Funktionelle Interaktion mesenchymaler Stammzellen und plasmazytoider dendritischer Zellen

Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

> vorgelegt von Ensel, Philipp Heinrich aus Oberwesel

> > Gießen 2018

Aus dem Zentrum für Transfusionsmedizin und Hämotherapie, unter der Leitung von Prof. Dr. med G. Bein, des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

> Gutachter: Prof. Dr. med. H. Hackstein Gutachter: Prof. Dr. med. S. Herold

Tag der Disputation: 19.10.2018

Inhaltsverzeichnis

1	Einfü	hrung	1
	1.1 I	Dendritische Zellen	1
	1.2 I	Plasmazytoide dendritische Zellen	4
	1.3 H	Clinische Bedeutung von pDC	9
	1.4 N	Aesenchymale Stammzellen	10
	1.5 I	mmunmodulation durch MSC	11
	1.6 H	Clinische Anwendung von MSC	13
	1.7 2	Zielsetzung	16
2	Mate	rial und Methoden	18
	2.1 N	Aaterialien und Geräte	18
	2.1.1	Antikörper	18
	2.1.2	Stimulantien	19
	2.1.3	Chemikalien	19
	2.1.4	Reagenziensätze	20
	2.1.5	Verbrauchsgegenstände	20
	2.1.6	Geräte und Software	21
	2.1.7	Humanes Probenmaterial	22
	2.2 I	<i>Aethoden</i>	23
	2.2.1	Kultivierung mesenchymaler Stammzellen	23
	2.2.2	Negativselektion von pDC	25
	2.2.3	Kokultur von MSC und pDC	27
	2.2.4	Stimulation und weitere Adjuvantien	30
	2.2.5	Transwell	30
	2.2.6	Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) zum quantitativen Nachweis von	
	Interf	eron α	31
	2.2.7	Fluoreszenz Bead Assay zum quantitativen Nachweis von IL6, IL8 und TNF $\boldsymbol{\alpha}$	32
	2.2.8	Durchflusszytometrie	33
	2.2.9	Zellzählung mittels Neubauerzählkammer und Sysmex KX-21N	34
	2.2.10	Statistik	35
3	Ergeb	nisse	36
	3.1 H	Reinheit der pDC	36

	3.2	IFN-α Produktion von pDC in MSC Kokultur	37
	3.3	IFN-α Produktion von pDC in MSC Kokultur in Transwell	38
	3.4	IFN-α Produktion nach COX-Inhibition	39
	3.5	IL-6, IL-8 und TNF-a Produktion in pDC und MSC Kokultur	40
	3.6	Oberflächenmarker von pDC in MSC- Kokultur	43
	3.7	Oberflächenmarker nach Klasse C CpG ODN-Stimulation	47
	3.8	PD-L1 Expression in pDC	50
4	Di	skussion	52
	4.1	Anreicherung von pDC	52
	4.2	Kultivierung von MSC	52
	4.3	Kokultur und Stimulation	53
	4.4	IFN-α Produktion von pDC in Kokultur mit MSC	53
	4.4	.1 IFN-α Produktion im Transwell	54
	4.4	2 IFN-α Produktion nach COX Inhibition	55
	4.5	Weitere Zytokine in pDC und MSC Kokultur	56
	4.5	5.1 IL-6 und IL-8	56
	4.5	5.2 TNF- α	57
	4.6	pDC Reifung in MSC Kokultur	58
	4.7	Tolerogene Funktionen	61
	4.8	Immunprivilegierung von MSC	62
	4.9	Immunstimulation durch MSC	62
	4.10	Ausblick	64
5	Zu	sammenfassung	66
6	Su	mmary	68
7	Ab	kürzungsverzeichnis	I
8	Lit	eraturverzeichnis	III
9	Ab	bildungsverzeichnis	XVII
10) ,	Fabellenverzeichnis	XIX
11	1]	Publikationsverzeichnis	XX
12	2]	Erklärung zur Dissertation	XXI
13	3	Danksagung	XXII
14	Ł]	Lebenslauf	XXIII

1 Einführung

Vorliegende Arbeit soll die Interaktion zweier Zelltypen beleuchten, die auf unterschiedliche Art und Weise wesentliche Funktionen des Immunsystems übernehmen: plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) und mesenchymale Stammzellen (MSC).

Beide Zellen erfahren stetig wachsende Verwendung als Zelltherapeutika. Die immunmodulatorische Kapazität von MSC wird besonders bei der Behandlung von Immunerkrankungen wie der *Graft– versus- Host- Disease* (GVHD) eingesetzt. pDC, als professionell antigenpräsentierende Zellen, hingegen spielen eine wachsende Rolle bei Zellvakzinierungen gegen Tumorerkrankungen.

Dieses weitreichende therapeutische Potential macht pDC und MSC zum Gegenstand vielseitiger Forschung. Die Interaktion dieser Zellen, insbesondere in humanen Modellen, ist allerdings noch nicht vollständig verstanden. Dieser Frage widmet sich vorliegende Arbeit.

1.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) sind ein wesentlicher Bestandteil der angeborenen Immunabwehr. Sie haben die Fähigkeit zur Aufnahme und Prozessierung extrazellulärer und intrazellulärer Antigene sowie Teile infizierter Zellen. Sie exprimieren diverse *Tolllike*- (TLR) und anderen Rezeptoren. Sie sind in der Lage phagozytierte Antigene sowohl auf MHC II-Komplexen zu präsentieren als auch auf MHC I-Komplexen zu kreuzpräsentieren um eine antigenspezifische T-Zell Proliferation zu induzieren. Sie spielen somit eine wesentliche Rolle als Mittler der angeborenen und erworbenen Immunabwehr bei antibakteriellen, antiviralen, antimykotischen und antiparasitären Entzündungsreaktionen (Murphy et al. 2009).

Erstmals beschrieben wurden DC und ihre weitreichenden Funktionen für die Immunabwehr von Ralf Steinmann 1973 (Steinman & Cohn 1973). Dieser erhielt für seine darauffolgenden Erkenntnisse den Nobelpreis für Physiologie im Jahr 2011. DC lassen sich vereinfacht in drei Gruppen unterteilen: konventionelle DC (cDC), pDC (siehe 1.2) und aus Monozyten entwickelte DC (moDC). cDC sind jene dendritischen Zellen, welche sich nach Worbs et al. als "Prototyp der Antigenpräsentation" und somit der T-Zell-Aktivierung bezeichnen lassen (Worbs et al. 2016). Sie finden sich in unreifer Form in vielen peripheren Organen und sind in der Lage nach Antigenkontakt in sekundär lymphatische Organe, wie Lymphknoten, zu migrieren. Erhalten sie darüber hinaus eine Reihe weiterer Trigger, wie die Stimulation von TLR, durchlaufen sie einen Reifungsprozess, der sie über die vermehrte Expression verschiedener primär- und kostimulatorischer Moleküle des T-Zell Primings zu einer professionell Antigenpräsentierenden Zelle reifen lässt (Banchereau & Palucka 2005). Unreife cDC zeichnen sich durch eine Expression von MHC-II sowie des Integrins CD11c aus. In dieser Form sind sie nur eingeschränkt zur Antigenpräsentation fähig. Bei dem genannten morphologischen Reifungsprozess wird MHC-II aus dem endozytischen System mobilisiert und verstärkt an der Oberfläche exprimiert. Zugleich werden weitere Oberflächenmarker, wie die genannten kostimulatorischen CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), CD40 (TNFRSF-5), sowie PD-L1 (Programmed death- Ligand 1) und PD-L2, ebenfalls verstärkt produziert und exprimiert (Steinman 2012).

Unreife und gereifte DC nehmen verschiedene Aufgaben in unterschiedlichen Phasen der Immunantwort wahr. In ihrer unreifen Form besteht ihre Hauptaufgabe in der Antigenaufnahme. Fehlen die angesprochenen Triggermechanismen, sind sie zwar in der Lage die aufgenommenen Antigene über MHC- Komplexe zu präsentieren, durch den Mangel an kostimulatorischen Molekülen wie CD80, CD86 oder CD40 bleibt ein antigenspezifisches T-Zell Priming allerdings Vielmehr bewirkt die aus. Antigenpräsentation ohne Kostimulation eine Proliferation naiver T-Zellen mit nachfolgender Apoptose oder Differenzierung in regulatorische T-Zellen (siehe Abbildung 1a) (Steinman et al. 2003; Banchereau & Palucka 2005). Unreife DC haben somit weniger Funktionen in der akuten Entzündungsreaktion als in der Entwicklung tolerogener Immunprozesse.

Reife DC (s.o.) hingegen exprimieren in großem Maße MHC Komplexe zur Präsentation und Kreuzpräsentation von Antigenen. Durch die Expression kostimulatorischer Moleküle sind sie zudem in der Lage, das Priming antigenspezifischer T-Effektorzellen, sowohl CD4als auch CD8- positiver, zu induzieren (siehe Abbildung 1b). Es spielen in beiden Fällen zwei Hauptsignale eine Rolle (Mescher et al. 2006; Boesteanu & Katsikis 2009). Signal1: Zunächst erfolgt die Antigenpräsentation, je nach Antigen und Signalweg, über MHC I oder MHC II Komplexe an der Oberfläche der antigenpräsentierenden Zelle. Diese werden von spezifischen T-Zell-Rezeptoren (TZR) von CD8 bzw. CD4 positiven T-Lymphozyten erkannt. Signal 2: Im Falle gereifter DC (s.o.) erfolgt das zweite, kostimulatorische Signal, bei dem die Domänen CD80 und CD86 zunächst an das Antigen CD28 auf den entsprechenden T-Lymphozyten binden. Dies bewirkt eine antigenspezifische klonale Expansion der T-Lymphozyten (Lanier et al. 1995; Fuse et al. 2008). Daneben wird eine verstärkte Expression des cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4 (CTLA-4) auf den Lymphozyten induziert. Dieses bindet wiederum, mit einer höheren Affinität als CD28, an die kostimulatorischen CD80 und CD86. Die Aktivierung von CTLA-4 fungiert unterdessen als inhibitorisches Signal auf die T-Zell Proliferation, was im Sinne eines negativen Feedback eine überschießende Proliferation verhindert (Egen et al. 2002). Ein weiteres wesentliches kostimulatorisches Signal ist die Bindung des CD40 auf DC an CD40L (CD154) auf der Oberfläche von T-Zellen. Dies führt zur Unterhaltung und Unterstützung der Antigenpräsentation und T-Zell Proliferation (O'Sullivan & Thomas 2002). Hierbei handelt es sich um grundlegenden Signale im Priming naiver CD4- und CD8- T-Zellen, jedoch sind sie darüber hinaus auch in der Reaktivierung und Proliferation von CD4- und CD8- Memory T-Zellen wesentlich (Boesteanu & Katsikis 2009).



Abbildung 1 Übersicht über die unterschiedlichen Funktionen reifer und unreifer DC

a) unreife DC sind spezialisiert auf die Antigenaufnahme und die konsekutive Expression auf MHC Komplexen. Durch den Mangel an kostimulatorischen Molekülen proliferieren naive T-Zellen proliferieren und gehen infolgedessen entweder wieder unter und differenzieren sich in regulatorischen T-Zellen. b) diverse Triggermechanismen induzieren einen Reifungsprozess in DC. Kostimulatorische Komplexe wie CD80/CD86 werden exprimiert und ermöglichen das Priming antigenspezifischer T-Lymphozyten. Darüber hinaus produzieren DC eine Reihe von Zytokinen, die eine Reihe weiterer Immunprozesse, wie die Entwicklung von NK-Zellen beeinflussen (Banchereau & Palucka 2005)

1.2 Plasmazytoide dendritische Zellen

pDC sind eine Subpopulation von DC (siehe 1.1), die in geringer Anzahl im peripheren Blut zu finden ist. Sie machen lediglich ca. 0,3-0,5% aller mononuklerären Zellen des peripheren Blutes (PBMC) aus (Ueda et al. 2003). Erstmals beschrieben wurden sie in den fünfziger Jahren und erregten Aufsehen durch ihre hohe Produktion an Interferon-α (IFN- a) im Rahmen antiviraler Immunreaktionen. Getriggert wird dies über die Stimulation der TLR-9 und -7, die pDC die Erkennung fremder Nukleinsäuren ermöglichen (Swiecki & Colonna 2015; Cella et al. 1999). pDC sind bezüglich der *lineage*-Marker CD3, CD19, CD14, CD16, CD34 sowie CD20 negativ und exprimieren , anders als cDC, CD11c nur schwach (Facchetti et al. 2003). Sie präsentieren die *Blood dendritic Cell*-Antigene BDCA-2 und BDCA-4 sowie CD4, CD68 und den IL-3 Rezeptor CD123 (Swiecki & Colonna 2015; Dzionek et al. 2000). Darüber hinaus exprimieren sie, besonders nach Stimulation, MHC-I und -II (HLA-DR) Komplexe sowie die kostimulatorischen Domänen CD80, CD86 und CD40. Damit sind sie ähnlich den cDC (siehe 1.1) zur Antigenpräsentation und gleichzeitig zum T-Zell Priming fähig (Villadangos & Young 2008).

Die immunologische Funktion der pDC resultiert vor allem aus ihrer Fähigkeit, virale Nukleinsäuren über die in endosomalen Kompartimenten lokalisierten TLR-7 und -9 zu detektieren. So erkennt der TLR-7 Einzelstrang-RNA (ssRNA), vor allem Guanosin- und Uridin- reiche, sowie Imidazoquinolin-Derivate (Blasius & Beutler 2010; Smits et al. 2008). Bei Letzterem handelt es dich um trizyklische Adenosin-Analoga. Insbesondere die Derivate Resiquimod (R848), Imiquimod und Gardiquimod fungieren als potente TLR-7 Agonisten (Blasius & Beutler 2010; Buitendijk et al. 2013). TLR-9 hingegen detektieren unmethylierte, CpG-Motiv reiche DNA Sequenzen, wie sie bei Vertebraten lediglich in mitochondrialem, nicht aber in nukleärem Erbgut zu finden sind. In viraler und bakterieller DNA finden sich solche Motive häufiger (Krieg et al. 1995).

Die Stimulation von TLR-7 und -9 resultiert in der Produktion großer Mengen an IFN- α oder weiterer proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (TNF)- α , IL-6 und IL-12. Die Produktion von IFN- α nach TLR Stimulation erfolgt über die Aktivierung des *myeloid differentiation primary response protein 88* (MYD88) - IRF-7 Signalweges (siehe Abbildung 2b). pDC produzieren konstitutiv hohe Mengen des Transkriptionsfaktors *Interferon-regulatory-Factor-7* (IRF-7) (Izaguirre et al. 2003) und können somit schon in der Frühphase der viralen Infektion hohe Mengen des Zytokins produzieren. Die Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine (s.o.) nach TLR Stimulation erfolgt über den MYD88-*nuclear factor -* $\varkappa B$ (NF- $\varkappa B$) - Signalweg (siehe Abbildung 2a).



