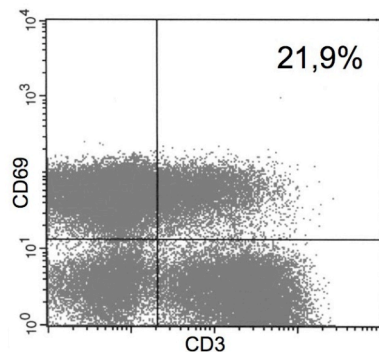
PBMC +
LPS-behandelte DC



Kein IL10



hIL10



ebvIL10

Abb. 21: Beeinflussung des Aktivierungsmarkers CD69 auf CD3+T-Zellen durch Störung der reifungsassoziierten Änderungen der Funktion dendritischer Zellen durch IL10.

iDC wurden für zwei Tage mit 1 µg/ml LPS und 25 ng/ml IL10 (hIL10 oder ebvIL10) behandelt oder ohne Zytokin belassen (Nur LPS). Die so behandelten DC wurden mit allogenen PBMC für 5 Tage inkubiert. Danach wurde auf aktivierten T-Zellen CD3 und CD69 angefärbt und mittels FACS-Analyse gemessen. In der rechten oberen Ecke ist die Prozentzahl der aktivierten T-Zellen angegeben.

III.2.3 Effekt von ebvIL10 auf die Fähigkeit dendritischer Zellen, die Interferon γ Produktion von T-Zellen zu stimulieren

Wir untersuchten den Einfluss von ebvIL10 auf die Fähigkeit von DC, die IFN γ -Produktion durch T-Zellen zu stimulieren. Dabei verwendeten wir verschiedene Mengen ebvIL10 (25 ng/ml, 250 ng/ml, 1000 ng/ml). Wir konnten zeigen, dass ebvIL10 auch bei niedrigen Mengen möglicherweise genauso effizient ist wie hIL10 (Abb. 22).

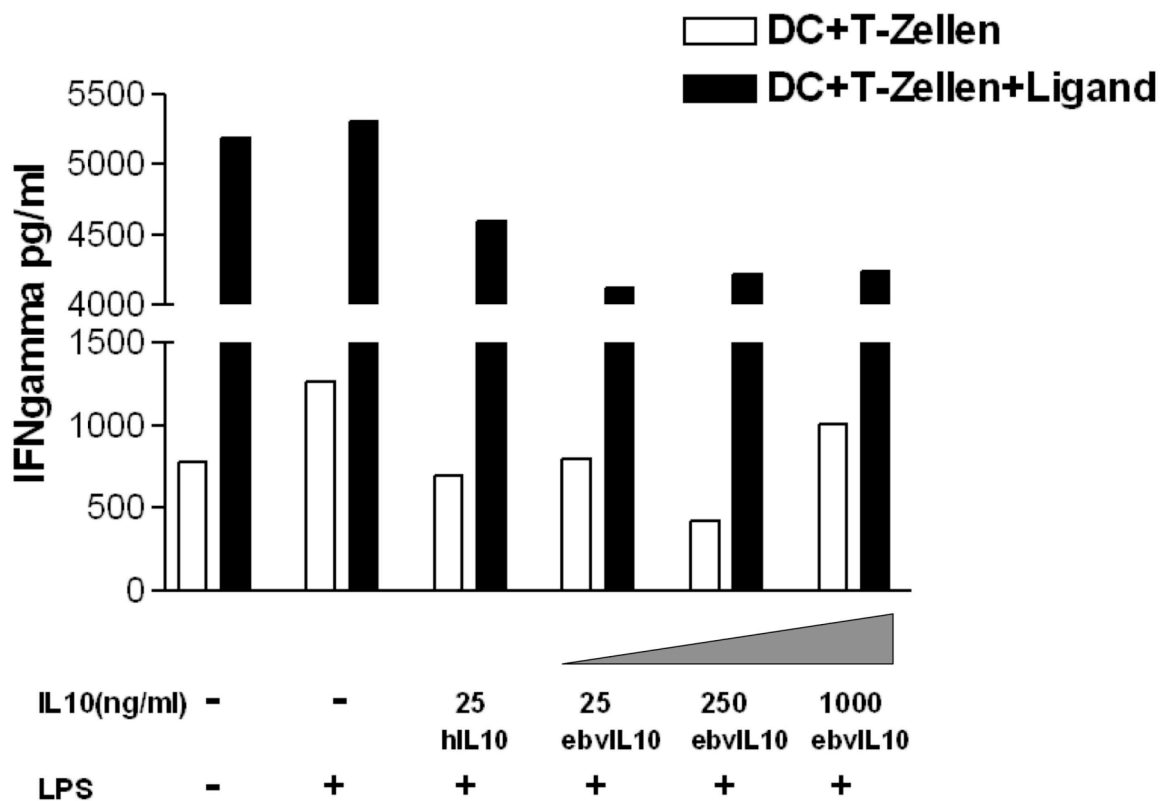


Abb. 22: Modulation der Produktion von IFN γ durch ebvIL10.

iDC und allogene T-Zellen, die beide HLA-A2 positiv waren, einer T-Zelllinie, die für den Liganden spezifisch waren, wurden, wie in der Grafik beschrieben, mit oder ohne LPS, sowie verschiedenen Konzentrationen IL10 (hIL10 oder ebvIL10) inkubiert. Zu der einen Hälfte des Ansatzes wurden kein (weiße Säulen), zur anderen 300 ng HCMV-pp65-Peptid-Ligand (schwarze Säulen) gegeben. Nach drei Tagen wurde der Überstand gesammelt und die Menge an IFN γ mittels ELISA bestimmt. Das Ergebnis ergibt sich aus einem Experiment.

III.2.4 Wirkung von ebvIL10 auf die Fähigkeit von DC, T-Zellen zu aktivieren

Wir untersuchten den Einfluss von ebvIL10 und hIL10 auf die Fähigkeit von DC, T-Zellen zu aktivieren. Die FACS-Analyse des Aktivierungsmarker CD69 auf T-Zellen zeigte, dass allogene DC, die mit LPS und hIL10 behandelt worden waren, nicht die volle stimulatorische Kapazität erreichten, ebvIL10 wies einen schwächeren Effekt auf (Abb. 23).