Abbildung 2 Die verschiedenen Signalwege nach TLR-7&-9 Stimulation von pDC.

Stimulation des jeweiligen Rezeptors ruft eine Konformitätsänderung hervor, sodass eine Bindung an das Adapterprotein MyD88 möglich wird. a) MyD88 wiederum bindet daraufhin an IRAK-4, welches IRAK-1 und -2 phosphoryliert. Hierdurch werden TRAF-6 aktiviert und, über Zwischenschritte, die Transskriptionsfaktoren AP1, IRF5 und NF-xB freigesetzt. Diese induzieren die Transkription proinflammatorischer Zytokine. b) MyD88 bindet IRAK-4, welches dann über den alternativen Weg u.a, IRAK-1 und IKK a aktiviert. Diese wiederum phosphorylieren und aktivieren IRF-7, der die Transkription großer Mengen an IFN a induziert. TLR= toll like receptor, MyD88=myeloid differenciation primary responce gene 88, IRAK=interleukin-1 receptor associated kinase, TRAF= TNF receptor associated factor, IKK=IxB Kinase, IRF= Interferon regulatory factor (modifiziert aus Blasius & Beutler 2010)

Wann nach TLR-Stimulation der MyD88-IRF-7- oder der MyD88-NF-*x*B-Signalweg eingeschlagen wird, ist noch nicht vollständig verstanden. Es hängt von den jeweiligen Liganden ab und davon, in welchen Kompartimenten sich die TLR-Rezeptoren zum Zeitpunkt der Stimulation befinden (Swiecki & Colonna 2015).

Ein Beispiel für die Abhängigkeit der Funktion von pDC von verschiedenen Liganden ist die Stimulation von TLR-9 mit Cytosin-p-Guanin-Oligodesoxynukleotiden (CpG-ODN, p= Phosphatbrücke). Hierbei handelt es sich um DNA-Multimere, die einen hohen Anteil an CpG Motiven beinhalten. Sind diese unmethyliert, fungieren sie als Liganden des TLR-9 (s.o.). Synthetische CpG-ODN lassen sich je nach Nukleotidfolge, Struktur der Phosphatbrücken und Sekundärstrukturen in verschiedene Klassen unterteilen. Klasse A CpG ODN (z.B. CpG ODN 2216) zeichnen sich durch ein 3' Poly G- Ende sowie ein solitäres CpG Motiv aus. Klasse B CpG ODN (z.B. CpG ODN 2006) hingegen weisen mehrere CpG Motive sowie ein Phosphorothioat- Rückgrat auf. Diese strukturellen Unterschiede führen dazu, dass Klasse A CpG ODN, im Gegensatz zu jenen der Klasse B, zur Bildung von Aggregaten neigen. Hierdurch verbleiben A- CpG ODN nach Endozytose vor allem in frühen Endosomen, während B- CpG ODN eher in späten Endosomen und Lysosomen zu finden sind (Guiducci et al. 2006; Blasius & Beutler 2010). Diese kompartimentelle Trennung der TLR-9 Liganden führt bei Stimulation des Rezeptors zu unterschiedlichen Signalkaskaden. Klasse A CpG ODN mit längerer Verweildauer in frühen Endosomen induzieren stärker den MyD-IRF-7 Signalweg, woraus eine große Menge an IFN-α resultiert. Klasse B CpG ODN in Endolysosomen hingegen zeigen eine Aktivierung des MyD88-NF- \varkappa B-Signalweges und somit die Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine (s.o.) (Guiducci et al. 2006; Honda et al. 2005; Swiecki & Colonna 2015). Klasse C CpG ODN (z.B. CpG ODN M362) finden sich gleichsam sowohl in frühen als auch in späten Endosomen wieder. Sie induzieren, wie Klasse A CpG ODN, hohe Mengen an IFN- α , zeigen aber auch die Produktion anderer proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-6 und IL-12 (Libri et al. 2009; Guiducci et al. 2006).

Neben der Produktion verschiedener Zytokine induziert die Stimulation über TLR einen Reifungsprozess in pDC, vergleichbar dem von cDC (siehe 1.1). Es werden vermehrt MHC-I und -II sowie kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 oder CD40 an der Oberfläche präsentiert. Hierdurch werden pDC zu potenten antigenpräsentierenden Zellen und sind in der Lage, die Proliferation von T-Lymphozyten zu induzieren (Villadangos & Young 2008; Swiecki & Colonna 2015). Wie auch bei der Produktion von Zytokinen (s.o.) gibt es hinsichtlich dieses Reifungsprozesses Unterschiede bei unterschiedlichen TLR-Liganden. Dies zeigt sich ebenso bei der Verwendung verschiedener Klassen synthetischer CpG ODN (s.o.) zur TLR-9 Stimulation. A- CpG ODN induzieren die Produktion von IFN-α, eine Reifung in o.g. Sinne bleibt aus. Stimulation mit B- CpG ODN hingegen induziert neben der Produktion verschiedener Zytokine eine vermehrte Expression von MHC- und kostimulatorischen Molekülen, allerdings eine geringere Produktion von IFNa. C-CpG ODN zeigen sowohl eine Produktion von IFN-a und proinflammatorischen Zytokinen als auch eine Reifung von pDC (Libri et al. 2009; Guiducci et al. 2006). Tabelle 1 zeigt die beschriebenen Wirkungen der verschieden CpG ODN Klassen auf pDC in der Übersicht.

	A- CpG ODN	B- CpG ODN	C- CpG ODN
IFN-a -Produktion	+	-	+
Produktion anderer			
proinflammatorischer	-	+	+
Zytokine (TNFa, IL6,			
IL12)			
Reifung	-	+	+

Tabelle 1 Übersicht über verschiedene Wirkungen (links) unterschiedlicher Klassen synthetischer CpG ODN (oben) als TLR-9 Liganden auf pDC

pDC spielen somit eine entscheidende Rolle in der angeborenen und adaptiven Immunabwehr insbesondere bei viralen Infektionen. Über die Produktion großer Mengen an IFN-α sind sie in der Lage eine Reihe weitere Effektorzellen, wie NK Zellen, cDC oder B-Lymphozyten, zu aktivieren. Die Expression von MHC-I und -II sowie kostimulatorischen Molekülen ermöglichen das Primimg naiver CD4 T-Zellen und die Aktivierung von CD4 Memoryzellen. Auch die Kreuzpräsentation und das Priming sowie die Aktivierung von CD8 positivien, zytotoxischen T-Zellen (CTL) konnte nachgewiesen werden (Swiecki & Colonna 2015; Reizis et al. 2011; Villadangos & Young 2008; Tel, Schreibelt, et al. 2013).

Neben den beschriebenen Funktionen von aktivierten pDC in der Immunabwehr haben naive bzw. alternativ aktivierte pDC, ähnlich den cDC (siehe 1.1), auch eine Reihe von Funktionen in der Toleranzentwicklung (Swiecki & Colonna 2015). Ein Beispiel für eine alternative Stimulation ist die Bindung des durch pDC exprimierten PD-L1 an PD-1 (*programmed death protein-1*) u.a. auf aktivierten T-Lymphozyten. Dies führt einerseits zu einer verminderten T-Zell Proliferation sowie einer eingeschränkten Zytokinausschüttung (Freeman et al. 2000; Diana et al. 2011). Tokita et al. zeigten, dass ein hohes Ausmaß an PD-L1 Expression von pDC in Patienten nach Lebertransplantation eine erhöhte Anzahl an regulatorischen T-Zellen und gleichzeitig eine suffizientere Toleranzentwicklung für das Transplantat nach sich ziehen (Tokita et al. 2008). Somit ist auch in vivo von einer tolerogenen Bedeutung von pDC auszugehen.

1.3 Klinische Bedeutung von pDC

Die in 1.2 beschriebenen immunologischen Wirkmechanismen machen pDC zum Gegenstand vielfältiger klinischer Studien. Sie spielen eine Rolle in der Entwicklung neuer pathophysiologischer Konzepte diverser Krankheiten sowie als Ziel neuer immuntherapeutischer Ansätze.

Funktion pDC haben eine wesentliche in der Pathopysiologie diverser Autoimmunerkrankungen mit Typ I-IFN Signatur. Ein Beispiel hierfür ist der Systemische Lupus Erythematodes (SLE). pDC konnten, als stark IFN-a produzierende Zellen (siehe 1.2), als Urheber dieses Zytokinprofils identifiziert werden. Sie finden sich im peripheren Blut erkrankter Patienten signifikant reduziert, in den lupustypischen Hautläsionen jedoch vermehrt wieder (Farkas et al. 2001). Hierbei spielen Komplexe aus für den SLE pathognomonischen Antikörpern gegen Zellkernbestandteile wie dsDNA (ANA) und freien Nukleinsäuren eine wesentliche Rolle. Sie binden als Liganden an TLR-9 und -7 der pDC und triggern somit die Produktion von IFN-a. Urheber dieser freien Nukleinsäuren sind neutrophile Granulozyten, die diese gemeinsam mit weiteren Strukturproteinen freisetzen und so die Stimulation von pDC induzieren (Båve et al. 2003; Barrat et al. 2005; Means et al. 2005). Ähnliche pathophysiologische Prozesse, in denen pDC über Komplexe aus endogenen Nukleinsäuren stimuliert werden, finden sich auch in einer Reihe weiterer Autoimmunerkrankungen mit Typ 1-IFN Signatur. Beispiele hierfür sind Psoriasis und Typ 1 Diabetes Mellitus (Reizis et al. 2011; Swiecki & Colonna 2015).

Bei der Blastischen Plasmazytoiden Dendritischen Zellneoplasie (BPDCN) handelt es sich um eine seltene Hämoblastose, die den akuten myeloischen Leukämien (AML) zugerechnet wird. Hierbei handelt es sich um eine maligne Entartung von pDC-Vorläuferzellen. Hauptmanifestationen sind Haut, peripheres Blut und Knochenmark. Untherapiert verläuft die Erkrankung rapide und oftmals fatal. Allerdings erleiden auch nach radio- und/oder chemotherapeutischer Behandlung eine Vielzahl der Patienten innerhalb von zwei Jahren ein Rezidiv (Feuillard et al. 2002).

pDC sind darüber hinaus auch potentielle Agenzien für immuntherapeutische Anwendungen im Rahmen von antitumoraler Zellvakzinierung. So konnte gezeigt werden, dass ex vivo aktivierte, mit Tumorantigenen beladene autologe pDC bei Reinjektion einen positiven Effekt auf das Outcome von Patienten mit metastasiertem malignen Melanom haben können (Tel, Aarntzen, et al. 2013). Es ergeben sich sogar Hinweise, dass sie hinsichtlich des Primings von CD8 T-Zellen ebenbürtig zu cDC sind und somit aufgrund ihres beschriebenen Zytokinprofils ansprechende Kandidaten für weitere Forschung als Zelltherapeutikum darstellen (Tel et al. 2012).

1.4 Mesenchymale Stammzellen

Mesenchymale Stamm- oder Stromazellen des Knochenmarks (MSC) sind vor allem an der Bildung des interstitiellen Gewebes des Knochenmarks beteiligt. Hier übernehmen sie eine Vielzahl von Aufgaben, wie die Organisation von Stammzellnischen, die Steuerung der Stammzellaktivität, sowie die Modulation und Regulation von Immunantworten. Weiterhin sind sie aufgrund ihres Differentierungspotentials und ihres immunologischen Potentials an diversen Prozessen der Gewebereparatur beteiligt (Uccelli et al. 2008).

Erstmals beschrieben wurden MSC von Friedenstein et al. als fibroblastenähnliche Stromazellen im Knochenmark von Mäusen (Friedenstein et al. 1974). 2006 erfolgte durch die *International Society for Cellular Therapie* (ISCT) die erstmalige Definition von MSC anhand morphologischer und funktioneller Eigenschaften (Dominici et al. 2006). Hiernach sind MSC in Standardkulturumgebung plastikadherent. Weiterhin exprimieren sie die Oberflächenmarker CD105, CD73 und CD90. Die hämatopoetischen Marker CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79α oder CD19 und HLA-DR sind hingegen schwach bzw. gar nicht exprimiert. Darüber hinaus zeigen sie multipotente Eigenschaften einer Stammzelle und sind in der Lage sich in Zellen vor allem der mesodermalen Linie, wie Osteoblasten, Chondroblasten und Osteozyten, zu differenzieren. Aber auch ihre Fähigkeiten der Differenzierung in Zellen nicht mesodermalen Ursprungs sind beschrieben. Chen et al. zeigten hierzu erstmals die Fähigkeit von Ratten-MSC sich in vitro in Pankreas-Betazellen zu differenzieren (Chen et al. 2004). MSC lassen sich aus Knochenmark, Nabelschnurblut, Fettgewebe sowie in kleineren Teilen aus Leber, Lunge sowie peripherem Blut extrahieren (Campagnoli et al. 2001; Zuk et al. 2002).

MSC spielen eine große Rolle in der Bildung des Mikromilieus hämatopoetischer Stammzellen (HSC) im Knochenmark. Dieses teilt sich in eine endosteale und eine perivaskuläre bzw. perisinusoidale Nische (Wilson & Trumpp 2006). Erstere wird wesentlich durch Osteoblasten, Adipozyten und retikuläre Zellen gebildet und organisiert, welche sich primär aus MSC differenzieren, sodass diese hierbei wesentlich involviert sind (Shi 2012). Die perivaskuläre Nische wird neben den endothelialen Zellen der Gefäße durch naive MSC organisiert (Wilson & Trumpp 2006). Hierbei haben sie u.a. eine antiproliferative und antiapoptotische Wirkung auf HSC und sorgen somit für deren Unterhalt und eine geregelte Hämatopoese (Shi & Gronthos 2003; Kiel & Morrison 2008; Méndez-Ferrer et al. 2010).

1.5 Immunmodulation durch MSC

Neben der organisatorischen und antiproliferativen Funktion im Knochenmark sind darüber hinaus eine Reihe immunregulatorischer Eigenschaften von MSC bekannt. So nehmen sie Einfluss auf Zellen sowohl der angeborenen, als auch der erworbenen Immunabwehr und vermitteln dies über diverse lösliche sowie zellkontaktabhängige Mechanismen (Shi 2012). Erstmals beschrieben wurde der Einfluss von MSC auf Immunzellen im Jahr 2002 mit dem Nachweis der hemmenden Wirkung von MSC auf die Proliferation von T-Lymphozyten sowohl in vitro (Nicola et al. 2002) als auch in vivo (Bartholomew et al. 2002).

Daraufhin wurden vermehrt die Einflüsse von MSC auf weitere immunologische Prozesse beschrieben. So zeigt sich die Entwicklung von cDC und moDC aus Monozyten oder CD34 positiven Progenitorzellen in Anwesenheit von MSC beeinträchtigt (Nauta et al. 2006). Auch ihre Funktionen hinsichtlich der Zytokinproduktion und Antigenpräsentation werden durch MSC signifikant reduziert (Nauta et al. 2006; Aggarwal & Pittenger 2005), sodass eine verminderte Immunantwort die Folge ist. Der Einfluss von MSC auf pDC ist bisher erst in wenigen Studien untersucht. Bisherige Ergebnisse stärken allerdings diese Schlussfolgerung. Die Entwicklung muriner pDC zeigt sich durch MSC beeinträchtigt (Hackstein et al. 2016) sowie die Produktion des immunsuppressiven Interleukin 10 (IL10) in humanen pDC durch MSC verstärkt (Aggarwal & Pittenger 2005).

Darüber hinaus hemmen MSC die programmierte Apoptose neutrophiler Granulozyten, den oxidativen Burst (Raffaghello et al. 2008) sowie die Aktivität natürlicher Killerzellen(NK-Zellen) (Spaggiari et al. 2006) und modulieren eine Reihe weiterer immunologischer Prozesse.

Vermittelt werden diese immunmodulatorischen Effekte über diverse lösliche und zellkontaktabhängige Faktoren. So spielen beispielsweise bei der Inhibition der Proliferation von T-Lymphozyten vor allem diverse duch MSC sezernierte, lösliche Faktoren eine Rolle. Insbesondere der Einfluss von Transforming growth factor β (TGF-Hepatocyte factor (HGF), Indolamin-2,3 Dioxygenase β), growth (IDO), Stickstoffmonoxid (NO) und Prostaglandin E2 (PGE2) wurden als ursächlich hierfür beschrieben (da Silva Meirelles et al. 2009). Vor allem PGE2 ist an vielen immunregulatorischen Prozessen von MSC beteiligt. Es trägt neben der antiproliferativen Wirkung auf Lymphozyten auch zu der hemmenden Wirkung auf NK-Zellen, auf Makrophagen und der Modulation dendritischer Zellen, sowohl myeloider als auch plasmacytoider, bei (da Silva Meirelles et al. 2009; English 2013; Shi 2012; Uccelli et al. 2008). Seine Synthese erfolgt aus Arachidonsäure über die Cyclooxygenasen 1 und 2 (COX-1 und -2) und Prostaglandin Synthasen. COX-2 wird in MSC konstitutiv exprimiert woraus eine konstitutive Produktion und Freisetzung von PGE2 hervorgeht (English 2013; Najar et al. 2010; Arikawa et al. 2004).

MSC sind darüber hinaus selbst Adresse verschiedenster immunologischer Regelkreise. So exprimieren sie eine Reihe von Rezeptoren, durch die ihre Differenzierung und das Ausmaß der Immunmodulation reguliert werden. Es finden sich auf murinen und humanen Zellen die TLR-1-6 (van den Berk et al. 2009; Delarosa et al. 2012). Für die Steuerung der immunologischen Wirkung spielen vor allem TLR-2, -3 und -4 eine besondere Rolle. So bewirkt eine Stimulation mit TLR-3-Liganden eine verstärkte Produktion und Sekretion von PGE2 und eine Verstärkung immunsuppressiver Effekte (English 2013; Waterman et al. 2010). Ähnliche Effekte zeigen sich nach der Stimulation mit Interferon γ (IFN- γ) und TNF- α (English et al. 2007). Nach der Stimulation mit TLR-4-Liganden zeigt sich allerdings eine verminderte Produktion von PGE2 und vielmehr eine Verstärkung immunologischer Prozesse. Waterman et al. sprechen in diesem Rahmen von einer Polarisation von MSC in anti- und proinflammatorische Subsets, je nach Stimulation und Phase der Immunabwehr (English 2013; Waterman et al. 2010). Ein weiteres, an diversen immunologischen Prozessen durch MSC beteiligtes Zytokin ist IL-6. Es spielt ebenfalls bei der Beeinflussung dendritischer Zellen sowie neutrophiler Granulozyten und einer Reihe weiteren Prozessen eine Rolle (Raffaghello et al. 2008; Djouad et al. 2007; Nauta et al. 2006). Es wird neben verschiedenen Zytokinen, wie PGE2, IL-8, TNF- α und G-CSF konstitutiv durch MSC produziert und ist ebenso wie PGE2 durch Stimulation spezifischer TLR-Liganden, besonders TLR-2, induzierbar (Pevsner-fischer et al. 2007; Majumdar et al. 2000; Kim et al. 2005; Haynesworth et al. 1996; Sumanasinghe et al. 2009).

Neben den beschriebenen löslichen Faktoren spielen bei der Immunmodulation durch MSC auch Zellkontakte eine wesentliche Rolle. Insbesondere der Notch Signalweg ist hier bei einer Reihe von Prozessen, wie der hemmenden Wirkung auf die Aktivierung von cDC beteiligt (Li et al. 2008).

O.g. immunmodulatorische Wirkungen lassen sich nicht nur bei autologer, sondern auch bei allogener Anwendung beobachten. Als Grund hierfür wird eine Immunprivilegierung von MSC in vivo diskutiert, die dafür sorgt, dass die beschriebenen immunsuppressiven Prozesse die gegen MSC gerichtete alloantigen- spezifische Immunantwort überwiegen. Letztere scheint daneben schwach ausgeprägt zu sein. Dies liegt an der schwachen Expression von MHC-I und -II sowie der kostimulatorischen Oberflächenproteine CD80, CD86 und CD40. Zwar verstärkt eine Vorbehandlung von MSC mit IFN- γ die Expression von MHC-Molekülen, da aber keine Verstärkung der kostimulatorischen Signale erfolgt, ist die resulierende Alloimmunantwort schwach (Tse et al. 2003). Das Ausmaß, die genaue Ursache sowie die in vivo Relevanz dieser Immunpriviligierung bleiben indes Gegenstand zahlreicher Studien (vgl. 4.8) (Griffin et al. 2010).

1.6 Klinische Anwendung von MSC

Aufgrund ihrer Fähigkeit zur Gewebereparatur und ihren antiproliferativen und immunregulatorischen Eigenschaften sind MSC Gegenstand zahlreicher klinischer Studien mit vielfältigen Zielsetzungen. Ein besonderer Vorteil der Anwendung von MSC als Zelltherapeutikum ist die Möglichkeit einer HLA-inkompatiblen allogenen Applikation. Dies ermöglicht ihre geringe Immunogenität (siehe 1.5 und 4.8). Das regenerative Potential der MSC gründet auf ihrer Fähigkeit sich in Zellen vor allem der mesodermalen Linie zu differenzieren, sowie diverse Reparaturmechanismen in verschiedenen Geweben unterhalten zu können (siehe 1.4) (Pittenger et al. 1999). Somit wird der klinische Nutzen auf diverse Erkrankungen, welche Zellen dieses Ursprungs betreffen, untersucht. Die Mehrzahl der Studien zielt hierbei auf die Differenzierung von MSC in Osteozyten und Chondrozyten. Orozco et al. zeigten im Rahmen einer Pilotstudie an zwölf Patienten mit Gonarthritis eine deutliche Verbesserung der Gelenkfunktionalität sowie der Knorpelqualität nach intraartikulärer Injektion von autologen MSC (Orozco et al. 2013). Auch in der Therapie angeborener Knochenerkrankungen erfahren MSC Anwendung. Le Blanc et al. berichteten von der Transfusion HLA inkompatibler MSC bei einem weiblichen Fetus mit schwerer Osteogenesis imperfecta in utero. Postnatal zeigte die Patientin keine Immunreaktionen gegen Spenderantigene. In den folgenden ersten zwei Lebensjahren wurden lediglich zwei Frakturen und eine Verbesserung der Knochenstruktur berichtet (Le Blanc et al. 2005).

Darüber hinaus untersuchen eine Reihe von Studien den möglichen therapeutischen Nutzen in der Behandlung kardiovaskulärer Erkrankungen. In einer Phase I Studie von Friis et al. konnte neben dem Nachweis der therapeutischen Sicherheit bei intramyokardialer Applikation von MSC bei Patienten mit refraktärer Angina Pectoris eine signifikante Verbesserung der linksventrikulären Ejektionsfraktion (LVEF) sowie des klinischen Beschwerdebildes der Patienten beobachtet werden (Friis et al. 2011). In einer Studie von Lee et al. wurde auch bei Patienten nach akutem Myokardinfarkt durch intrakoronare Infiltration der betroffenen Koronararterie mit MSC eine signifikante Verbesserung der LVEF bei Fehlen therapielimitierender Nebenwirkungen erreicht (Lee et al. 2014).

Ein weiteres Feld der möglichen klinischen Anwendung von MSC ist die Behandlung neurologischer Erkrankungen. Yamout et al. beobachteten im Rahmen einer Phase I Studie eine klinische Besserung nach Behandlung von Patienten mit multipler Sklerose mittels intrathekaler Injektion autologer MSC. Eine bildmorphologische Besserung der Erkrankung konnte nicht nachgewiesen werden (Yamout et al. 2010). Im Rahmen einer weiteren Phase I Studie behandelten Karussis et al. Patienten mit Multipler Sklerose und Amyotropher Lateralsklerose mittels intrathekaler und intravenöser Injektion Magnetbead- gelabelter MSC. Sie konnten MR-morphologisch eine Migration der MSC in Meningen, Subarachnoidalraum und Rückenmark nachweisen und bei einigen Patienten eine klinische Stabilisierung und Besserung der jeweiligen Erkrankung feststellen (Karussis et al. 2011).

Erstmals beschrieben wurde ein klinischer Nutzen der immunologischen Kapazität von Le Blanc et al. in der Behandlung einer steroidrefraktären GVHD bei einem neunjährigen Jungen nach allogener Stammzelltransplantation bei akuter lymphatischer Leukämie. Dieser zeigte im 1- Jahres - Follow up eine deutliche klinische Response ohne therapiebedingte Toxizitäten (Le Blanc et al. 2004). Es folgten eine Reihe von Phase I und II Studien. Zhao et al. zeigten beispielsweise bei der Behandlung von Patienten mit steroidrefrakträrer GVHD eine signifikant verbesserte klinische Response und gleichzeitig Immunmodulation, wie die erhöhte Anzahl von regulatorischen T-Zellen, im Vergleich zur Kontrollgruppe (Zhao et al. 2015). Mittlerweile erfolgte die Zulassung von Prochymal*, einem Knochenmark-MSC Präparat von Osiris (Maryland, USA), in Kanada und Neuseeland für die Behandlung der GVHD für Kinder unter 18 Jahren (Cyranoski 2012) sowie von Temcell® (JCR Pharmaceuticals Co. Ltd., Ashiya, Japan) in Japan für die Behandlung der GVHD nach Stammzelltransplantation (Miyamura 2016). Eine multizentrische Phase III Studie zur Behandlung steroidrefraktärer GVHD mit Prochymal® scheiterte zwar an ihrem primären Endpunkt, der kompletten Remission für 28 Tage und zeigte keine signifikante Überlegenheit der Therapie mit MSC im Vergleich zur Kontrollgruppe bezüglich der Response. Allerdings konnte eine signifikante Verbesserung der viszeralen Manifestationen erreicht werden (Martin et al. 2010). Eine Subanalyse aller pädiatrischen Patienten derselben Studie ergab eine signifikant höhere Response mit einer deutlichen Verbesserung der 100 Tage Überlebensrate in dieser Patientengruppe (Szabolcs et al. 2010). Auf diesen Ergebnissen gründeten die o.g. Zulassungen für Kanada und Neuseeland.

1.7 Zielsetzung

MSC sind als Zellen des menschlichen Knochenmarks an der Bildung des interstitiellen Gewebes und der Organisation von Stammzellnischen beteiligt (Uccelli et al. 2008; Wilson & Trumpp 2006). Ihr hohes Differenzierungspotential befähigt sie an Reparaturprozessen diverser Gewebetypen teilzuhaben. Sie üben darüber hinaus auf diverse Zellen der Immunabwehr diverse immunregulatorische, vor allem -supprimierende Wirkungen aus. Hierzu zählen u.a. Lymphozyten, Granulozyten, NK-Zellen und auch DC (Bartholomew et al. 2002; Spaggiari et al. 2006; Aggarwal & Pittenger 2005; Raffaghello et al. 2008). Diese vielfältigen Funktionen mach MSC zu einem interessanten und vielversprechenden Zelltherapeutikum in vielen Szenarien (siehe 1.6).

pDC sind eine DC-Subpopulation und zeichnen sich durch eine starke Produktion von IFN-α bei antiviralen Immunreaktionen aus. Durch ihre exklusive Expression der TLR-7 und -9 können sie durch freie Nukleinsäuren stimuliert werden (Kadowaki et al. 2001). Dies führt zum einen zur Produktion einer Reihe proinflammatorischer Zytokine, wie TNF-α, IL-6, IL-8 und IL-12 (Swiecki & Colonna 2015). Zum anderen ist eine phänotypische Reifung mit Heraufregulierung primär- und kostimulatorischer Antigene der T-Zell-Aktivierung, wie MHC-II (HLA-DR), CD80, CD86 und CD40, die Folge. Hierdurch werden pDC zu antigenpräsentierenden Zellen (Villadangos & Young 2008). Darüber hinaus haben sie u.a. über die Expression von PD-L1 eine tolerogene Bedeutung (Tokita et al. 2008).

Der Einfluss von MSC auf pDC wurde erst in wenigen Studien untersucht. Hackstein et al. beschreiben eine verminderte Differenzierung muriner pDC in Anwesenheit von MSC (Hackstein et al. 2016). Aggarwal und Pittenger untersuchten die IL-10 Produktion humaner pDC in Anwesenheit von MSC und fanden eine Verstärkung des immunsupprimierenden Zytokins (Aggarwal & Pittenger 2005). Die Beeinflussung weiterer Zytokine der pDC, allen voran IFN-a, aber auch TNF-a, IL-8 und IL6, oder des Reifungsprozesses durch MSC mit humanen Zellen wurden bisher nicht beschrieben. Dies sollte Ziel der vorliegenden Arbeit sein.

Hierzu sollten Knochenmark-MSC humaner Spender mit aufgereinigten humanen pDC kokultiviert werden. Die Aufreinigung der pDC sollte aus dem Buffy-Coat junger,

gesunder Spender über Negativselektion geschehen, um den Einfluss des Aufreinigungsprozesses auf die Zellen möglichst zu minimieren.

Während der Kokultur sollte die TLR-spezifische Stimulation der pDC erfolgen. Zur Messung der Zytokinproduktion sollten als TLR-9-Ligand das Klasse A CpG ODN 2216 und als TLR-7-Ligand das Imidazoquinolin-Derivat Resiquimod (R848) verwendet werden. Zur Analyse des Reifungsprozesses sollte zusätzlich noch die Stimulation mit dem Klasse C CpG ODN M362 untersucht werden. Klasse C Cpg ODN zeigen in der Literatur eine suffizientere Reifungsinduktion als Klasse A (siehe Tabelle 1) (Guiducci et al. 2006; Libri et al. 2009). Die Expression des für die Toleranzentwicklung entscheidenden PD-L1 sollte mittels CpG ODN 2216 sowie dem Imidazoquinolin-Derivat Gardiquimod untersucht werden. Es sollte jeweils die pDC/MSC Kokultur im Vergleich zur pDC bzw. MSC Monokultur nach 15-20h stündiger Kokultur betrachtet werden.