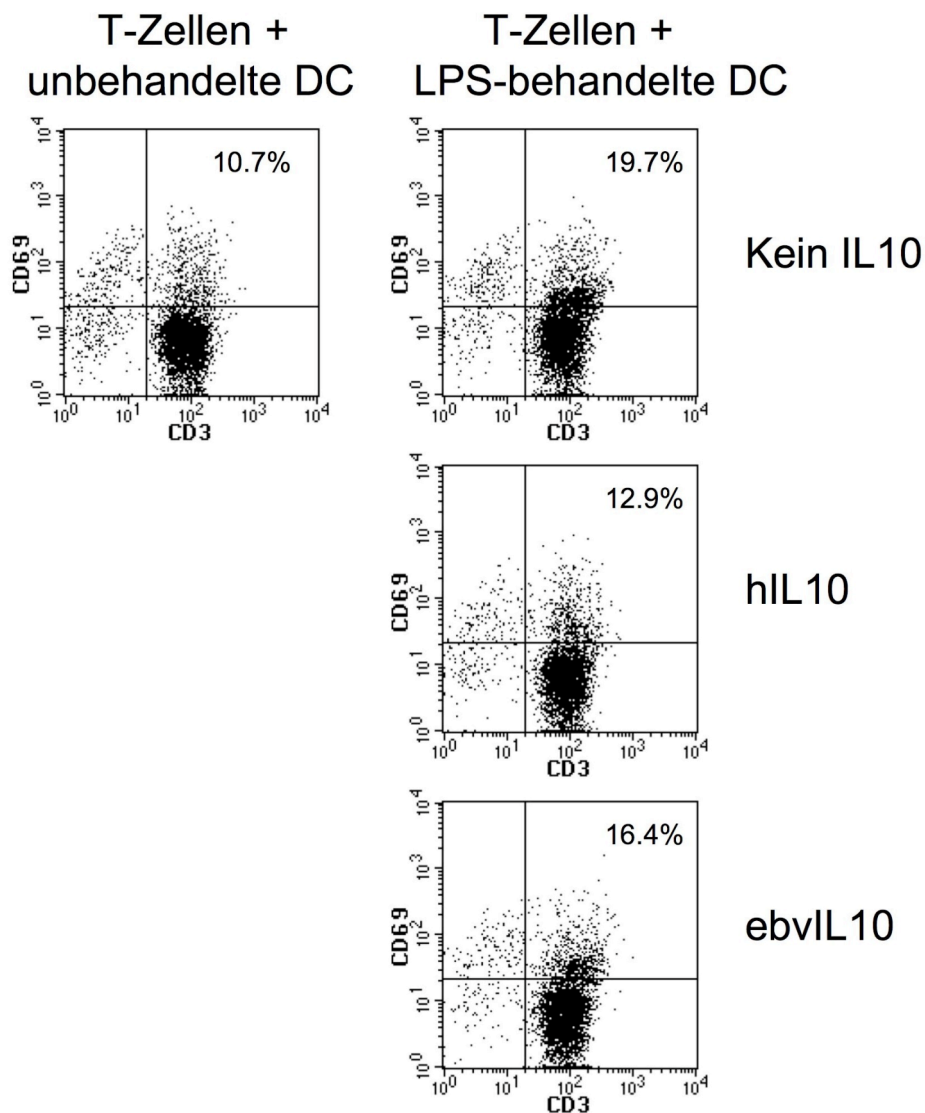


Abb. 23: Störung der T-Zell-stimulatorischen Kapazität von DC durch IL10.

iDC wurden für zwei Tage mit 1 µg/ml LPS in Anwesenheit von 25 ng/ml IL10 (hIL10 oder ebvIL10) oder in Abwesenheit (Kein IL10) behandelt. Diese DC wurden mit allogenen T-Zellen für 5 Tage inkubiert. Dann wurde auf aktivierten T-Zellen die Expression von CD3 und CD69 durch FACS-Analyse bestimmt.

III.3. Einfluss von ebvIL10 auf die Apoptoserate von DC in Gegenwart eines inflammatorischen Signals

Es wurde untersucht, ob ebvIL10 oder hIL10 einen Einfluss auf die Apoptoserate von DC nach Exposition gegenüber dem Reifungsstimulus LPS hat.

Für ebvIL10 konnte keine Auswirkung gezeigt werden. Unter Zugabe von hIL10 erhöhte sich die Apoptose-Rate, erreichte jedoch keine statistische Signifikanz. Dieser Effekt zeigte sich sowohl bei alleiniger Verwendung von LPS als Reifungsstimulus (Abb. 24), als auch bei Zugabe eines höchst effizienten FasLiganden (Abb. 25).

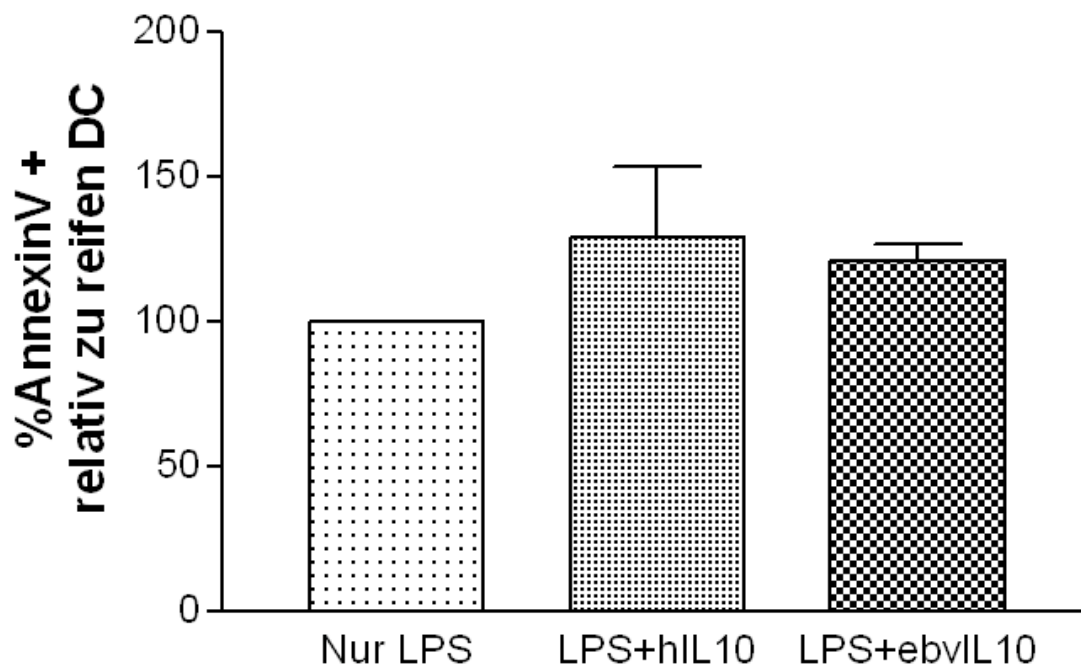


Abb. 24: Apoptose-Rate dendritischer Zellen nach Stimulation mit LPS in Gegenwart von IL10 (ebvIL10 oder hIL10).

iDC wurden für zwei Tage mit 1µg/ml LPS in Anwesenheit von 25 ng/ml Zytokin (hIL10, ebvIL10) oder in Abwesenheit (Nur LPS) behandelt. Die Apoptose-Rate wurde nach zwei Tagen mittels AnnexinV-Färbung und nachfolgender FACS-Analyse bestimmt. Die Abbildung zeigt den Grad der Apoptose relativ zu unbehandelten iDC. Die Resultate ergeben sich aus drei Experimenten mit DC unterschiedlicher Spender. Die Fehlerbalken repräsentieren den SEM.

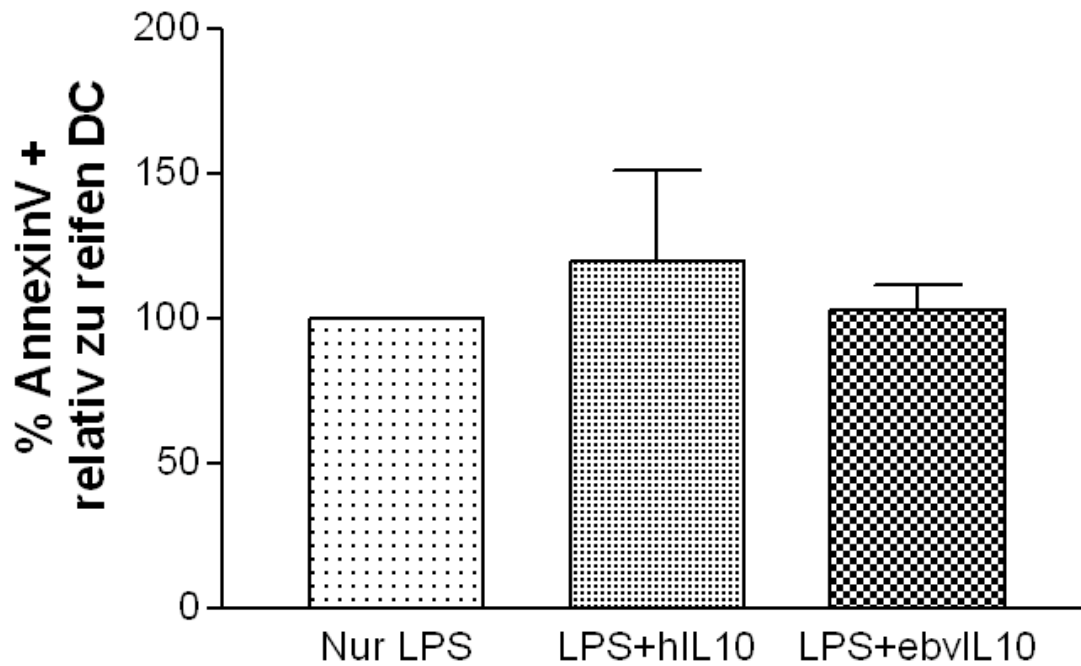


Abb. 25: Apoptose-Rate dendritischer Zellen nach Stimulation mit LPS und Zugabe von FasLigand in Gegenwart von IL10 (ebvIL10 oder hIL10).

iDC wurden für zwei Tage mit 1 µg/ml LPS in Anwesenheit von 25 ng/ml Zytokin (hIL10, ebvIL10) oder in Abwesenheit (Nur LPS) behandelt. Nach einem Tag erfolgte die Zugabe von 1 µg/ml SuperFasLigand. Die Apoptose-Rate wurde nach zwei Tagen mittels AnnexinV Färbung und nachfolgender FACS-Analyse bestimmt. Die Abbildung zeigt den Grad der Apoptose relativ zu unbehandelten iDC. Die Resultate ergeben sich aus drei Experimenten mit DC unterschiedlicher Spender. Die Fehlerbalken geben den SEM an.

IV. Diskussion

In dieser Arbeit wurde die Auswirkung des IL10-Homologs des Epstein-Barr-Virus auf DC untersucht. IL10 als immunsuppressives Agens wird von zahlreichen Erregern ausgenutzt, um die Eliminierung aus dem Wirtsorganismus zu verhindern oder zu verzögern [22]. Einige sind in der Lage zelluläres IL10 zu induzieren, während andere, wie das Epstein-Barr-Virus, ihre eigenen IL10-Homologe kodieren [47]. Das IL10-Homolog des Epstein-Barr-Virus weist dabei die sehr hohe Übereinstimmung von 84 % mit dem menschlichen IL10 auf.

DC stellen wichtige Abwehrzellen dar, die an allen Körperoberflächen präsent sind. Es ist bekannt, dass menschliches IL10 diese Zellen in ihrer Funktion supprimiert. Ein Einfluss des IL10-Homologs des Epstein-Barr-Virus auf DC wäre nahe liegend.

In unseren Versuchen haben wir humanes IL10 aus Gründen der Vergleichbarkeit ebenfalls analysiert und den Ergebnissen der Untersuchung von ebvIL10 gegenübergestellt.

IV.1 Modulation des Phänotyps dendritischer Zellen durch ebvIL10

Ausgehend von der Reaktion unreifer dendritischer Zellen gegenüber LPS war es mittels FACS-Analyse möglich, für hIL10 zwei Gruppen IL10-sensitiver Moleküle zu definieren (Tabelle 7). Die Mehrzahl der LPS-induzierten Gene wurde durch IL10 unterdrückt (Gruppe 1), während einige wenige heraufreguliert wurden (Gruppe 2). Eine ähnliche Zweiteilung konnte ebenfalls bei Experimenten mit Makrophagen der Maus nachgewiesen werden [48].

IV.1.1 Wirkung von ebvIL10 auf Moleküle der Antigenpräsentation, Kostimulation und Adhäsion

Die Gruppe 1 umfasst die klassischen MHC-Moleküle und auch die kostimulatorischen Moleküle. Von anderen Gruppen konnte gezeigt werden, dass hIL10 nach Zellaktivierung mit LPS die Hochregulation von MHC-Klasse-I- und MHC-Klasse-II-Molekülen verhindert [49]. Diesen Effekt haben wir ebenfalls nachweisen können. Der Effekt von ebvIL10 auf die Oberflächenmoleküle der Antigenpräsentation war dahingegen nur schwach oder gar nicht nachzuweisen und signifikant geringer als der von hIL10.

Die getesteten kostimulatorischen Moleküle (CD40, CD80, CD86, B7-H1, B7-DC) sind ebenfalls Bestandteil der Gruppe 1. Für sie ergab sich ein ähnliches Bild. Die Gegenwart von

hIL10 bewirkte eine signifikante Verringerung der LPS-induzierten Expression dieser Moleküle auf DC. Für ebvIL10 war kein signifikanter Effekt auf die kostimulatorischen Moleküle nachzuweisen. Stattdessen zeigte sich für einige Moleküle (CD86, B7-H1, B7-DC) sogar ein signifikanter Unterschied zwischen ebvIL10 und hIL10.

Die Gruppe 2 umfasst interessante IL10-sensitive Moleküle wie HLA-DM. Dieses nichtklassische HLA-Molekül gehört zu einem extrazellulären Präsentationsweg, der eine Prozessierung von Antigen außerhalb der Zelle ermöglicht [50] [51]. Humanes IL10 bewirkt auf durch LPS-aktivierten DC eine Hochregulation von HLA-DM. Auch für dieses Molekül war ein Unterschied zwischen hIL10 und dem IL10-Homolog des Epstein-Barr-Virus auszumachen: Der Effekt von ebvIL10 auf HLA-DM war wiederum deutlich geringer als der von hIL10.

B7-H1 wurde sowohl mit kostimulatorischen [52] als auch mit inhibitorischen Eigenschaften in Verbindung gebracht [53]. Wir konnten für hIL10 nachweisen, dass B7-H1 wie die anderen kostimulatorischen Moleküle auf hIL10 und LPS reagiert und somit ähnlich reguliert wird.

Eine Aktivierung DC bewirkt eine Hochregulation der meisten Adhäsionsmoleküle (CD11c, CD18, ICAM1), sie sind somit ebenfalls Bestandteil der Gruppe 1. Entsprechend der Ergebnisse für die getesteten antigenpräsentierenden und kostimulatorischen Moleküle zeigte sich, dass ebvIL10, im Gegensatz zu hIL10, nicht in der Lage war, diese Hochregulation zu blockieren.

IV.1.2 Beeinflussung der DC-SIGN Expression auf dendritischen Zellen durch ebvIL10

DC-SIGN ist Bestandteil der Gruppe 2, es ist ein C-Typ Lektin. Etliche virale und nicht-virale Pathogene binden an dieses Oberflächenmolekül [54], wie z.B. das Hepatitis-C-Virus [55] und HIV1[56]. Es ist wahrscheinlich, dass diese Erreger DC als Vehikel zur Dissemination im Wirtsorganismus nutzen [57]. Falls also ebvIL10, das bei einer Infektion freigesetzt wird, einen Einfluss auf die Expression von DC-SIGN hätte, könnte dies die Ausbreitung von Pathogenen begünstigen.

Auf unreifen DC, die einem Reifungsstimulus, wie LPS, ausgesetzt werden, wird DC-SIGN herabreguliert [17]. Wir konnten nachweisen, dass die gleichzeitige Zugabe von hIL10 und LPS die Reifung dendritischer Zellen behindert und eine Hochregulation von DC-SIGN auf DC bewirkt.

DC-SIGN dient ebenfalls als Rezeptor für das Cytomegalie-Virus [57]. Das IL10-Homolog des Cytomegalie-Virus (cmvIL10) bewirkt entsprechend hIL10 eine Hochregulation von DC-

SIGN [58]. Da sowohl das Cytomegalie-Virus, als auch das Epstein -Barr Virus zur Familie der Herpesviren gehören, lag die Vermutung nahe, dass ebvIL10 ähnlich reagiert wie cmvIL10. Jedoch konnten wir zeigen, dass hier ein Unterschied zwischen den beiden IL10-Homologen besteht. Für ebvIL10 war kein Einfluss auf die Expression von DC-SIGN während der LPS-induzierten Reifung nachweisbar. Stattdessen bestand sogar ein signifikanter Unterschied zwischen der Wirkung von ebvIL10 und hIL10. ebvIL10 hat, im Gegensatz zu hIL10, kaum Einfluss auf die Expression von DC-SIGN auf DC, unabhängig von der Zytokinkonzentration und von dem Reifungsstadium.

IV.1.3 Auswirkung von ebvIL10 auf die Expression von IDO

Die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist ein wichtiges Regulationsmolekül für die T-Zell-Proliferation, das T-Zell-Überleben [59] [17] und die Regulation des adaptiven Immunsystems [60] [61]. Seine Produktion durch menschliche Makrophagen [62] oder DC [46] bewirkt eine Verringerung von Tryptophan und dadurch eine Unterdrückung der T-Zell-Antwort. IDO-exprimierende menschliche DC fungieren als spezialisierte, regulatorische Zellen, die eine Rolle spielen könnten, *in vivo* Toleranz zu induzieren [63]. In unseren Versuchen bewirkte hIL10 eine erhöhte Expression von tolerogenem IDO auf DC, das auf diese Weise die T-Zell-Antwort abschwächt. Für ebvIL10 konnte kein signifikanter Einfluss auf die Expression von IDO nachgewiesen werden.