Die nachfolgende Analyse der IFN- α -Konzentrationen der Kulturüberstände sollte mittels ELISA erfolgen. Um zellkontaktabhängige Faktoren beim Einfluss von MSC auf pDC auszuschließen sollten zusätzliche Versuchsreihen mit Trennung der beiden Zellen mittels Transwell-Einsätzen durchgeführt werden. Zum Ausschluss COX-abhängiger Prozesse, wie der Wirkung von PGE2, sollte die IFN- α Konzentration unter dem Einfluss des COX-Inhibitors NS398 untersucht werden.

Die Konzentration der weiteren Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α nach Kokultur sollten mittels Zytokin- Bead- Assays ermittelt werden.

Die Analyse des Reifungsprozesses der Marker CD80, CD86 und MHC-II (HLA-DR) sowie die Expression von PD-L1 nach Kokultur sollte mittels Oberflächenfärbung mit anschließender durchflusszytometrischer Analyse erfolgen.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien und Geräte

2.1.1 Antikörper

Tabelle 2 Übersicht über alle verwendeten Fluoreszenz markierten Antikörper

Fluorochrom	Antigen	Isotyp	Klon	Hersteller
Pacific Blue	CD3	Mouse IgG2a	HIT3a	Biolegend, San Diego, USA
APC-H7	CD4	Mouse IgG1, κ	RPA-T4	BD Pharmingen [™] Heidelberg, D
APC-Cy7	CD4	Mouse IgG1, к	RPA-T4	Biolegend, San Diego, USA
APC-Cy7	CD4	Mouse IgG1, κ	RPA-T4	BD Pharmingen [™] Heidelberg, D
PE	CD4	Mouse IgG1, κ	RPA-T4	BD Pharmingen [™] Heidelberg, D
FITC	CD4	Mouse IgG1, к	M-T466	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach, D
PE	CD8	Mouse IgG1, κ	HIT8a	BD Pharmingen™ Heidelberg, D
APC	CD8	Mouse IgG1, κ	RPA-T8	BD Pharmingen™ Heidelberg, D
APC	CD8	Mouse IgG1, κ	RPA-T8	Biolegend, San Diego, USA
FITC	CD14	Mouse IgG2a, к	M5E2	BD Pharmingen [™] Heidelberg, D
APC	BDCA4	mouse IgG1	AD5- 17F6	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach, D
APC	CD80	Mouse IgG1	MEM- 233	GenTex Inc., Irvine, USA
APC	CD80	Mouse IgG1	MEM- 233	GenTex Inc., Irvine, USA
Brilliant Violett	CD80	Mouse BABL/c IgG1	2231 (FUN-1)	BD Pharmingen [™] Heidelberg, D
FITC	CD40	Mouse IgG1	5C3	BD Pharmingen [™] Heidelberg, D
FITC	CD40	Mouse IgG1, к	5C3	BD Pharmingen [™] Heidelberg, D
PE	CD40	Mouse IgG1, к	5C3	BD Pharmingen [™] Heidelberg, D
APC	CD40	Mouse IgG1, к	5C4	BD Pharmingen [™] Heidelberg, D
PE	CD86	Mouse BABL/c IgG1	2231 (FUN-1)	BD Pharmingen [™] Heidelberg, D
APC/Cy7	HLA-DR	Mouse IgG2a, к	L243	Biolegend, San Diego, USA
FITC	HLA-DR	Mouse IgG2a, к	L243	Biolegend, San Diego, USA
APC-Cy7	HLA-DR	Mouse IgG2a, к	L243	Biolegend, San Diego, USA
FITC	IFN y	Mouse IgG1, κ	4S.B3	Biolegend, San Diego, USA
FITC	IFN y	Mouse BALB/c IgG2b, к	25723.11	BD Pharmingen [™] Heidelberg, D
FITC	ISO IgG1	Mouse IgG1, κ	MOPC- 21	Biolegend, San Diego, USA

FITC	CD123	Mouse IgG2a, к	AC145	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach, D
APC	CD304 (BDCA- 4/Neuro pilin-1)	Mouse IgG1, κ	AD5- 17F61	Milteny Biotech, Bergisch Gladbach, D
APC	PD-L1	Mouse IgG2b, к	29E.2A3	Biolegend, San Diego, USA

APC: Allophycocyanin, APC-Cy7: Allophycocyanin als Tandem-Konjugat mit Cyanin Cy7, APC-H7: Allophycocyanin als Tandem-Konjugat mit einem Analogon von Cyanin Cy7, PE: Phycoerythrin, FITC: Fluorescein-5-isocyanat

2.1.2 Stimulantien

Tabelle 3 Übersicht über alle verwendeten Stimulantien

Stimulanz	Hersteller	
CpG oligonucleotides type A- Human TLR9 ligand, ODN 2216	InvivoGen, San Diego, USA	
CpG Oligonukleotides Human and Mouse CpG-a 'DNA', ODN 2216	Hycult Biotech, Uden, NL	
ODN M362	InvivoGen, San Diego, USA	
R848	InvivoGen, San Diego, USA	
Gardiquimod	InvivoGen, San Diego, USA	

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 4 Übersicht über alle verwendeten Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	
Aqua dest.	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D	
Biofreeze Einfriermedium	Biochrom AG, Berlin, D	
Bovines serum Albumin	SERVA Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D	
DMEM, low Glucose (1 g/L) with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A	
Fetal Bovine Serum "GOLD"	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A	
Ficoll Plaque	GE Healthcare Chalfont, St Giles, GB	
Heparin-Natrium-25000-ratiopharm*	Ratiopharm, Ulm, D	
PBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach, D	
PBS 10x	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A	
Pen Strep Penicillin/ Streptomycin	gibco Life Technologies	
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A	

ortho Phosphorsäure 89%	Merck KGaA, Darmstadt, D	
SYTOX [®] Blue Dead Cell Stain, for flow cytometry	Life Technoligies, Carlsbad, USA	
TMB Substrate Reagent Set	BD OptEIA [™] , BD, Franklin Lakes, USA	
Trypan Blue solution 0.4%, liquid, sterile- filtered, suitable for cell culture 0.4%, liquid, sterile-filtered, suitable for cell culture	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	
Tween 20	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	
MEM Non-Essential Amino Acid Solution 100x	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	
HEPES Buffer Solution	gibco Life Technologies, Carlsbad, USA	
Sodium Pyruvat	gibco Life Technologies, Carlsbad, USA	
NS398	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA	
Il2 Proleukin	Novartis Pharma, Basel, CH	
Glutamax	gibco Life Technologies, Carlsbad, USA	
RPMI 1640 Medium (with stable Glutamine)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A	
Brefeldin A	eBioscience, San Diego USA	
Accutase	Merck Millipore, Darmstadt, D	
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A	

2.1.4 Reagenziensätze

Tabelle 5 Übersicht über alle verwendeten fertigen Reagenziensätze

Reagenziensatz	Hersteller		
EasySep™ Human Plasmacytoid DC Enrichment Kit	Stemcell Technologies, Grenoble, F		
Human Basic Kit FlowCytomix	eBioscience, San Diego USA		
Human IL-10 Flow Cytomix Simplex Kit	eBioscience, San Diego USA		
Human IL-12 p70 Flow Cytomix Simplex Kit	eBioscience, San Diego USA		
Human TNF-α Flow Cytomic Simplex Kit	eBioscience, San Diego USA		
Human IL-8 Flow Cytomix Simplex Kit	eBioscience, San Diego USA		
Human IL-6 Flow Cytomix Simplex Kit	eBioscience, San Diego USA		
Ifn alpha ELISA (Human IFN-α Matched Antibody Pairs)	eBioscience, San Diego USA		

2.1.5 Verbrauchsgegenstände

Tabelle 6 Übersicht über alle verwendeten Verbrauchsgegenstände

Verbrauchsgegenstand	Hersteller	
75cm² Zellkulturflaschen Rot	Sarstedt, Nümbrecht, D	
24 well Platte	Greiner, Kremsmünster, A	
96 well Platte, flat bottom	Greiner, Kremsmünster, A	

Cell strainer 40µm	BD, Franklin Lakes, USA
Cell Strainer 70µm	BD, Franklin Lakes, USA
Cell Strainer 100µm (50 St)	BD, Franklin Lakes, USA
0,45µm Filter Minisart	Sartorius AG, Göttingen, D
0,8µm Filter	Sartorius AG, Göttingen, D
5 μm Filter	Sartorius AG, Göttingen, D
ELISA Platte, MICROPLATTE, 96 WELL, PS, F-BODEN, TRANSP., MICROLON®, HIGH BINDING	Greiner, Kremsmünster, A
FACS tubes	Sarstedt, Nümbrecht, D
Falcons 15ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
Falcons 50ml	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
Magnet "The Big Easy" EasySep™	Stemcell Technologies, Grenoble, F
Pipettenspitzen 1000µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen 1000µl +Filter	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen 100µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen 100µl +Filter	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen 200µl	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen 200µl +Filter	Sarstedt, Nümbrecht, D
THINCERT Zellkultureinsatz für 24 Well Platten, mit transluzenter Membran aus PET, TC, steril, Porendurchm. 0,4 μm	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
10ml Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
5ml Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
1ml Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
20ml Spritzen	B. Braun Melsungen AG, Melsungen, D
Eppendorf Tubes	Sarstedt, Nümbrecht, D
Cryotubes Cryopure 2mL	Sarstedt, Nümbrecht, D
Cryotubes Cryopure 5mL	Sarstedt, Nümbrecht, D

2.1.6 Geräte und Software

Tabelle 7 Übersicht über alle verwendeten Geräte

Gerät	Hersteller
BD FACS Canto [™] II	Becton Dickinson, Heidelberg, D
BD FACS Aria [™] III	Becton Dickinson, Heidelberg, D
Automatischer Hämatologie Analysator Sysmex KX-21N	Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, D
ELISA Reader SLT Spectra	SLT LabInstruments Deutschland GmbH, D

Software	Hersteller	
BD FACS Diva	Becton Dickinson, Heidelberg, D	
Graphpad Prism, V 5	Graphpad Software, Inc., La Jolla, USA	
Magellan, V6.5	Tecan, Männedorf, CH	

Tabelle 8 Übersicht über die verwendete Software

2.1.7 Humanes Probenmaterial

Tabelle 9 Übersicht über das verwendete humane Probenmaterial

Probenmaterial	Hersteller
Buffy-Coat ¹	Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität Gießen, D
Mesenchymale Stammzellen ²	Institut für Hämatologie, Onkologie und Immunologie, Universität Marburg, D
Humanes Plättchenlysat	Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität Gießen, D
AB-Serum	Institut für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin, Universität Gießen, D

¹ Genehmigt durch das Ethikkomitee der Medizinischen Fakultät der Universität Gießen (#05/00)

² Genehmigt durch das Ethikkomitee der Universität Marburg (#64/01 und #25/10)

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung mesenchymaler Stammzellen

MSC Medium:
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), low glucose (1g/l), mit L-Glutamin
10% Humanes Plättchenlysat
25U/ml Heparin
1% Penicillin/Streptomycin

Die verwendeten mesenchymalen Stammzellen entstammten zum einen aus dem Knochenmarksaspirat gesunder Spender und zu einem anderen Teil aus dem spongiösen Knochenmaterial, welches bei der Implantation von totalen Hüftendoprothesen entnommen wurde. Diese Vorgänge wurden von dem Ethikkomitee der Philipps-Universität-Marburg genehmigt (#64/01 und #25/10). Die Patienten haben jeweils mit einer schriftlichen Einverständniserklärung der Entnahme zugestimmt.

Die Kultivierung und Amplifikation der Zellen erfolgte nun zum größten Teil in einem Hohlfaserbioreaktor und zu einem anderen Teil in Zellkulturflaschen (vgl. Nold u. a., 2013) durch die Kollegen des Instituts für Hämatologie, Onkologie und Immunologie der Universität Marburg. Die mittels Bioreaktor kultivierten Zellen wurden in einem weiteren Schritt ebenfalls in 75cm² Zellkulturflaschen überführt und in oben aufgeführtem Medium im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. Alle 4-5 Tage erfolgte ein partieller oder kompletter Wechsel des Mediums. Die Zellen wurden täglich mikroskopisch kontrolliert. Bei einer Konfluenz von ca. 80% erfolgte die Passagierung. Es folgen die Schritte im Einzelnen. Alle Vorgänge wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt:

- Entfernung des gesamten Mediums
- Spülung des Flaschenbodens mit PBS
- Zufügen von ca 8ml *Accutase (PAA Laboratories GmbH*) bis der Boden der Kulturflasche vollständig benetzt war zur Lösung der Zellen
- 5-10min Inkubation im Inkubator bei 37°C und 5% CO₂
- Mikroskopische Kontrolle der Lösung der Zellen. Die Zellen erschienen rundlicher und nicht plastikadhärent. Waren nicht alle Zellen gelöst erfolgte die Verlängerung der Inkubation im Inkubator bis maximal 15min.

- Spülen der Flasche mit 15ml PBS und Überführen der Suspension in 50ml Gefäße
- Zentrifugation: 5min, 500g, Raumtemperatur, Beschleunigung: 9/9, Bremse 9/9
- Die Resuspension erfolgte, je nach Verwendung entweder in Kokultur Medium (bei Verwendung für Kokultur-Experimente, siehe 2.2.3), in PBS (zum Einfrieren der Zellen, siehe unten) oder in 10ml MSC Medium zur weiteren Passagierung
- Zur Passagierung: Bestimmung der Zellzahl mittels Neubauer Zählkammer (siehe 2.2.9)
- Aussähen der Zellen mit einer Dichte von ca. 2000-3000Zellen/cm²
- Auffüllen des MSC Mediums auf 30ml Gesamtvolumen

Gegebenenfalls wurden die Zellen zur späteren Verwendung eingefroren. Nachfolgend die einzelnen Schritte hierbei:

- Lösen der MSC mittels Accutase und Waschen der Zellen wie oben beschrieben
- Resuspension nach Zentrifugation in 20ml PBS
- Zellzählung in Neubauer Zählkammer
- Resuspension der Zellen mit *Biofreeze Einfriermedium (Biochrom AG)* in einer Konzentration von 1*10⁶ Zellen/ml
- Umgehendes Überführen der Tubes in einen mit Isopropanol gefüllten Einfriercontainer. Umgehende Lagerung bei -80°C. Somit konnte ein konstantes Absinken der Temperatur von ca. 1°C/min erreicht werden.
- Nach 24h Überführen der Tubes in Flüssigstickstoffbehälter

Nachfolgend die einzelnen Schritte beim Auftauen der Zellen:

- Kurzes Aufwärmen bei 37°C im Wasserbad.
- Sobald sich der Rand der Suspension verflüssigte Überführung in ein Tube mit 30ml vorgewärmtem MSC Medium
- Zentrifugation: 5min, 500g, Raumtemperatur, Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9
- Resuspension in MSC Medium und Aussähen in Zellkulturflasche

2.2.2 Negativselektion von pDC

PBS/EDTA Puffer:

Phosphat buffered saline (PBS), w/o Ca²⁺ und Mg²⁺

2mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)

PBS/EDTA/FCS	Puffer (nach	Vorschlag von	Stemcell Technologies):
	(

PBS, w/o Ca ²⁺ und Mg ²⁺	
2mM EDTA	

2% fetales Kälberserum (FCS)

Die Selektion der pDC erfolgte aus dem Buffy-Coat von Vollblutspenden gesunder humaner Spender des Instituts für klinische Immunologie und Transfusionsmedizin der Universtität Gießen. Alle Spender stimmten schriftlich der Verwendung zu. Die Vorgänge wurden durch das Ethikkomitee der Universität Gießen genehmigt (#05/00).