IV.1.4 Dosisabhängiger Effekt von ebvIL10 auf die Expression von ICAM1

Ausgehend von humanem IL10 haben wir untersucht, bei welcher Konzentration von ebvIL10 der größte Effekt auf DC nachweisbar ist. Dafür wurden in Verdünnungsreihen die Oberflächenmoleküle DC-SIGN und ICAM1 untersucht. Wir konnten zeigen, dass für hIL10 der maximale Einfluss bei 25 ng/ml besteht, während für ebvIL10 selbst bei Konzentrationen von bis zu 200 ng/ml kein signifikanter Einfluss zu sehen war.

Die Ergebnisse für ebvIL10 sind in Bezug auf das Oberflächenmolekül DC-SIGN widersprüchlich. Bei einem Spender konnte für ebvIL10 ein Einfluss auf DC-SIGN gesehen werden. Dieses muss aber in weiteren Untersuchungen mit weiteren Spendern verifiziert werden, da dieser Effekt auf Spendervariabilität beruhen könnte.

Die von uns verwendeten Konzentrationen übersteigen die physiologisch angenommenen Konzentrationen von ebvIL10 von bis zu 300 pg/ml, die bei einer Primärinfektion gemessen werden konnten [45]. Sie entsprechen jedoch der Versuchsanordnung anderer Arbeitsgruppen in vergleichbaren Experimenten [64].

IV.1.5 Einfluss von ebvIL10 auf dendritische Zellen in verschiedenen Reifungsstadien

Die Untersuchung der Wirkung von IL10 auf unreife DC zeigte, dass weder ebvIL10 noch hIL10 einen signifikanten Einfluss auf die untersuchten Oberflächenmoleküle DC-SIGN, MHC I, CD86 und ICAM1 hat. Unreife DC sind tolerogen. Es ist daher gut vorstellbar, dass IL10 in Abwesenheit eines Reifungsstimulus selbst keinen Effekt auf DC aufweist.

Ebenfalls haben wir den Einfluss von ebvIL10 und hIL10 auf die DC-SIGN- und MHC-Klasse-I-Expression reifer dendritischer Zellen untersucht. Hier konnte für beide Interleukine kein Einfluss auf die Expression von DC-SIGN und auch MHC-Klasse-I-Molekülen nachgewiesen werden. Diese Resistenz reifer dendritischer Zellen gegenüber IL10 stimmt mit schon publizierten Ergebnissen überein [34] und könnte mit dem Verlust der Expression von IL10R1 und einer verminderten IL10-Bindung zusammenhängen [65].

IV.1.6 Zusammenfassung

Die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von ebvIL10 zu humanem IL10 beträgt 84%. Trotzdem ist ebvIL10, im Gegensatz zum menschlichen Vorbild, nicht in der Lage, die volle T-Zell-Aktivierung zu verhindern [66] [67]. Während hIL10 wichtige Funktionen dendritischer Zellen, die zum Zeitpunkt der Reifung erworben werden oder verloren gehen, inhibiert, ist ebvIL10 nicht in der Lage, die funktionelle Reifung von DC zu blockieren.

Eine mögliche Erklärung bieten Untersuchungen der Bindungsaffinität von IL10 an den IL10-Rezeptor. Diese ergaben, dass eine hohe Affinität von humanem IL10 für die IL10R1-Untereinheit besteht, aber eine etwa 20fache Reduktion für ebvIL10 [68]. Der funktionelle Rezeptor für IL10 setzt sich aus zwei Ketten zusammen, die IL10R1- und IL10R2-Untereinheit [28]. Die Kristallstrukturanalyse zeigte, dass virale IL10-Homologe unterschiedliche Wege entwickelt haben, um die IL10R1-Untereinheit zu aktivieren [68]. Diese strukturellen Unterschiede, die trotz der hohen Homologie der Primärstruktur bestehen, könnten eine veränderte Signaltransduktion zur Folge haben und damit die funktionellen Unterschiede zu hIL10 erklären.

IV.2 Wirkung von ebvIL10 auf reifungsinduzierte Funktionsänderungen dendritischer Zellen

IV.2.1 Effekt von ebvIL10 auf die Produktion wichtiger Zytokine

IL12 wird vor allem von Makrophagen und B-Lymphozyten produziert und hat vielfältige Effekte auf T-Zellen und NK-Zellen, darunter die Induktion der IFN γ Produktion und eine Verstärkung der zytotoxischen Aktivität von ruhenden NK- und T-Zellen. In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass hIL10, aber nicht ebvIL10, die Produktion von IL12 durch DC supprimiert. Einen ähnlichen Effekt hatte hIL10 auf Monozyten [69].

Dagegen gehört IL6 zu den Akute-Phase-Proteinen. Ihm werden sowohl pro- als auch als antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Es wird von vielen verschiedenen Zellen produziert und ist mit einer generellen Zellaktivierung vergesellschaftet. Auf die IL6-Produktion DC hatte sowohl hIL10, als auch ebvIL10 keinen Einfluss. Frühere Ergebnisse anderer Arbeitsgruppen zeigen, dass hIL10 die IL6-Produktion humaner Monozyten hemmt [29]. Es ist jedoch bekannt, dass Monozyten auf Zytokine anders reagieren als DC.

IV.2.2 Einfluss von ebvIL10 auf die Fähigkeit dendritischer Zellen, CD3+ Zellen und T-Zellen zu stimulieren

Vorangehende Arbeiten haben nachgewiesen, dass IL10-behandelte DC eine T-Zell-Anergie induzieren können [34] [70] [71]. Anergie T-Zellen können als regulatorische T-Zellen fungieren, die eine antigen-spezifische Toleranz fördern [72] [73].

In unseren Analysen des Phänotyps zeigte sich lediglich ein geringer Effekt von ebvIL10, so dass wir orientierende, funktionelle Untersuchungen anschlossen. Auf funktioneller Ebene konnten wir in unseren Untersuchungen zeigen, dass hIL10- und ebvIL10-behandelte DC PBMC schlechter aktivieren als unbehandelte DC und, dass bei Zugabe hoher Mengen ebvIL10 zu DC und T-Zellen eine verminderte Produktion von IFN γ erfolgt. Für die Untersuchung der IFN- γ Produktion erfolgte jedoch lediglich die orientierende Analyse eines Spenders. Hier ist noch weitergehende Forschung notwendig.

Darüber hinaus ergaben unsere Versuche, dass hIL10 die Kapazität LPS-behandelter dendritischer Zellen reduziert, T-Zellen zu stimulieren und damit vermutlich eine Anergie der T-Zellen induziert. In dieser Analyse war ebvIL10 weniger wirksam als hIL10. Im Gegensatz dazu ist bekannt, dass ebvIL10 *in vivo* im Mausmodell eine T-Zell-Toleranz gegenüber Antigenen induzieren kann [74]. In diesem Fall jedoch wirkte ebvIL10 direkt auf T-Zellen

und war damit unabhängig von einer Wirkung auf DC. Denkbar ist auch, dass das Mausmodell keine letztlich gültige Aussage über die Wirkung von ebvIL10 im Menschen zulässt.

ebvIL10 besitzt, obwohl der Phänotyp dendritischer Zellen kaum beeinträchtigt ist, funktionelle Effekte, wenn auch schwächer ausgeprägt als das menschliche Homolog. Es ist durchaus möglich, dass der Einfluss von ebvIL10 *in vivo* auf funktioneller Ebene deutlicher wird. Die phänotypische Analyse erfasst nur eine Auswahl der Moleküle, welche die T-Zell-stimulatorische Kapazität von DC bestimmen. Es ist davon auszugehen, dass einige Moleküle noch nicht gefunden und beschrieben worden sind, die unter Umständen eine noch genauere Charakterisierung der Funktion dendritischer Zellen zulassen. Zusammenfassend zeigt sich, dass IL10 wichtige Funktionen dendritischer Zellen, die während des Reifungsprozesses erworben werden, stört. Dieser Effekt war für hIL10 deutlicher nachweisbar, aber auch für ebvIL10 konnten wir einen Einfluss auf die Funktion dendritischer Zellen zeigen. Dieser muss jedoch, unter besonderem Augenmerk auf die Möglichkeit einer genaueren Charakterisierung der Funktion, noch eingehender beschrieben werden.

IV.3 Einfluss von ebvIL10 auf die Apoptoserate dendritischer Zellen

Apoptotische DC akkumulieren *in vivo* in Lymphknoten kurz nach einer LPS-induzierten Reifung [75]. Analysen der Genexpression dendritischer Zellen der Maus zeigen, dass eine reifungsassoziierte Apoptose dendritischer Zellen ursächlich mit einem schnellen Abfall der Expression von anti-apoptotischen Bcl-2 zusammenhängen könnte [76]. Nach diesen Ergebnissen wäre eine verminderte Apoptoserate menschlicher dendritischer Zellen bei Zugabe von hIL10 während der LPS-induzierten Reifung zu erwarten.

Für ebvIL10 konnten wir keinen Einfluss auf die Apoptoserate dendritischer Zellen nachweisen. Dahingegen hatte die Zugabe von hIL10 während der LPS-induzierten Reifung einen Anstieg der Apoptoserate dendritischer Zellen zur Folge. Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen konnte von einer anderen Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass die Zugabe von IL10 während der Reifung die spontane Apoptose dendritischer Zellen begünstigt. Ursächlich hierfür ist eine durch IL10 unterdrückte Induktion antiapoptotischer Bcl-2 Gene. Über eine verminderte Konzentration von Bcl-2 Proteinen erfolgt auf diese Weise eine Kontrolle der

Lebensdauer dendritischer Zellen [77].

Die Begrenzung der Immunantwort ist eine wichtige Aufgabe von hIL10. Es ist möglich, dass auf diese Weise durch hIL10 ein antiinflammatorischer Aspekt der Apoptose vermittelt wird, der eine potentiell schädliche Immunantwort begrenzt [28].

IV.4 Verwendung von ebvIL10 bei Autoimmunerkrankungen und in der Transplantationsmedizin

ebvIL10 wird als ein immunsuppressives Agens für die Anwendung im Bereich der Organtransplantation, der Autoimmunerkrankungen und der Entzündung betrachtet. Die tolerogenen Eigenschaften von IL10 lassen den Einsatz einer IL10-Therapie zur Vermeidung einer Transplantatabstoßung sinnvoll erscheinen. Aus diesem Grund wurde in einer Reihe von Studien IL10 durch Gentransfer mittels viraler Vektoren in die Zellen eines Transplantats überführt und die Immunreaktion untersucht. Retrovirale-, adenovirale- und Plasmidvektoren sind alle in der Lage ebvIL10 zu transferieren und zu exprimieren. Unabhängig von diesen Erfolgen wurde Transplantttoleranz und ein zeitlich unbegrenztes Überleben noch nicht erreicht. In Maus-Tumormodellen wurde beobachtet, dass eine Gentransfer-vermittelte ebvIL10 Expression die Akzeptanz des Transplantats verstärkt [78] [74] [79]. Außerdem wurde die Abstoßung von Herztransplantaten im Mausmodell durch den Transfer von IL10 mittels eines Retrovirus verzögert [80]. Darüber hinaus beschreiben Nast et al. [81] einen Nierentransplantations-Patienten mit einer transplantatassoziierten Lymphoproliferation, der unter minimaler immunsuppressiver Therapie eine prolongierte Transplantatakzeptanz zeigte. Diese war mit einer Expression von ebvIL10 im Transplantat assoziiert.

ebvIL10 hat ebenfalls einen Einfluss auf den Bereich der Autoimmunität und Entzündung. Der Transfer von ebvIL10 durch ein replikationsdefizientes Adenovirus in Synoviozyten konnte periprosthetische Prozesse, die zu einer Osteolyse nach Endoprothesenimplantation führen, inhibieren [82]. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass ein Gentransfer von ebvIL10 mittels eines adeno-assoziierten viralen Vektors bei nicht-übergewichtigen diabetischen Mäusen die Insulinitis signifikant reduzierte und eine aktive Unterdrückung der Autoimmunität bewirkte [83].

Diese Daten zusammengenommen zeigen, dass ebvIL10 ein immunsuppressives Zytokin darstellt, das im Bereich der Transplantation, Autoimmunität und Entzündung für den

Menschen therapeutische Bedeutung gewinnen könnte.

In unseren Versuchen war nur ein geringer Effekt von ebvIL10 auf humane DC nachzuweisen, die als professionelle Antigenpräsentierende-Zellen eine wichtige Rolle in der Abstoßung spielen würden. Es ist wahrscheinlich, dass das verlängerte Transplantatüberleben, das durch einen Gentransfer von ebvIL10 erreicht werden kann, nicht über einen alleinigen Einfluss von ebvIL10 auf DC als Antigenpräsentierende-Zellen erklärbar ist. Vielmehr ist anzunehmen, dass das verlängerte Transplantatüberleben das Ergebnis eines Zusammenspiels mehrerer Faktoren ist. So zeigten Qin et al., dass die Wirksamkeit von ebvIL10 abhängig ist von zusätzlichen Faktoren, wie dem Vorhandensein von CD4+T-Zellen und weiteren Zytokinen [84].

IV.5 Rolle von ebvIL10 bei der Immunevasion des Epstein-Barr-Virus

Viren haben Mechanismen entwickelt, um der Erkennung und Zerstörung des Immunsystems zu entgehen. Für das Epstein-Barr-Virus ist bekannt, dass es eine Latenz in normalen ruhenden Memory-B-Zellen etabliert und ein Leben lang in mehr als 90 % der Bevölkerung persistiert [4]. Vor allem EBV-spezifische T-Lymphozyten sind für eine Begrenzung der Expansion latent infizierter Zellen und eine Reduktion der viralen Last durch Eliminierung produktiv infizierter Zellen verantwortlich [85]. Antigenpräsentierende Zellen spielen in der Aktivierung dieser antiviralen T-Zellen eine zentrale Rolle.

In unseren Versuchen war nur ein geringer Effekt von ebvIL10 auf humane DC nachzuweisen. ebvIL10 beeinträchtigte in deutlich geringerem Maße als hIL10 den Phänotyp und die Funktion dieser wichtigen antigenpräsentierenden-Zellen. Von anderen Arbeitsgruppen konnte für humane Monozyten gezeigt werden, dass ebvIL10 in der Lage war, MHC-Klasse-I-Moleküle, ICAM1, CD80 und CD86 zu inhibieren [64]. Wie jedoch bereits zuvor diskutiert, stellen Monozyten ein Übergangsstadium dar, aus dem sich DC entwickeln können. Es ist bekannt, dass sie auf Zytokine anders reagieren als DC.

Der Nutzen von ebvIL10 für die Immunevasion des Epstein-Barr-Virus scheint weniger in der Hemmung der Reifung dendritischer Zellen zu liegen, sondern ist wahrscheinlich in anderen Bereichen der Immunabwehr und Immunevasion von Bedeutung. Es konnte gezeigt werden, dass ebvIL10 im Vergleich zu hIL10 nur eine reduzierte Fähigkeit aufweist, auf murinen B-

Zellen die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen zu stimulieren, während es das Überleben von murinen B-Zellen in der Kultur fördert [86]. B-Zellen stellen die primären Angriffszellen für eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus dar.

Ebenfalls ist es möglich, einen indirekten Effekt des Epstein-Barr-Virus auf DC zu diskutieren. Vor kurzem konnte gezeigt werden, dass das Virus die Produktion von hIL10 in B-Zellen induziert [87]. Dieses humane IL10 könnte einen Effekt auf DC aufweisen.

IV.6 Zusammenfassung und Ausblick

Viren haben vielfältige Wege entwickelt, die Immunantwort des Wirts zu beeinflussen und zu modulieren. Eine dieser Strategien haben sich vor allem DNA-Viren zu Eigen gemacht. Sie kodieren Moleküle, die eine kritische Rolle in der Kontrolle der Immunantwort spielen: Homologe von Zytokinen und Chemokinen, sowie deren Rezeptoren.