Zur Seperation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMC) wurde der Buffy-Coat einer Dichtegradzentrifugation auf Ficoll unterzogen. Hierbei durchdringen bei 30 minütiger Zentrifugation (s.u.) Erythrozyten, Granulozyten und suspendierte Zellbestandteile höherer Dichte die Ficollphase, während mononukleäre Zellen in der Interphase verbleiben. Im Folgenden sind die einzelnen Schritte für einen Buffy-Coat beschrieben. Alle Vorgänge wurden unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank durchgeführt.

- Aufteilen des Gesamtvolumens des Bufy-Coats von ca. 60ml auf drei 50ml Tube-Gefäße und Versetzen mit jeweils 30ml PBS/EDTA Puffer
- Auffüllen von vier weiteren 50ml Tube- Gefäßen mit jeweils 15ml Ficoll Plaque
- Vorsichtiges Aufschichten der Buffy-Coat/PBS/EDTA Suspension auf die Ficoll Plaque, sodass eine deutliche Phasentrennung sichtbar war
- Zentrifugation: 30min, 450g, Raumtemperatur, Beschleunigung 9/9, ohne Bremse (0/9)
- Vorsichtiges Abpipettieren der entstandenen Interphaseringe mit einer Pasteurpipette und Verteilung auf zwei 50ml Tube Gefäße
- Auffüllen mit PBS/EDTA-Puffer auf 50ml
- Zentrifugation: 5min, 400g, Raumtemperatur, Beschleunigung: 9/9, Bremse: 9/9

- Vorsichtiges Abschütten des Überstandes und lösen des Pallets durch vorsichtiges vortexen
- Auffüllen der Zellsuspension mit PBS/EDTA Puffer auf 30ml
- Zentrifugation: 10min, 200g, Raumtemperatur, Beschleunigung: 9/9, Bremse: 9/9
- Vorsichtiges Abschütten des Überstandes, Lösen des Pallets durch vorsichtiges vortexen
- Vereinigung der beiden Gefäße in eins, Auffüllen mit PBS/EDTA Puffer auf 30ml
- Zentrifugation: 10min, 200g, Raumtemperatur, Beschleunigung: 9/9, Bremse: 9/9
- Vorsichtiges Abschütten des Überstandes, Lösen des Pallets durch vorsichtiges vortexen
- Auffüllen der Zellsuspension auf 4ml mit PBS/EDTA/FCS-Puffer
- Bestimmung der Zellzahl mittels des automatischen Hämatologieanalysators *Sysmex KX-21N* (siehe 2.2.9)

Die Negativselektion erfolgte nun in abgewandelter Form in Anlehnung an das Herstellerprotokoll der Firma *Stemcell Technologies*. pDC werden durch den Hersteller als CD3-, CD14-, CD16-, CD19-, CD20-, CD34-, CD56- negativ und HLA-DR sowie BDCA-4 positiv definiert. Das Prinzip dieser Aufreinigung besteht in der Markierung aller nichtpDC durch monoklonale Antikörper Hierbei handelt es sich um bispezifische Komplexe aus zwei Antikörpern, welche mit der einen Domäne an zelluläre Oberflächenantigene und mit der zweiten an Dextran, und somit an magnetische Partikel binden. Hierdurch ist es möglich alle nicht-pDC mittels eines Magneten von den pDC zu trennen. Im Folgenden sind die Schritte im Einzelnen beschrieben. Wie auch die Aufreinigung der PBMC zuvor fanden alle Schritte unter sterilen Bedingungen unter einer Sterilbank statt.

- Verdünnung der Zellsuspension mit PBS/EDTA/FCS-Puffer auf eine Konzentration von 5x107 Zellen/ml in einem Polystyren Gefäß
- Zugabe von 30µl/ml Anti-Human CD32 (Fcγ RII) Blocker und 50µl/ml EasySep[™] Human Plasmacytoid DC Enrichment Cocktail
- 30-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schwenken
- *EasySep™D Magnetic Particles* 30s vortexen. Zugabe von 200µl/ml.
- 10-minütige Inkubation bei Raumtemperatur unter kontinuierlichem Schwenken

- Das Tube mit der Zellsuspension in den "The Big Easy" EasySep™ Magnet stellen. ٠ Inkubation von 10min bei Raumtemperatur.
- Überschütten der Zellsuspension in ein neues Polystyrol-Gefäß ohne das alte aus • dem Magneten zu nehmen
- Das neue Tube mit der Zellsuspension in den "The Big Easy" EasySep™ Magnet • stellen. Inkubation von 5min bei Raumtemperatur.
- Zellsuspension in ein neues Tube geben •
- Zentrifugation: 5min, 400g, Raumtemperatur, Beschleunigung: 9/9, Bremse: 9/9 • und Resuspension in 2ml Kokultur Medium (siehe 2.2.3)
- Entnahme von 10µl der entstandenen Zellsuspension zur Zellzählung mittels • Neubauer-Zählkammer. Die Zellen wurden mit 0,4% Trypanblaulösung im Verhältnis 1/2 gefärbt, in die Kammer gegeben und gezählt. (vgl. 2.2.9)
- Stichprobenartige Entnahme von 100µl Zellsuspension zur Färbung mit Anti-BDCA-4 und Sytox- Blue zur Bestimmung der Reinheit. Diese erfolgte mittels Durchflusszytometrie gleich im Anschluss (siehe 2.2.8). Hierbei wurde Sytox- Blue als Indikator toter Zellen angenommen. Die Reinheit wurde als Anteil der BDCA-4+ an den Sytox negativen zellulären Bestandteilen (PBMC), ermittelt über FSCund SSC- Gating, angegeben (siehe Abbildung 3 in 3.1).

2.2.3 Kokultur von MSC und pDC

Tabelle 10 Kokultur Medium
Kokultur Medium:
DMEM, low glucose (1g/l), mit L-Glucose
10% Humanes Plättchenlysat
25U/ml Heparin
1% Penicillin/Streptomycin

1% Penicillin/Streptomycin

Zur Bestimmung des Einflusses der MSC auf die Aktivität der pDC hinsichtlich der Produktion verschiedener Zytokine sowie des Reifungsprozesses wurden die beiden Zelltypen über 15-20h kokultiviert.

Zunächst erfolgte am Morgen des Versuchstages das Ausplattieren der MSC in eine 96 Well Platte in folgenden Schritten:

- Lösen der MSC aus der Kulturflasche mittels Accutase analog zu 2.2.1
- Zentrifugation: 5min, 500g, Raumtemperatur, Beschleunigung: 9/9, Bremse: 9/9 mit nachfolgender Resuspension in 10ml Kokultur-Medium
- Zellzählung der MSC mittels Neubauer Zählkammer (siehe 2.2.9)
- Auffüllen der MSC-Suspension mit Kokultur-Medium auf die notwendige Konzentration. Diese entsprach jeweils der Anzahl von MSC pro Well in 100μl. z.B. 5000MSC/100μl bei der Bestimmung der IFN α Produktion (vgl. Tabelle 11)
- Ausplattieren der MSC in 100µl MSC Suspension/Well
- Ausnahmen: Bei den Versuchsreihen mit COX-Inhibition mit NS398 erfolgte das Ausplattieren mit 5000MSC/90µl, nach einer Stunde erfolgte die Zugabe des COX Inhibitors (siehe 2.2.4)

Bei den Versuchen im Transwell-Setting erfolgte aufgrund der Verwendung von 24 Well Platten das Ausplattieren von 15.000MSC/400µl (siehe 2.2.5)

Es folgte eine Inkubation der MSC von ca. 6h im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ um eine Adhärenz an den Plastikboden der Wells zu gewährleisten. In einigen Versuchsreihen erfolgte nach einer Stunde die Zugabe eines COX-Inhibitors (siehe 2.2.4). Währenddessen erfolgte die Aufbereitung der pDC unter sterilen Bedingungen:

- Selektion der pDC im Sinne von 2.2.2
- Aufnahme der pDC in kokultur Medium aufgenommen und Verdünnung auf die nötige Konzentration (siehe Tabelle 11) in 100μl. z.B. 20.000pDC/100μl bei der Bestimmung der IFN α Produktion
- Ausplattieren von 100µl pDC Suspensionen. Das Gesamtvolumen betrug nun 200µl/well
- MSC und pDC Monokulturen wurden jeweils angelegt, die jeweiligen Volumendifferenzen wurden mit Kokultur Medium ausgeglichen
- Einstündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO2
- Nach Ablauf der Stunde erfolgte die Zugabe der Stimulation im Sinne von 2.2.4
- 15-20 stündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO2 über Nacht

	MSC	pDC	Verhältnis
			MSC/pDC
IFN-a Messung (vgl. 3.2)	2000	20.000	1/10
IFN-a Messung im Transwell (vgl. 2.2.5	15.000	50.000	3/10
und 3.3)			
IFN-a Messung nach COX-Inhibition	5000	50.000	1/10
(vgl. 3.4)			
IL-6, IL-8 und TNF-a Messung (vgl 3.5)	2000	20.000	1/10
Oberflächenmarker nach A-CpG ODN	4000	20.000	2/10
und R848 Stimulation (vgl 3.6)			
Oberflächenmarker nach C-CpG ODN	5000	50.000	1/10
Stimulation (vgl. 3.7)			
PD-L1 Messung (vgl. 3.8)	10.000	100.000	1/10

Tabelle 11 Übersicht über die verwendeten Zellzahlen in den einzelnen Versuchsreihen

Nach Ablauf der Inkubation erfolgte entweder die Abnahme der Kulturüberstände zur Analyse der Zytokinexpression oder die Resuspension der pDC mit nachfolgender Färbung. Die MSC blieben hierbei aufgrund ihrer Plastikadhärenz im Well.

Die Abnahme der Überstände zur Zytokinanalyse im Einzelnen:

- Zentrifugation der Kulturplatte: 10min, 350g, Raumtemperatur, Beschleunigung: 5/9, Bremse: 5/9Vorsichtiges Abpipettieren der Überstände in 3x60µl Alliquots
- Einfrieren der Alliquots bei -80°C
- Zur Analyse der Zytokinproduktion vorsichtiges Auftauen der Alliquots und Analyse mittels ELISA (siehe 2.2.6) oder Fluoreszenz Bead Assay (siehe 2.2.7)

Die Entnahme der Zellsuspension zur Oberflächenanalyse im Einzelnen:

- Resuspension der pDC mittels vorsichtigem Auf- und Abpipettieren
- Entnahme von 180µl Zellsuspension um eine Lösung der MSC am Boden des Wells zu verhindern
- Zentrifugation: 5min, 500g, Raumtemperatur, Beschleunigung 9/9, Bremse 9/9
- Resuspension der Zellen mit 100µl PBS und nachfolgende Färbung und durchflusszytometrischer Messung (siehe 2.2.8)

2.2.4 Stimulation und weitere Adjuvantien

Die Stimulation erfolgte jeweils spezifisch an den pDC-spezifischen TLR 7 und 9 mit den jeweiligen Liganden (siehe 1.2) nach einstündiger Äquilibierung im Sinne von 2.2.3. Tabelle 12 zeigt alle verwendeten Stimulantien mit den jeweiligen Endkonzentrationen in der Übersicht. Es erfolgte die Verdünnung der Stimulantien-Stocksätze mit Kokultur Medium (siehe 2.2.3), sodass bei Zugabe in 2µl Portionen die nötigen Endkonzentrationen im Well erreicht wurden. Bei den Transwell Experimenten erfolgte die Zugabe der Stimulantien in 50µl Portionen.

Stimulanz	TLR	Endkonzentration
CpG ODN 2216	9	3 bzw 2µg/ml
CpG ODN M362	9	2µg/ml
R848	7	1µg/ml
Gardiquimod	7	1µg/ml

Tabelle 12 Übersicht über die verwendeten Stimulantien sowie die jeweiligen Endkonzentrationen

Zur Ausschaltung Prostaglandin-abhäniger Effekte wurde in einer Versuchsreihe mittels des Cyclooxygenaseinhibitors NS398 eine Produktion dieser Proteine unterbunden. Die Zugabe erfolgte eine Stunde nach dem initialem Ausplattieren der MSC (vgl. 2.2.3). Es erfolgte die Verdünnung der NS398 Stocklösung und Zugabe in 10µl Portionen, dass eine Endkonzentration von 5µM erreicht wurde.

2.2.5 Transwell

Zur Unterbindung der Ausbildung von interzellulären Verbindungen wurden Versuchsreihen mit kompatimentärer Trennung der Zellen vorgenommen. Diese wurde mittels Transwells erreicht, die eine solche Trennung mittels einer permeablen Membran ermöglicht, sodass ein Austausch löslicher Stoffe weiterhin möglich bleibt.

Der Aufbau erfolgte in abgewandelter Form analog zu den Versuchen in der 96-Well-Platte (siehe 2.2.3) in einer 24 Well Platte. Der Transwell-Aufbau erfolgte mit den *Thincert-Zellkultureinsätzen* mit deinem Porendurchmesser von 0,4µm von *Greiner-Bio One*. Hier wurde ein Verhältnis MSC/pDC von 3/10 gewählt, um eine ausreichende Konfluenz der MSC in den im Vergleich zur 96- Well Platte größeren Wells der 24 Well Platte zu gewährleisten.