Viren haben dabei sowohl Gene des Wirts in ihr eigenes Genom aufgenommen, als auch eigene Gene entwickelt, deren Produkte spezifisch in das Immunsystem eingreifen. Virusgenome sind so wichtige Aufbewahrungsorte von Informationen über den Immunprozess. Ihre Charakterisierung trägt zu unserem Verständnis der viralen Pathogenese bei und zeigt virale Strategien der Immunmodulation auf. Darüber hinaus lassen sich aus der Untersuchung viraler Strategien ebenfalls Informationen über die Arbeitsweisen des Immunsystems ableiten und auf diese Weise neue Ansätze mit therapeutischem Potential entwickeln [88].

Im Vergleich zu hIL10 zeigten die Versuche, dass die Effekte von ebvIL10 auf den Phänotyp dendritischer Zellen immer beträchtlich schwächer ausgeprägt waren. Allein von der Ausprägung des Phänotyps ist es jedoch nicht möglich, auf die Funktion dendritischer Zellen zu schließen, da die phänotypische Analyse nicht alle Moleküle erfasst, welche die T-Zell-stimulatorische Kapazität von DC bestimmen. Wir konnten einen Einfluss auf die Funktion dendritischer Zellen nachweisen, der jedoch zumeist ebenfalls schwächer war als bei humanem IL10. Hier ist eine weitergehende Forschung erforderlich.

Ein *in vitro*-Versuchssystem ermöglicht darüber hinaus immer nur die Untersuchung eines isolierten Aspektes. Die komplexen Gegebenheiten einer Infektion *in vivo* können nicht vollständig widerspiegelt werden. Mögliche weitere Effekte des IL10-Homologs des Epstein-Barr-Virus auf DC könnten sich daher sowohl aus dem Wirken anderer Mechanismen oder Proteine ergeben, als auch aus einem Zusammenspiel aller.

Der von uns untersuchte Einfluss des IL10-Homologs des Epstein-Barr-Virus auf DC stellt nur einen Aspekt einer Infektion mit dem Virus dar. Es vervollständigt sich jedoch auf diese Weise das Bild von ebvIL10 und dessen Wirkung auf verschiedene humane Zelltypen. ebvIL10 hat nur einen Teil der Funktionen der menschlichen Vorlage konserviert und kann unter bestimmten Umständen eine grundsätzlich andere Antwort hervorrufen.

Weitere Grundlagenforschung ist erforderlich, um die genaue Wirkung des ebvIL10 auf menschliche Zellen zu erforschen. Auf dieser Grundlage könnte später dieses Zytokin in der Humanmedizin zum Einsatz kommen.

V. Zusammenfassung

Das Epstein-Barr-Virus ist der Erreger der infektiösen Mononukleose und stellt ein ubiquitär verbreitetes Pathogen dar. Ein hoher Prozentsatz der gesunden erwachsenen Bevölkerung ist in einer lebenslang persistierenden Infektion Träger dieses Erregers. Menschliche dendritische Zellen (DC) sind essentiell für die antivirale Immunantwort und stellen somit ein strategisch wichtiges Ziel der viralen Immunevasion dar. Ein Mechanismus der Immunevasion ist die Kodierung eines IL10-Homologs. Das Epstein-Barr-Virus IL10 (ebvIL10) weist eine hohe Übereinstimmung von 84% verglichen mit humanem IL10 (hIL10) auf.

Ziel unserer Untersuchung war es, die Wirkung von ebvIL10 auf den Phänotyp, die Funktion und das Überleben dendritischer Zellen im Vergleich zu humanem IL10 zu analysieren.

Trotz der hohen Homologie zwischen ebvIL10 und hIL10 zeigte sich ein deutlicher Unterschied in der Stärke der biologischen Antwort dendritischer Zellen, die mit den verschiedenen Interleukinen behandelt worden waren. Humanes IL10 blockierte die LPS-induzierte Hochregulation der Oberflächenmoleküle der Antigenpräsentation, Kostimulation und Adhäsion, während ebvIL10 nur einen schwachen Effekt aufwies.

Eine geringe Anzahl von Oberflächenmolekülen auf LPS-behandelten DC zeigte in Reaktion auf die Behandlung mit hIL10 ein abweichendes Verhalten.IDO, ein toleranzinduzierendes Molekül und DC-SIGN, ein wichtiger Rezeptor für die Infektion mit Viren, wurden hochreguliert. Dieser Effekt war für ebvIL10 kaum nachweisbar. Auf unreife und reife DC hatten sowohl ebvIL10 als auch hIL10 keinen Einfluss. Während hIL10 die mit der Reifung assoziierte Apoptoserate erhöhte, war im Gegensatz dazu für ebvIL10 kein Einfluss nachzuweisen.

In Hinblick auf die Funktion zeigte sich die Wirkung von ebvIL10 deutlicher. Beide IL10 beeinträchtigten die reifungs-assoziierten Veränderungen der Funktion dendritischer Zellen. hIL10- und ebvIL10- behandelte DC aktivierten allogene periphere mononukleäre Blutzellen (PBMC) schlechter als unbehandelte DC. Des Weiteren reduzierten hIL10 und zu einem geringeren Grad ebvIL10 die Kapazität dendritischer Zellen, T-Zellen zu stimulieren.

Auf die Produktion des wichtigen Zytokins IL6 bestand keine Auswirkung von ebvIL10 und hIL10. Die IL12-Produktion konnte durch hIL10 reduziert werden, ebvIL10 hatten keinen Effekt.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse, dass ebvIL10 im Gegensatz zu hIL10 den Phänotyp und das Überleben dendritischer Zellen kaum beeinflusst. Dahingegen bestand ein Effekt von ebvIL10 auf die Funktion dendritischer Zellen, der im Vergleich zu hIL10 zwar geringer, aber

nachweisbar war.

Weitergehende Forschung zum Verständnis der Wirkung von ebvIL10 im Kontext einer Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus ist erforderlich. Interessant wäre etwa die Untersuchung des Einflusses von ebvIL10 auf andere Zellen, wie etwa B-Zellen, oder des Verlaufs einer *in vitro*-Infektion mit einem EBV-Stamm, der das IL10-Homolog nicht exprimiert.

VI. Abstract

Epstein-Barr virus (EBV), an ubiquitous pathogen with worldwide distribution, causes infectious mononucleosis during primary infection. A high percentage (80-90%) of healthy adults are persistently infected with EBV. Human dendritic cells (DCs) are essential for the antiviral immune response and represent a strategically important target for viral immune evasion. Intriguingly, viruses such as EBV, Poxvirus Orf, or Cytomegalovirus encode homologues of IL10, an important antiinflammatory cytokine. The EBV-encoded IL10 (ebvIL10) is 84% identical with human IL10 (hIL10). In this study we investigated the capacity of ebvIL10 to shape phenotype, function, and survival of DCs in comparison to hIL10.

Despite its high sequence identity with hIL10, ebvIL10 showed a clear difference in the strength of the biologic response. hIL10 blocked LPS-induced up-regulation of surface molecules, confirming its role as an inhibitor of DC maturation. In contrast, ebvIL10 had only a weak influence on the molecules of antigen presentation, costimulation and adhesion. A small number of molecules on LPS-treated DC showed a different behavior in response to hIL10. IDO, a tolerogenic molecule, and DC-SIGN, a receptor for certain pathogens, were up-regulated on DCs. This effect was substantially lower for ebvIL10. On immature DCs in the absence of maturation signals as well as on mature DCs ebvIL10 and hIL10 had no influence. The impact of ebvIL10 on DC function was, however, more obvious. DC treated with hIL10 and to a lesser extent ebvIL10, reduced the capacity of DCs to stimulate T-cells.

hIL10 also increased apoptosis associated with DC maturation, while the effect of ebvIL10 was again negligible. Finally, LPS-induced IL12 production was reduced upon DC treatment with hIL10, whereas ebvIL10 had no influence. Both cytokines had no effect on production of IL6 by DCs.

Taken together, although ebvIL10 had almost no effect on DC phenotype and survival, it clearly modulated some of the DC functions. More investigation is necessary to further improve our understanding of the role of ebvIL10 in the context of Epstein-Barr virus infection.