Die Schritte im Einzelnen:

- Ausplattieren von 15.000 MSC in 400µl Kokultur Medium analog zu 2.2.3
- 6-stündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂
- Währenddessen Selektionierung der pDC analog zu 2.2.2 und 2.2.3
- Verdünnung der pDC Suspension mittels Kokultur Medium auf 50.000 pDC/150µl
- Zugabe der pDC in 150µl Portionen in die Transwell Einsätze. Kontrollen ohne Transwell wurden jeweils angelegt. Hier wurden die pDC direkt in das Well gegeben
- Einstündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO2
- Stimulation im Sinne von 2.2.4 mit mit Kokultur Medium vorverdünntem CpG ODN 2216 in 50µl Portionen, sodass eine Endkonzentration von 2µg/l entstand. Die Zugabe erfolgte in das untere Well.
- 15-20 stündige Inkubation im Brutschrank bei 37°C und 5% CO2 über Nacht
- Vorsichtiges Abpipettieren der Überstände aus den Transwell Einstätzen.
 Einfrieren bei -80°C und spätere Analyse mit IFN-α- ELISA (siehe 2.2.6)

2.2.6 Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) zum quantitativen Nachweis von Interferon α

Zum quantitativen Nachweis der Interferon α Produktion der mit MSC kokultivierten pDC (vgl. 2.2.3) wurde ein *enzyme linked immunosorbent assay* (ELISA) gemäß den Herstellerangaben durchgeführt (*E-bioscience, San Diego, USA*). Die Einzelkomponenten entstammten entweder dem *IFN alpha ELISA (Human IFN-\alpha Matched Antibody Pairs)*-Kit des Herstellers oder sie wurden zu Beginn aufgeführt.

Das Coating erfolgte am Vorabend der Analyse (nachstehend die einzelnen Schritte für das Coating einer Platte):

• Verdünnung von 110 µl der Coating-Antikörper-Lösung mit 10,89ml PBS
- 100µl der Coating Lösung in jedes Well einer 96 Well Mikrotiterplatte (*Microplatte, 96 Well, PS, F-Bden, transp., MICROLON[®]*, high binding, Greiner Bio One)
- Versiegeln der Platte mittels transparenter Folie
- Übernächtliche Inkubation bei ca. 5°C

Die Schritte erfolgten streng nach dem Herstellerprotokoll. Die folgende Reaktion fand im Dunkeln statt. Der abschließend einsetzende Farbumschlag wurde regelmäßig überprüft. Hatte dieser sein Maximum erreicht (nach ca. 15-30min) erfolgte die Zugabe der Stopplösung und die photometrische Messung bei 450nm mit 620nm als Referenzwellenlänge durch den *ELISA Reader SLT Spectra*. Die Berechnung der IFN- α -Konzentration erfolgte mittels Regression der parallel durchgeführten Standardreihen durch das Programm *Magellan, V6.5*.

2.2.7 Fluoreszenz Bead Assay zum quantitativen Nachweis von IL6, IL8 und TNF $\boldsymbol{\alpha}$

Die Einzelkomponenten entstammten jeweils dem *Human Basic-Kit FlowCytomix* sowie den einzelnen *FlowCytomix Simplex-Kits* der Firma *eBioscience, San Diego, USA*. Das Vorgehen erfolgte in enge Anlehnung an die Herstellerempfehlungen.

Zum Nachweis weiterer Zytokine wurde der Fluoreszenz Bead Assay FlowCytomix[™] durchgeführt. Hierbei erfolgte die herstellerkonforme Zusammenführung des Human-Basic-Kit mit den *II-8, Il6 und TNF-α Simplex-Kits*, wodurch eine simultane Analyse aller dieser Zytokine möglich wird.

Das Prinzip eines solchen Bead Assays besteht darin, dass die löslichen Zytokine an an Beads gebundene Antikörper gebunden werden. Ein weiterer mit Biotin konjugierter Sekundärantikörper bindet die gebundenen Zytokine. Nach Zugabe des Streptavidin-PE Konjugats bindet dieses nichtkovalent an das Biotin, wodurch die durchflusszytometrische Analyse möglich wird. Eine Diskriminierung der einzelnen Zytokine erfolgt durch die Verwendung unterschiedlich großer Beads und unterschiedliche Intensität der Fluoreszenz des PE. Nach Durchführung der Schritte gemäß den Herstellerangaben erfolgte die sofortige durchflusszytometrische Messung. Parallel wurden protokollgerechte Standardreihen mitgeführt. Durch lineare Regression der Ergebnisse dieser mittels *GraphPad Prism Version 5* konnten die Zytokinkonzentrationen der Proben errechnet werden.

2.2.8 Durchflusszytometrie

Das Prinzip der Durchflusszytometrie besteht darin, dass Zellen in einem gerichteten Flüssigkeitsstrom einzeln durch einen rechtwinklig zur Bewegungsrichtung eintreffenden Laserstrahl geleitet werden.

Das hierbei gestreute Licht wird registriert, sodass Rückschlüsse auf Größe der Zelle und Komplexität ihrer Binnenstruktur gezogen werden können. Hier wird zum einen das in einem kleinen Winkel zum Strahl gestreute bzw. gebeugte Licht detektiert. Dieses Vorwärtsstreulicht (forward scatter, FSC) erlaubt mit eine Einschätzung der relativen Größe des bestrahlten Objekts. Zum anderen erfolgt eine Messung des orthogonal zum Laser gestreuten Lichts, des sogenannten Seitwärtsstreulichts (side scatter, SSC). Hieraus kann auf die Komplexität und Granularität des Inneren der Zelle rückgeschlossen werden.

Eine Erweiterung der Durchflusszytometrie besteht darin, spezifische zelluläre Antigene mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern zu markieren. Diese werden dann durch den eintreffenden Laserstrahl angeregt, wodurch das emittierte Licht registriert werden kann. Dies ermöglicht eine gezielte qualitative Analyse der untersuchten Objekte.

Das Färbeprotokoll:

- Entnahme der zu Untersuchenden Zellsuspension (siehe 2.2.3)
- Zugabe von 10µl AB-Serum
- 15-minütige Inkubation bei 5°C
- Zugabe der jeweiligen Antikörper (Volumina jeweils gemäß den Herstellerempfehlungen). Anti- BDCA4 zur Reinheitskontrolle. Anti CD80, Anti-CD86, Anti HLA-DR und Anti CD40 zur Oberflächenmarkerexpression. In einigen Experimenten erfolgte zur Abgrenzung der pDC von den MSC die Färbung mit Anti- CD123 Antikörpern zur Positiv- bzw Anti- CD90 als Marker der MSC zur

Negativkontrolle. Genaueres zu den verwendeten Antikörpern in Tabelle 2 in Kapitel 2.1.1.

- 15-minütige Inkubation bei bei 5°C
- Zugabe von 2ml PBS
- Zentrifugation: 5min, 500g, 4°C, Beschleunigung: 9/9, Bremse: 9/9
- Resuspension in 100µl PBS
- Messung im Durchflusszytometer (*BD FACSCanto II, Becton Dickinson, Heidelberg*)

Die Analyse der Oberflächenmarkerexpression erfolgte durch den Vergleich der Medianen Fluoreszenz Intensität (MFI) der jeweiligen Proben für den jeweiligen Antikörper.

2.2.9 Zellzählung mittels Neubauerzählkammer und Sysmex KX-21N

Zur Bestimmung der Zellzahl wurden zwei verschiedene Techniken verwendet. Zum einen erfolgte die Färbung mit Trypanblau und die anschließende mikroskopische Zählung in der Neubauer Zählkammer.

- Reinigung der Zählkammer sowie des Deckglases mit 70% Ethanol
- Leichtes Anfeuchten des Deckglases durch "Anhauchen" und auf die Zählkammer legen. Kontrolle der richtigen Lage durch das Auftreten newtonscher Ringe
- Entnahme von 10µl der entsprechenden Zellsuspension und Mischung mit 10µl Trypanblaulösung (0,4%)
- Entnahme von 10µl dieser Trypanblau-Zellsuspension und Einbringen in die Zählkammer mittels vorsichtigem seitlichen Aufsetzen der Pipettenspitze neben dem Deckglas und langsamen abpipettieren. Auf eine ausreichende Füllung der Kammer achten
- Zellzahlbestimmung über mikroskopische Zählung der Zellen in den großen, äußeren Quadraten der Zählkammer. Die Zellkonzentration in Zellen/ml ergibt sich aus der durchschnittlichen Zellzahl/ Quadrat *2 (aufgrund der Verdünnung mit Trypanblau) *10⁴.

Über die reine Quantifizierung hinaus konnte durch die Trypanblaufärbung eine Einschätzung Vitalität der Zellen erfolgen. Hier erschienen tote Zellen durch deren

beschädigte und somit durchgängige Plasmamembran unter dem Mikroskop blau gefärbt, während sich lebende hell leuchtend darstellten.

Zur Zählung hämatologischer Proben wurde der automatische Hämatologieanalysator Sysmex KX-21N verwendet. Dessen Messung beruht auf dem Prinzip der Impedanzmessung. Hierbei werden die Zellen einzeln durch eine Öffnung geleitet, an die eine Wechselspannung angelegt ist. Tritt eine Zelle zwischen die angelegte Spannung kann aufgrund der höheren Impedanz der Zelle im Vergleich zur Suspensionsflüssigkeit eine Spannungsänderung detektiert werden. Der Betrag dieser ist abhängig vom Volumen der Zelle. Somit kann wiederum neben der reinen Zellzählung eine Diskriminierung einzelner Zellpopulationen aufgrund ihrer Größe automatisiert durchgeführt werden.

Zur Messung der zu analysierenden Probe mittels Hämatologieanalysator wurden 10μ l hiervon zunächst 1/10 mit PBS/EDTA-Puffer (siehe 2.2.1) verdünnt und anschließend in den Analysator gegeben. Somit musste die bestimmte Zellkonzentration mit 10 multipliziert werden.

2.2.10 Statistik

Die statistischen Analysen erfolgten mittels des Analyseprogramms *GraphPad Prism Version 5.* Verwendet wurde, wenn eine Paarung möglich war, der abhängige Student's T-Test (*paired t-test*), ansonsten der unabhängige (*unpaired t-test*). Die Ergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardabweichung angegeben. Als Signifikanzniveau wurde 0.05 angenommen.

3 Ergebnisse

3.1 Reinheit der pDC

Nach Negativselektion der pDC erfolgte stichprobenartig die Reinheitskontrolle (siehe 2.2.2). Hierbei konnte eine Reinheit von MW=92,1% BDCA-4+[,] aus *Sytox Blue* negativen PBMC erreicht werden (siehe Abbildung 3).



Abbildung 3 Reinheit der pDC

a-c) repräsentative Dotplots einer aufgereinigten pDC Probe nach Stytox Blue und BDCA-4- Färbung. a) Ermittlung aller PBMC aus Größe (FSC) und Granularität (SSC). b) Darstellung aller PBMC. Alle Sytox Negativen werden als lebendige Zellen angenommen. c) Darstellung aller lebenden PBMC. Die Reinheit, also der Anteil BDCA-4+ CD123+ an allen vitalen PBMC beträgt 94,5%. d) Durchschnittliche Reinheit stichprobenartiger Kontrollen in %, FSC= forward scatter, SSC= side scatter, PBMC= peripheral blood mononuclear cells, N=21 unabhänige Versuche, Balkendiagramm mit MW+SD, eigene Darstellung



3.2 IFN- α Produktion von pDC in MSC Kokultur

Abbildung 4 Fotografische Darstellung der MSC

Fotografische, lichtmikroskopische Aufnahme einer repräsentativen MSC Monokultur (a) und einer repräsentativen pDC/MSC Kokultur nach 20h (b). Die MSC imponieren durch ihre spindeförmige Morphologie. Die pDC hingegen erscheinen kleiner und sphärisch. Eigene Darstellung

Die IFN-α Produktion von aufgereinigten pDC wurde nach TLR-spezifischer Stimulation in An- und Abwesenheit von 10% MSC vergleichend analysiert (siehe. 2.2.3 und 2.2.6).

Nach TLR-9 Stimulation mit CpG ODN 2216 zeigte sich eine signifikant höhere IFN-α Produktion in Anwesenheit von MSC im Vergleich zu den pDC alleine (siehe Abbildung 5). In den Kontrollen der MSC-Monokulturen konnte kein IFN α nachgewiesen werden.





Die IFN a Produktion ist in Anwesenheit von MSC signifikant verstärkt. N=9 unabhängige Versuche, Balkendiagramm mit MW+SD, (**P<.01, paired t-test), eigene Darstellung

Die TLR-7 Stimulation mit R848 ergibt wesentlich geringere IFN α Produktion als die TLR-9 Stimulation. Zugleich zeigen sich in der Aufschlüsselung der einzelnen Versuche

starke interindividuelle Unterschiede (siehe Abbildung 6b). Die Anwesenheit von MSC verstärkte das Ausmaß dieser IFN-α Produktion auf unterschiedlichem Niveau.



Abbildung 6 IFN-α im Überstand nach Kultur aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10% MSC nach Stimulation mit R848.

Die Produktion von IFN- α nach TLR-7 Stimulation mit R848 zeigt starke interindividuelle Unterschiede. Die Anwesenheit von MSC verstärkt diese in einigen Proben., N=15 unabhängige Versuche, a) Balkendiagramm mit MW + SD b) Dotplot mit Verbindung der einzelnen Paare (^P>.05, paired t-test), eigene Darstellung

Somit ergibt die Kokultur von pDC mit MSC eine signifikante Verstärkung der Produktion von IFN-α nach TLR-9 Stimulation mit CpG 2216. Bei TLR-7 Stimulation mit R848 ergibt sich in einigen Proben ein ähnlicher, weniger konstant und stark ausgeprägter Effekt.

3.3 IFN-α Produktion von pDC in MSC Kokultur in Transwell

Um zu prüfen, ob die verstärkte Interferon α Produktion von pDC in Anwesenheit von MSC von der Ausbildung interzellulärer Kontakte abhängt, wurde eine kompartimentelle Trennung der Zellen mittels Transwell-Einstätzen durchgeführt (siehe 2.2.5).

Nach TLR-9 spezifischer Stimulation mit CpG ODN 2216 führte die Separierung der pDC mittels Transwell zu signifikant geringeren IFN-α Werten im Vergleich zum identischen Versuchsablauf ohne Trennung. Die Anwesenheit von MSC zeigte hingegen signifikant höhere Werte als die pDC Monokulturen mit und ohne Trennung durch Transwell Einstätze (siehe Abbildung 7).



Abbildung 7 IFN-α im Überstand nach Kultur aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 30% MSC mit und ohne Trennung durch Transwell-Einsätze nach Stimulation mit CpG ODN 2216.

Die IFN-a Produktion durch pDC zeigt sich in Anwesenheit von MSC auch bei kompartimenteller Trennung durch Transwell Einstätze signifikant erhöht. N=6 unabhängige Versuche, Balkendiagramm mit MW+SD, (**P<.01, paired t-test, ⁺⁺P<.01, unpaired t-test) eigene Darstellung

Somit scheint die Ausbildung interzellulärer Kontakte nicht essentiell für die verstärkte IFN a Produktion von pDC in Anwesenheit von MSC und lösliche Faktoren müssen in Betracht gezogen werden.