VII. Literaturverzeichnis

- 1 Rickinson AB, Kieff E. Epstein-Barr Virus and Its Replication. In Knipe DM, Howley PM, eds. *Fields Virology*. 5th ed. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2006:2603-2654.
- 2 Modrow S, Falke D, Truyen U. Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom - Herpesviren. In: Modrow S, Falke D, Truyen U, eds. *Molekulare Virologie*. 2nd ed. Heidelberg, Berlin: Spektrum Akademischer Verlag, 2002:540-600.
- 3 Dörries R. Spezielle Virologie - Herpesviridae. In Hof H, Dörries R, eds. *Mikrobiologie*. 3rd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 2005:240-243.
- 4 Thorley-Lawson DA. EBV the prototypical human tumor virus--just how bad is it? *J Allergy Clin Immunol*. 2005;116:251-61; quiz 262.
- 5 Klein G, Svedmyr E, Jondal M, et al. EBV-determined nuclear antigen (EBNA)-positive cells in the peripheral blood of infectious mononucleosis patients. *Int J Cancer*. 1976;17:21-26.
- 6 Khan G, Miyashita EM, Yang B, et al. Is EBV persistence in vivo a model for B cell homeostasis? *Immunity*. 1996;5:173-179.
- 7 Miyashita EM, Yang B, Lam KM, et al. A novel form of Epstein-Barr virus latency in normal B cells in vivo. *Cell*. 1995;80:593-601.
- 8 Rescigno M, Granucci F, Citterio S, et al. Coordinated events during bacteria-induced DC maturation. *Immunol Today*. 1999;20:200-203.
- 9 Tortorella D, Gewurz BE, Furman MH, et al. Viral subversion of the immune system. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:861-926.
- 10 Lanzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell*. 2001;106:263-266.
- 11 Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
- 12 Grabbe S, Kampgen E, Schuler G. Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunol Today*. 2000;21:431-433.
- 13 Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, et al. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2002;20:621-667.
- 14 Zarling AL, Johnson JG, Hoffman RW, et al. Induction of primary human CD8+ T lymphocyte responses in vitro using dendritic cells. *J Immunol*. 1999;162:5197-5204.
- 15 Reis e Sousa C. Dendritic cells as sensors of infection. *Immunity*. 2001;14:495-498.

- 16 Dubois B, Massacrier C, Vanbervliet B, et al. Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. *J Immunol.* 1998;161:2223-2231.
- 17 Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol.* 2005;175:1373-1381.
- 18 Steinman RM, Hawiger D, Liu K, et al. Dendritic cell function in vivo during the steady state: a role in peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci.* 2003;987:15-25.
- 19 Piemonti L, Monti P, Allavena P, et al. Glucocorticoids affect human dendritic cell differentiation and maturation. *J Immunol.* 1999;162:6473-6481.
- 20 Ridge JP, Di Rosa F, Matzinger P. A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T-helper and a T-killer cell. *Nature.* 1998;393:474-478.
- 21 Xu XN, Sreaton GR, McMichael AJ. Virus infections: escape, resistance, and counterattack. *Immunity.* 2001;15:867-870.
- 22 Redpath S, Angulo A, Gascoigne NR, et al. Immune checkpoints in viral latency. *Annu Rev Microbiol.* 2001;55:531-560.
- 23 Ploegh HL. Viral strategies of immune evasion. *Science.* 1998;280:248-253.
- 24 Alcami A, Koszinowski UH. Viral mechanisms of immune evasion. *Trends Microbiol.* 2000;8:410-418.
- 25 Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR. Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med.* 1989;170:2081-2095.
- 26 Volk H, Asadullah K, Gallagher G, et al. IL-10 and its homologs: important immune mediators and emerging immunotherapeutic targets. *Trends Immunol.* 2001;22:414-417.
- 27 Tan JC, Indelicato SR, Narula SK, et al. Characterization of interleukin-10 receptors on human and mouse cells. *J Biol Chem.* 1993;268:21053-21059.
- 28 Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, et al. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol.* 2001;19:683-765.
- 29 de Waal Malefyt R, Abrams J, Bennett B, et al. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med.* 1991;174:1209-1220.
- 30 Ralph P, Nakoinz I, Sampson-Johannes A, et al. IL-10, T lymphocyte inhibitor of human blood cell production of IL-1 and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1992;148:808-814.
- 31 Redpath S, Ghazal P, Gascoigne NR. Hijacking and exploitation of IL-10 by intracellular pathogens. *Trends Microbiol.* 2001;9:86-92.

- 32 Ding L, Linsley PS, Huang LY, et al. IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol.* 1993;151:1224-1234.
- 33 Rousset F, Garcia E, Defrance T, et al. Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992;89:1890-1893.
- 34 Steinbrink K, Wolfel M, Jonuleit H, et al. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol.* 1997;159:4772-4780.
- 35 Grutz G. New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression. *J Leukoc Biol.* 2005;77:3-15.
- 36 Taga K, Mostowski H, Tosato G. Human interleukin-10 can directly inhibit T-cell growth. *Blood.* 1993;81:2964-2971.
- 37 de Waal Malefyt R, Yssel H, de Vries JE. Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4+ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol.* 1993;150:4754-4765.
- 38 Groux H, Bigler M, de Vries JE, et al. Inhibitory and stimulatory effects of IL-10 on human CD8+ T cells. *J Immunol.* 1998;160:3188-3193.
- 39 Fleming SB, McCaughan CA, Andrews AE, et al. A homolog of interleukin-10 is encoded by the poxvirus orf virus. *J Virol.* 1997;71:4857-4861.
- 40 Kotenko SV, Saccani S, Izotova LS, et al. Human cytomegalovirus harbors its own unique IL-10 homolog (cmvIL-10). *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:1695-1700.
- 41 Hsu DH, de Waal Malefyt R, Fiorentino DF, et al. Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science.* 1990;250:830-832.
- 42 Yoon SI, Jones BC, Logsdon NJ, et al. Same structure, different function crystal structure of the Epstein-Barr virus IL-10 bound to the soluble IL-10R1 chain. *Structure.* 2005;13:551-564.
- 43 Liu Y, de Waal Malefyt R, Briere F, et al. The EBV IL-10 homologue is a selective agonist with impaired binding to the IL-10 receptor. *J Immunol.* 1997;158:604-613.
- 44 Zdanov A, Schalk-Hihi C, Menon S, et al. Crystal structure of Epstein-Barr virus protein BCRF1, a homolog of cellular interleukin-10. *J Mol Biol.* 1997;268:460-467.
- 45 Taga H, Taga K, Wang F, et al. Human and viral interleukin-10 in acute Epstein-Barr virus-induced infectious mononucleosis. *J Infect Dis.* 1995;171:1347-1350.
- 46 Hwu P, Du MX, Lapointe R, et al. Indoleamine 2,3-dioxygenase production by human dendritic cells results in the inhibition of T cell proliferation. *J Immunol.*

- 2000;164:3596-3599.
- 47 Fleming SB, Haig DM, Nettleton P, et al. Sequence and functional analysis of a homolog of interleukin-10 encoded by the parapoxvirus orf virus. *Virus Genes*. 2000;21:85-95.
 - 48 Lang R, Patel D, Morris JJ, et al. Shaping gene expression in activated and resting primary macrophages by IL-10. *J Immunol*. 2002;169:2253-2263.
 - 49 Bellinghausen I, Brand U, Steinbrink K, et al. Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108:242-249.
 - 50 Santambrogio L, Sato AK, Carven GJ, et al. Extracellular antigen processing and presentation by immature dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96:15056-15061.
 - 51 Arndt SO, Vogt AB, Markovic-Plese S, et al. Functional HLA-DM on the surface of B cells and immature dendritic cells. *EMBO J*. 2000;19:1241-1251.
 - 52 Dong H, Zhu G, Tamada K, et al. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nat Med*. 1999;5:1365-1369.
 - 53 Freeman GJ, Long AJ, Iwai Y, et al. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *J Exp Med*. 2000;192:1027-1034.
 - 54 van Kooyk Y, Geijtenbeek TB. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat Rev Immunol*. 2003;3:697-709.
 - 55 Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F, et al. Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol*. 2003;77:4070-4080.
 - 56 van Montfort T, Nabatov AA, Geijtenbeek TB, et al. Efficient Capture of Antibody Neutralized HIV-1 by Cells Expressing DC-SIGN and Transfer to CD4+ T Lymphocytes. *J Immunol*. 2007;178:3177-3185.
 - 57 Halary F, Amara A, Lortat-Jacob H, et al. Human cytomegalovirus binding to DC-SIGN is required for dendritic cell infection and target cell trans-infection. *Immunity*. 2002;17:653-664.
 - 58 Raftery MJ, Wieland D, Gronewald S, et al. Shaping phenotype, function, and survival of dendritic cells by cytomegalovirus-encoded IL-10. *J Immunol*. 2004;173:3383-3391.
 - 59 Mellor A. Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity. *Biochem Biophys Res Commun*. 2005;338:20-24.

- 60 Mellor AL, Munn DH. Tryptophan catabolism and regulation of adaptive immunity. *J Immunol.* 2003;170:5809-5813.
- 61 Grohmann U, Fallarino F, Puccetti P. Tolerance, DCs and tryptophan: much ado about IDO. *Trends Immunol.* 2003;24:242-248.
- 62 Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, et al. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med.* 1999;189:1363-1372.
- 63 Munn DH, Sharma MD, Lee JR, et al. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science.* 2002;297:1867-1870.
- 64 Salek-Ardakani S, Arrand JR, Mackett M. Epstein-Barr virus encoded interleukin-10 inhibits HLA-class I, ICAM-1, and B7 expression on human monocytes: implications for immune evasion by EBV. *Virology.* 2002;304:342-351.
- 65 Corinti S, Albanesi C, la Sala A, et al. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol.* 2001;166:4312-4318.
- 66 Benvenuti F, Lagaudriere-Gesbert C, Grandjean I, et al. Dendritic cell maturation controls adhesion, synapse formation, and the duration of the interactions with naive T lymphocytes. *J Immunol.* 2004;172:292-301.
- 67 Dustin ML, Tseng SY, Varma R, et al. T cell-dendritic cell immunological synapses. *Curr Opin Immunol.* 2006;18:512-516.
- 68 Jones BC, Logsdon NJ, Josephson K, et al. Crystal structure of human cytomegalovirus IL-10 bound to soluble human IL-10R1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002;99:9404-9409.
- 69 Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, et al. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol.* 1998;160:5936-5944.
- 70 Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, et al. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood.* 1999;93:1634-1642.
- 71 Bellinghausen I, Konig B, Bottcher I, et al. Inhibition of human allergic T-helper type 2 immune responses by induced regulatory T cells requires the combination of interleukin-10-treated dendritic cells and transforming growth factor-beta for their induction. *Clin Exp Allergy.* 2006;36:1546-1555.
- 72 Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, et al. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med.* 2000;192:1213-1222.
- 73 Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, et al. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor

- activity. *Blood*. 2002;99:2468-2476.
- 74 Muller A, Schmitt L, Raftery M, et al. Paralysis of B7 co-stimulation through the effect of viral IL-10 on T cells as a mechanism of local tolerance induction. *Eur J Immunol*. 1998;28:3488-3498.
- 75 De Smedt T, Pajak B, Klaus GG, et al. Antigen-specific T lymphocytes regulate lipopolysaccharide-induced apoptosis of dendritic cells in vivo. *J Immunol*. 1998;161:4476-4479.
- 76 Granucci F, Vizzardelli C, Virzi E, et al. Transcriptional reprogramming of dendritic cells by differentiation stimuli. *Eur J Immunol*. 2001;31:2539-2546.
- 77 Chang WL, Baumgarth N, Eberhardt MK, et al. Exposure of Myeloid Dendritic Cells to Exogenous or Endogenous IL-10 during Maturation Determines Their Longevity. *J Immunol*. 2007;178:7794-7804.
- 78 Suzuki T, Tahara H, Narula S, et al. Viral interleukin 10 (IL-10), the human herpes virus 4 cellular IL-10 homologue, induces local anergy to allogeneic and syngeneic tumors. *J Exp Med*. 1995;182:477-486.
- 79 DeBruyne LA, Li K, Bishop DK, et al. Gene transfer of virally encoded chemokine antagonists vMIP-II and MC148 prolongs cardiac allograft survival and inhibits donor-specific immunity. *Gene Ther*. 2000;7:575-582.
- 80 Qin L, Chavin KD, Ding Y, et al. Retrovirus-mediated transfer of viral IL-10 gene prolongs murine cardiac allograft survival. *J Immunol*. 1996;156:2316-2323.
- 81 Nast CC, Moudgil A, Zuo XJ, et al. Long-term allograft acceptance in a patient with posttransplant lymphoproliferative disorder: correlation with intragraft viral interleukin-10. *Transplantation*. 1997;64:1578-1582.
- 82 Carmody EE, Schwarz EM, Puzas JE, et al. Viral interleukin-10 gene inhibition of inflammation, osteoclastogenesis, and bone resorption in response to titanium particles. *Arthritis Rheum*. 2002;46:1298-1308.
- 83 Yang Z, Chen M, Wu R, et al. Suppression of autoimmune diabetes by viral IL-10 gene transfer. *J Immunol*. 2002;168:6479-6485.
- 84 Qin L, Ding Y, Tahara H, et al. Viral IL-10-induced immunosuppression requires Th2 cytokines and impairs APC function within the allograft. *J Immunol*. 2001;166:2385-2393.
- 85 Rickinson AB, Moss DJ. Human cytotoxic T lymphocyte responses to Epstein-Barr virus infection. *Annu Rev Immunol*. 1997;15:405-431.
- 86 Go NF, Castle BE, Barrett R, et al. Interleukin 10, a novel B cell stimulatory factor:

- unresponsiveness of X chromosome-linked immunodeficiency B cells. *J Exp Med.* 1990;172:1625-1631.
- 87 Mahot S, Sergeant A, Drouet E, et al. A novel function for the Epstein-Barr virus transcription factor EB1/Zta: induction of transcription of the hIL-10 gene. *J Gen Virol.* 2003;84:965-974.
- 88 Alcamì A. Viral mimicry of cytokines, chemokines and their receptors. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:36-50.

VIII. Anhang

VIII.1 Abkürzungsverzeichnis

BSA	Bovine Serum Albumine
CMV	Cytomegalie-Virus
DC	Dendritische Zellen
DC-SIGN	Dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FCS	Fetales Kälberserum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
GM-CSF	Granulozyten-Monozyten Koloniestimulierender Faktor
HCMV	Humanes Cytomegalie-Virus
iDC	Unreife dendritische Zellen
IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic assisted cell sorting
mDC	Reife dendritische Zellen
MFI	Mean Flourescence Intensity
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
PBMC	Periphere Mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphate Buffered Saline
PE	Phycoerythrin
PHA	Phytohemagglutinin L
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SEM	Standard Error Mean
TBS	Tris Buffered Saline

TMB	3,5,3',5'Tetramethylbenzidin
TLR	Toll-Like Rezeptor
TNF	Tumor Nekrose Faktor

VIII.2 Publikationsverzeichnis

Publikation

Raftery MJ, Wieland D, Gronewald S, Kraus AA, Giese T, Schonrich G. Shaping phenotype, function, and survival of dendritic cells by cytomegalovirus-encoded IL-10. *J Immunol.* 2004;173:3383-339

Kongressbeitrag

Raftery MJ, Wieland D, Gronewald S, Kraus AA, Muller D, Schonrich G. Immunosuppression of Human Dendritic Cells by cmvIL10. *Gesellschaft für Virologie, Jahrestagung 2003*

VIII.3 Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Prof. Schönrich und Herrn Dr. Raftery danken, die mir diese Arbeit und das Kennenlernen der medizinischen Forschung ermöglicht haben. Ich bedanke mich für die gute Betreuung, Geduld und englischen Humor.

Dann bedanke ich mich bei meiner Mitdoktorantin Steffi, die diese spannende Zeit in all ihren Höhen und Tiefen mit mir geteilt hat. Wir haben viel gelacht und hatten manch originellen Lösungsansatz.

Ich danke Uli, die mich freundlich ins Labor aufgenommen hat und mir den ein oder anderen Handgriff erklärt hat.

Und schließlich danke ich meiner Familie, die mich unterstützt hat.

VIII. 4 Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

VIII.5 Erklärung an Eides Statt

Ich, Dörte Wieland, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: „Die Wirkung des Epstein-Barr-Virus-kodierten Interleukin-10 auf humane dendritische Zellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.