3.4 IFN-α Produktion nach COX-Inhibition

Viele immunmodulatorische Effekte von MSC werden durch das proinflammatorische PGE2 vermittelt (siehe 1.5). Zur Prüfung, ob die durch MSC verstärkte IFN-α Produktion ebenfalls PGE2-abhängig ist, wurde die Kokultur nach Präinkubation mit dem COX-Inhibitor NS398 durchgeführt (siehe 2.2.4). Hierbei ergab sich eine unveränderte Verstärkung der IFN-α Produktion durch MSC unter dem Einfluss von NS398 im Vergleich zur Negativkontrolle (siehe Abbildung 8).



Abbildung 8 IFN-α im Überstand nach Kultur aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10% MSC mit und ohne Präinkubation mit NS398 nach Stimulation mit CpG ODN 2216.

MSC verstärken die IFN- α Produktion von pDC auch nach Präinkubation mit dem COX-Inhibitor NS398. N=3 unabhängige Versuche, Balkendiagramm mit MW + SD (**P<.01, paired t-test), eigene Darstellung

Somit ist von einem COX- und somit PGE2- unabhängigen, durch einen anderen löslichen Faktor vermittelten Prozess (siehe 3.3) auszugehen.

3.5 IL-6, IL-8 und TNF-α Produktion in pDC und MSC Kokultur

Um den Einfluss der Kokultivierung von pDC und MSC auf die Sekretion anderer Zytokine als IFN-α zu untersuchen erfolgte die Multizytokinanalyse der Überstände 20 stündiger Kokulturen (vgl. 2.2.3) auf IL-6, IL-8 und TNF-α mittels des *FlowCytomix* Bead-Assays (siehe 2.2.7).

Die MSC-Monokultur in An- und Abwesenheit verschiedener Stimulantien ergab eine mittlere IL-6 Basissekretion von ca. 2600pg/ml. Die Kokultivierung der MSC mit pDC nach TLR-7 Stimulation mit R848 ergab keine signifikante Veränderung der IL-6 Sekretion. Die Kokultur von MSC und pDC nach TLR-7 Stimulation mit R848 zeigte eine signifikant massiv verringerte IL-6 Produktion im Vergleich zur MSC-Monokultur (MW 68pg/ml vs. 2600pg/ml). Die pDC Monokulturen erbrachten unabhängig vom Stimulus keine relevanten IL-6 Nachweise (siehe Abbildung 9).



Abbildung 9 IL-6 im Überstand nach Kultur aufgereinigter pDC und 10% MSC nach Stimulation. MSC produzieren unabhängig von TLR-7 und TLR-9 Liganden konstitutiv IL-6. Mit R848 TLR-7 stimulierte pDC supprimieren dies signifikant. N=6 bzw. 9 unabhängige Versuche, Balkendiagramm mit MW + SD (++P<.01, unpaired t-test), eigene Darstellung

Die MSC Monokulturen zeigten auch in der IL-8 Analyse unabhängig vom Vorhandensein von Stimuli eine Basissekretion von im Mittel 1100pg/ml. Die Kokultur von pDC und MSC bei TLR-7 Stimulation mit R848 ergab keine signifikante Veränderung im Vergleich zur Monokultur. Im Rahmen der TLR-9 Stimulation mit CpG ODN 2216 zeigte sich in der pDC MSC Kokultur eine nichtsignifikante Verstärkung der IL-8 Sekretion im Vergleich zur MSC Monokultur (MW ca. 3800pg/ml vs 1100 pg/ml). Die pDC Monokultur ergab keinen relevanten IL-8 Nachweis (siehe Abbildung 10).



Abbildung 10 IL-8 im Überstand nach Kultur aufgereinigter pDC und 10% MSC nach Stimulation. MSC produzieren unabhängig von TLR-7 und -9 Liganden konstitutiv IL-8. In Kokultur mit TLR-9 stimulierten pDC zeigt sich eine nichtsignifikante Erhöhung dieser Produktion. N=6 bzw. 9 unabhängige Versuche, Balkendiagramm mit MW + SD (°P>.05, unpaired t-test), eigene Darstellung

pDC Monokulturen zeigten nach Stimulation mit R848 eine höhere TNF-α Produktion als nach Stimulation mit CpG ODN 2216 (MW 830pg/ml vs. 115 pg/ml). Bei der TLR-9 Stimulation mit CpG ODN 2216 zeigte die Anwesenheit von MSC, im Gegensatz zur TLR-7 Stimulation, eine signifikante Veränderung der TNF-α Sekretion (siehe Abbildung 11). MSC Monokulturen erbrachten keine nachweisbaren TNF-α- Spiegel (nicht gezeigt).



Abbildung 11 TNF-a im Überstand nach Kultur aufgereinigter pDC und 10% MSC nach Stimulation.

Die Stimulation von TLR-7 mit R848 erbringt signifikant höhere TNF- α – Werte als die TLR-9 Stimulation mit CpG 2216. MSC verstärken die TNF- α Produktion von MSC nach TLR-9 Stimulation mit CpG 2216 signifikant. Auf TLR-7 stimulierte pDC mit R848 zeigen sie keinen signifikanten Einfluss. N=6 bzw. 9 unabhängige Versuche, Balkendiagramm mit MW+SD (*P<.05, **P<.01, ^P>.05, paired t-test), eigene Darstellung

MSC zeigten in den Versuchsreihen konstitutive Produktion von IL-6 und IL-8. Die IL-8 Produktion war in Anwesenheit TLR-7 stimulierter pDC signifikant und deutlich supprimiert. Die IL-8 Produktion in MSC scheint durch TLR-9 stimulierte pDC nichtsignifikant leicht erhöht. Somit scheinen TLR stimulierte pDC einen Einfluss auf den Zytokinhaushalt von MSC zu nehmen. TNF-α wurde durch pDC stärker nach TLR-7 als nach TLR-9 Stimulation produziert. MSC verstärkten die TNF-α Produktion TLR-9 stimulierter pDC signifikant.

3.6 Oberflächenmarker von pDC in MSC- Kokultur

Um die Abhängigkeit der Reifung von pDC nach TLR-Stimulation von MSC zu prüfen, wurde die Expression der Oberflächenmoleküle CD80, CD86, HLA-DR und CD40 aufgereinigter pDC nach TLR-9 spezifischer Stimulation durchflusszytometrisch nach 10-20 stündigen Mono- und Kokulturen von pDC und 10% MSC bestimmt (Siehe 2.2.3 und 2.2.8). Die CD80 Expression von pDC stieg signifikant nach TLR 7 Stimulation mit R848. In der Kokultur mit MSC wurde diese hierbei signifikant verstärkt. Die TLR-9 Stimulation mit CpG ODN 2216 erbrachte keine Anstiege, sowohl in Ab- als auch in Anwesenheit von MSC (siehe Abbildung 12).

CD80



Abbildung 12 CD80 Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 20% MSC nach TLR-Stimulation. a) MSC verstärken die Expression von CD80 auf pDC nach TLR7 Stimulation mit R848. MFI= median fluorescence intensity, unst.= unstimuliert, N=4 bzw. 5 unabhängige Versuche (*P<.05, paired t-test), b) repräsentative Darstellung der Fluoreszenz einer pDC Kultur in An- und Abwesenheit von MSC nach Stimulation mit R848, Die durchschnittliche CD80 Fluoreszensintensität nimmt in Anwesenheit von MSC zu, Histogramm mit FI= Fluoreszenzintensität von CD80, eigene Darstellung

Ähnlich des Verhaltens von CD80 verhielt es sich hinsichtlich der CD86 Expression. Diese zeigte sich nach TLR-7 Stimulation mit R848 im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen signifikant gesteigert, was durch die Kokultur mit MSC signifikant verstärkt werden konnte (siehe Abbildung 13).



Abbildung 13 CD 86 Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 20% MSC nach TLR-Stimulation. a) MSC verstärken die Expression von CD86 auf pDC nach TLR7 Stimulation mit R848. MFI= median fluorescence intensity, unst.= unstimuliert, N=4 bzw. 5 unabhängige Versuche (*P<.05, **P<.01, paired t-test), b) repräsentative Darstellung der Fluoreszenz einer pDC Kultur in An- und Abwesenheit von MSC nach Stimulation mit R848, Die durchschnittliche CD86 Fluoreszensintensität nimmt in Anwesenheit von MSC zu, Histogramm mit FI= Fluoreszenzintensität von CD86, eigene Darstellung

Die HLA-DR (MHC-II) Expression konnte ebenfalls durch TLR-7 Stimulation mit R848 signifikant gesteigert werden. Im Gegensatz zu CD80 und CD86 erbrachte die Anwesenheit von MSC keine Verstärkung (siehe Abbildung 14). Die TLR-9 Stimulation mit CpG ODN 2216 zeigte keinen signifikanten Anstieg der HLA-DR Expression, sowohl in An- als auch in Abwesenheit von MSC.



Abbildung 14 HLA-DR Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 20% MSC nach TLR-Stimulation. TLR-7 Stimulation verstärkt die HLA-DR Expression von pDC. MSC beeinflussen diesen Reifungsprozess nicht. MFI= median fluorescence intensity, unst.= unstimuliert, N=4 bzw. 5 unabhängige Versuche, (^P>.05, **P<.01, paired t-test), eigene Darstellung

Die CD40 Expression in pDC wurde durch TLR-7 Stimulation mit R848 signifikant gesteigert. MSC zeigten keinen Einfluss hierauf. TLR-9 Stimulation mit CpG ODN 2216 verstärkte die CD40 Expression nicht signifikant. Auch dies konnte durch die Anwesenheit von MSC nicht moduliert werden.



Abbildung 15 CD40 Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 20% MSC nach TLR-Stimulation. TLR-7 Stimulation verstärkt die CD40 Expression von pDC. MSC beeinflussen diesen Reifungsprozess nicht. N=4 bzw. 5 unabhängige Versuche, MFI= median fluorescence intensity, (^P>.05, **P<.01, paired t-test), eigene Darstellung

In Zusammenschau dieser Experimente zeigten sich Anstiege der Expression aller untersuchten Oberflächenantigene (CD80, CD86, HLA-DR und CD40) nach Stimulation

des TLR-7 mit R848. MSC verstärkten diesen Reifungsprozess hinsichtlich einer Verstärkung der Expression der kostimulatorischen Antigene CD80 und CD86. TLR-9 Stimulation mit dem Klasse A CpG 2216 zeigte keinen signifikanten Reifungsprozess bei den untersuchten Antigenen, was sich wiederum nicht durch MSC modulieren ließ.

3.7 Oberflächenmarker nach Klasse C CpG ODN-Stimulation

Die TLR 9 Stimulation mit Klasse A CpG ODN 2216 erbrachte keinen phänotypischen Reifungsprozess in pDC hinsichtlich der Expression der Oberflächenantigene CD80, CD86, HLA-DR und CD40 (vgl. 3.6). Somit wurde die Stimulation um einen weiteren TLR-9 Liganden, Klasse C CpG ODN M362, ergänzt. Es erfolgte wiederum die 10-20 stündige Kultur aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10% MSC mit nachfolgender durchflusszytometrischer Messung genannter Oberflächenantigene (vgl. 2.2.3 und 2.2.8).

Die CD80 Expression zeigte sich nach TLR-9 Stimulation mit CpG ODN M362 signifikant gesteigert. Die Kokulur mit MSC ergab stark interindividuell unterschiedliche Modulation dieser Reifung. In einigen Fällen zeigte sich eine deutliche Verstärkung der CD80 Expression (siehe Abbildung 16b).



CD80

Abbildung 16 CD80 Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10% MSC nach TLR 9-Stimulation mit Typ C CpG M362.

TLR-9 Stimulation mit Klasse C CpG M362 induziert einen Reifungsprozess in pDC hinsichtlich gesteigerter CD80 Expression. MSC zeigen in einzelnen Versuchsobjekten eine Verstärkung dieses Effektes. a) Balkendiagramm mit MW + SD b) Dotplot mit Verbindung der einzelnen Paare, MFI= median fluorescence intensity, unst.= unstimuliert, N=6 unabhängige Versuche (^P>.05, **P<.01, paired t-test), eigene Darstellung Die CD86 Expression zeigte ebenfalls eine Verstärkung nach Stimulation mit CpG M362. Diese war im Vergleich zur CD80 Reifung schwächer ausgeprägt aber dennoch signifikant. Die Anwesenheit von MSC hatte eine interindividuell verschieden stark ausgeprägte, nicht signifikante Steigerung der CD86 Expression zur Folge (siehe Abbildung 17b).



Abbildung 17 CD86 Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10% MSC nach TLR 9-Stimulation mit Typ C CpG M362.

TLR-9 Stimulation mit Klasse C CpG M362 induziert einen Reifungsprozess in pDC hinsichtlich gesteigerter CD86 Expression. MSC zeigen in einzelnen Versuchsobjekten eine Verstärkung dieses Effektes. N=6 unabhängige Versuche, MFI= median fluorescence intensity, , a) Balkendiagramm mit MW + SD b) Dotplot mit Verbindung der einzelnen Paare (^P>.05, **P<.01, paired t-test), eigene Darstellung

Auch die Expression von HLA-DR konnte durch TLR-9 Stimulation mit CpG ODN M362 signifikant, auf unterschiedlichem Niveau gesteigert werden. MSC zeigten wiederum eine interindividuell verschieden ausgeprägte, insgesamt aber signifikante Verstärkung dieses Effektes (siehe Abbildung 18b).



Abbildung 18 HLA-DR Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10% MSC nach TLR 9-Stimulation mit Typ C CpG M362.

TLR 9 Stimulation mit Klasse C CpG M362 induziert einen Reifungsprozess in pDC hinsichtlich gesteigerter HLA-DR Expression. MSC zeigen eine signifikante Verstärkung dieses Effektes. a) Balkendiagramm mit MW + SD b) Dotplot mit Verbindung der einzelnen Paare, MFI= median fluorescence intensity,unst.= unstimuliert, N=6 unabhängige Versuche ($^{P>.05$, **P<.01, paired t-test), eigene Darstellung

Die Expression von CD40 konnte wiederum durch die TLR-9 Stimulation mit CpG ODN M362 signifikant verstärkt werden. Die Kokultur mit MSC führte zu konstanter, signifikanter Steigerung dieses Effektes (siehe Abbildung 19b).



Abbildung 19 CD40 Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10% MSC nach TLR 9-Stimulation mit Typ C CpG M362.

TLR-9 Stimulation mit Klasse C CpG M362 induziert einen Reifungsprozess in pDC hinsichtlich gesteigerter CD40 Expression. MSC zeigen eine signifikante Verstärkung dieses Effektes. a) Balkendiagramm mit MW + SD b) Dotplot mit Verbindung der einzelnen Paare, MFI= median fluorescence intensity,unst.= unstimuliert, N=6 unabhängige Versuche (^P>.05, **P<.01, paired t-test), eigene Darstellung In der Zusammenschau zeigte die Stimulation von TLR-9 auf pDC mit Klasse C CpG ODN M362 eine signifikante Reifung hinsichtlich der Oberflächenantigene CD86, CD80, HLA-DR und CD40. MSC modulierten diesen Effekt teils interindividuell stark verschieden und hinsichtlich HLA-DR und CD40 signifikant.

3.8 PD-L1 Expression in pDC

Zur Prüfung der Expression von PD-L1 auf aufgereinigten pDC nach TLR-Stimulation und die Abhängigkeit dessen von MSC erfolgte die Kokultur im Sinne der vorausgegangenen Experimente mit durchflusszytometrischer Messung von PD-L1 und CD86 zur Kontrolle. Die Stimulation erfolgte mit Gardiquimod für TLR-7 und CpG ODN M362 für TLR-9 (siehe 2.2.3 und 2.2.8).

TLR-7 Stimulation mit Gardiquimod führte zu einem deutlichen Anstieg die PD-L1 Expression in pDC. Diese zeigte sich in Anwesenheit von MSC signifikant supprimiert. Die TLR-9 Stimulation mit CpG ODN M362 erbrachte keine Steigerung von PD-L1, weder in An- noch in Abwesenheit von MSC (siehe Abbildung 20a). CD86 zeigte sich nach Stimulation mit Gardiquimod gesteigert, was signifikant durch MSC verstärkt wurde (siehe Abbildung 20b und Abbildung 21).



Abbildung 20 PD-L1 (a) und CD86 (b) Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10% MSC nach Stimulation.

MSC hemmen die PD-L1 Expression und steigern die CD86 Expression nach TLR7 Stimulation mit Gardiquimod N=6 unabhängige Versuche, MFI= median fluorescence intensity, unst.= unstimuliert (*P<.05, **P<.01, paired t-test), eigene Darstellung MSC scheinen somit die PD-L1 Expression TLR 7 stimulierter pDC zu hemmen. Die gesteigerte Expression von CD86 zeigte sich auch nach Stimulation mit dem TLR 7 Liganden Gardiquimod.



Abbildung 21 Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Messung aufgereinigter, gefärbter pDC nach 20h Kokultur und TLR-7 Stimulation

a) exemplarisches Gating von pDC aus einer aufgereinigten Kokultur aus FSC und SSC sowie nach CD123+ b+c) repräsentative Darstellung der Fluoreszenz einer pDC Kultur in An- und Abwesenheit von MSC nach Stimulation mit Gardiquimod. b) Die durchschnittliche CD86 Fluoreszenzintensität nimmt in Anwesenheit von MSC zu c) Die durchschnittliche PD-L1 Fluoreszenzintensität nimmt in Anwesenheit von MSC ab. Histogramme mit FI= CD 86 (a) bzw PD-L1 (b) Fluoreszenzintensität, eigene Darstellung

4 Diskussion

4.1 Anreicherung von pDC

Viele Untersuchungen an humanen pDC erfolgen mittels positiver Selektionierung, beispielsweise nach BDCA-4 oder BDCA-2 Expression. In dieser Arbeit erfolgte die Aufreinigung mittels negativer Selektionierung aus dem peripheren Blut gesunder Spender. Hierdurch konnte eine *untouched*- Isolation der pDC mit einer Reinheit von >90% erreicht werden (siehe 3.1). Der Hersteller des Aufreinigungskits *Stemmcell*-Technologies (siehe 2.2.2) definiert pDC der Aufreinigung als CD3-, CD14-, CD16-, CD19-, CD20-, CD34-, CD56- negativ und HLA-DR sowie BDCA-4 positiv. Dies ist konform mit der bisherigen Literatur (Facchetti et al. 2003).

Die Reinheitskontrollen erfolgten hier über die Darstellung aller lebenden BDCA-4 positiven Zellen (siehe Abbildung 3). Bei BDCA-4 handelt es sich um einen distinkten Marker für pDC, sodass er sich zur Reinheitskontrolle eignet (Dzionek et al. 2000). Somit konnte in dieser Arbeit eine den herkömmlichen Verfahren ebenbürtige Aufreinigung erreicht werden mit dem Vorteil, die Zellen nicht über Antikörper markieren zu müssen.

4.2 Kultivierung von MSC

In den durchgeführten Experimenten wurde in der Kultivierung der MSC in Kulturflaschen Medium ohne Kälberserum verwendet, was die Gefahr des Einflusses von Xenoimmunreaktionen sowie des Transfers boviner Pathogene minimierte. Der Ersatz durch HPL wurde in diversen Arbeitsgruppen hinsichtlich Effizienz und Funktionalität der MSC dem Kälberserum als mindestens gleichwertig beschrieben (Nold et al. 2013; Schallmoser et al. 2007).

In diversen Studien wurde gezeigt, dass die Differenzierungskapazität sowie die immunmodulatorischen Fähigkeiten von der Passagezahl der MSC abhängen (Schellenberg et al. 2012; Wagner et al. 2010). Daher wurde in den durchgeführten Versuchen auf die Verwendung niedrigpassagierter MSC, bis maximal Passage 5, geachtet. Ebenso zeigen Studien nachteilige Einflüsse auf MSC bei längerer Kryokonservierung (Samuelsson et al. 2009; Mamidi et al. 2012). Somit wurde diese auf wenige Wochen bis maximal 6 Monate begrenzt.

4.3 Kokultur und Stimulation

In den durchgeführten Versuchsreihen erfolgte die Stimulation mittels spezifischer Liganden für die TLR-7 und -9. Dies führt gleichsam zu einem spezifischen Ansprechen von pDC. Grund hierfür ist die exklusive Expression dieser TLR auf pDC (Kadowaki et al. 2001) und das Fehlen von TLR-7 und -9 auf MSC (Raicevic et al. 2010).

Die Auswahl der Liganden mitsamt der jeweiligen Konzentrationen erfolgte in Anlehnung an frühere Studien, die eine suffiziente Stimulation von pDC nachweisen konnten (Berghöfer et al. 2007; Berghöfer et al. 2006). Die verwendeten pDC/MSC-Verhältnisse (siehe Tabelle 11) gründen auf Titrationen von Vorexperimenten (nicht gezeigt) und zeigen sich kongruent mit früheren Studien mit humanen MSC und diversen DC Subpopulationen. Aggarwal und Pittenger untersuchten in ihrer Studie ebenfalls Aspekte der MSC/pDC-Interaktion. Sie verwendeten hier ein 1/1 Verhältnis, begründeten dies allerdings mit einer unzureichenden Aufreinigung der pDC (Aggarwal & Pittenger 2005; Van Den Berk et al. 2009; Dokić et al. 2013).

4.4 IFN- α Produktion von pDC in Kokultur mit MSC

MSC verstärkten die IFN α Produktion von pDC nach TLR-9 Stimulation mit A- CpG ODN signifikant (siehe Abbildung 5 und Abbildung 6). Ein solcher Effekt humaner MSC auf die IFN –Produktion von humanen pDC wurde in dieser Art bisher nicht beschrieben.

Die Konzentration von IFN- α in den Überständen der Kultur zeigte sich, unabhängig von der Anwesenheit von MSC, nach TLR-9 Stimulation deutlich höher als nach TLR-7 Stimulation. Dieser Unterschied, auch in der absoluten Höhe, zeigt sich kongruent mit vorangegangenen Publikationen mit ähnlichem Versuchsaufbau und gleichen Stimulantien (Berghöfer u. a., 2007). Die deutliche Streuung von IFN- α nach TLR-7 Stimulation, wie sie

sich in den vorliegenden Ergebnissen sowohl in An- als auch in Abwesenheit von MSC zeigte, ist ein bereits beschriebener Effekt. So konnten Berghöfer et al. zeigen, dass die IFN- α Produktion nach TLR-7 Stimulation in pDC signifikant geschlechtsabhängig und in Frauen stärker ausgeprägt ist (Berghöfer et al. 2006). Die altersabhängige Abnahme der IFN- α Produktion ist bei Stimulation mit TLR-7 stärker ausgeprägt als bei TLR-9 (Panda et al. 2010), woraus ebenfalls eine Spenderabhängigkeit hervorgeht. Es wäre daher denkbar, dass auch die Ausprägung des Effektes von MSC bei TLR 7 Stimulation von spenderspezifischen Faktoren wie Geschlecht oder anderen abhängig ist.

Diese Ergebnisse werden gesützt durch Beobachtungen von Consentius (Consentius 2016). Die Autorin konnte ebenfalls eine Verstärkung der IFN-α- Produktion durch A-CpG stimulierte pDC in Kokultur mit allogenen MSC zeigen. Ebenso konnte sie analog zu dieser Arbeit eine schwache verstärkende Wirkung auf die Reifung aktivierter pDC durch MSC hinsichtlich einiger Oberflächenantigene beobachten (vgl. 4.6).

4.4.1 IFN-α Produktion im Transwell

MSC vermitteln eine Reihe ihrer immunologischen Effekte über lösliche, andere über zellkontaktabhängige Mechanismen (siehe 1.5). Die Trennung der beiden Zelltypen mittels Transwell Einsätzen ermöglichte das Ausschalten der Ausbildung interzellulärer Kontakte.

Diese Arbeit konnte zeigen, dass nach Separierung der pDC von den MSC mittels Transwell- Einsätzen ebenfalls eine Verstärkung der IFN-α Produktion zu sehen ist (siehe Abbildung 7). Diese ist allerdings schwächer ausgeprägt als ohne kompartimentelle Trennung. Somit zeigt sich, dass die Ausbildung von interzellulären Kontakten zwischen pDC und MSC keine Voraussetzung für das Zustandenkommen des beschriebenen Phänomens ist. Trotzdem scheinen ihn kontaktabhängige Faktoren bzw. solche, die sich mittels Transwell Einsätzen ausschalten lassen, zu verstärken.

Denkbar wäre, dass MSC in diesem Zusammenhang als *feeder*-Zellen fungieren, also über verschiedene Mechanismen den Haushalt von pDC unterstützen. Eine solche Funktion von MSC auf pDC oder andere DC ist bisher nicht beschrieben. Etabliert ist allerdings die Verwendung von *feeder*-Matrizen u.a. bei der Expansion von HSC (Jang et al. 2006). Xie et al. beschrieben, dass diese supportiven Eigenschaften von MSC durch von ihnen freigesetzte Mikrovesikel vermittelt werden. Hierbei handelt es sich um aus dem

endosomalen Kompartiment der Zelle stammende Vesikel, die selektiv mit Proteinen, Lipiden oder Nukleinsäuren beladen und freigesetzt werden (Xie et al. 2016). Die Größe solcher Mikrovesikel wird zwischen 30nm und 1 μ m beschrieben (Biancone et al. 2012). Bei einer Porengröße der Transwellmembran von 0,4 μ m, wie in den vorliegenden Versuchsreihen, bedeutet dies, dass nicht alle Mikrovesikel die Barriere übertreten können. Somit könnte ein durch diese vermittelter Prozess nicht, oder nur vermindert ausgeprägt, auftreten. Unterstützt wird diese Hypothese durch eine Studie von Angelot et al., die eine fördernde Wirkung endothelialer Mikrovesikel auf die Reifung und Zytokinproduktion von pDC nachweisen konnte (Angelot et al. 2009). Ein stimulierender Effekt auf die IFN- α konnte hierin allerdings nicht gezeigt werden. Auch die Stimulation mit R848 erbrachte in der genannten Arbeit kein IFN- α , was eine Vergleichbarkeit hinsichtlich dieser Fragestellung erschwert (siehe 4.5.2 und 4.6).

4.4.2 IFN-α Produktion nach COX Inhibition

MSC mitteln eine Vielzahl ihrer immunmodulatorischen Effekte über PGE2, welches konstitutiv über COX-2 produziert wird (siehe 1.5). Bei NS398 handelt es sich um einen COX-2- Inhibitor, der die Aktivität des Enzyms und somit die Produktion von PGE2 in MSC inhibiert (Arikawa et al. 2004; Panara et al. 1995). Die Vorbehandlung von MSC mit dem Inhibitor hatte in den durchgeführten Versuchen keinen Einfluss auf das Ausmaß der Verstärkung der IFN-a Produktion der pDC nach TLR-9 Stimulation. Fabricius et al. konnten zeigen, dass PGE2 das Ausmaß der IFN-a Produktion in pDC hemmt (Fabricius et al. 2010; Son et al. 2006). Son et al. beschrieben darüber hinaus eine Inhibition weiterer Zytokine in pDC durch PGE2 wie beispielsweise TNF-a sowie eine verminderte Proliferation von Lymphozyten nach Antigenpräsentation durch pDC. Sie beschrieben PGE2 hierbei als negativen Regulator von pDC. So kommt es zwar nicht als Ursache der verstärkten IFN-a Produktion durch MSC in Betracht. Allerdings zeigt die COX-Inhibition auch keine Verstärkung des in dieser Arbeit beschriebenen Effekts, wie man ihn bei konstitutiver Produktion von MSC ohne Vorbehandlung erwarten könnte. Somit scheinen MSC entweder die von Fabricius et al. beschriebene Wirkung von PGE2 zu maskieren oder pDC selbst inhibieren die Produktion von PGE2 in MSC.

4.5 Weitere Zytokine in pDC und MSC Kokultur

4.5.1 IL-6 und IL-8

Die vorliegende Arbeit zeigte eine konstitutive Produktion der Zytokine IL-6 und IL-8 durch MSC, was kongruent mit bisherigen Studien ist. So konnte dies neben der bereits beschriebenen konstitutiven Produktion von PGE2 (siehe 4.4.2) für eine Reihe weiterer Zytokine, wie auch IL-6 und IL-8, gezeigt werden (Kögler et al. 2005).

Auch in pDC wurde eine Produktion dieser Zytokine beschrieben. So konnte gezeigt werden, dass sie diese zwar nicht wie MSC konstitutiv aber nach Stimulation ihrer TLR-7 und -9 produzieren (Decalf et al. 2007). In vorliegender Arbeit zeigte sich im Gegensatz dazu keine IL-6 Produktion in pDC Monokulturen, weder nach TLR-7 noch nach TLR-9 Stimulation. Hingegen konnte ein Nachweis von IL-8 nach Stimulation des TLR-7 mit R848 erbracht werden. Die stärkere Produktion von IL-8 nach Stimulation des TLR-7 im Vergleich zur Stimulation des TLR-9 mit Klasse A CpG ODN zeigt sich auch in den Ergebnissen von Decalf et al. Allerdings wurden zur TLR-7 Stimulation in deren Experimenten keine Imidazoquinolin Derivate, wie das in den vorliegenden Experimenten verwendete Resiquimod (R848), verwendet, sondern Influenza-Virusstämme, welche ebenfalls als TLR-7 Agonisten in pDC fungieren (Edwards et al. 2003). Darüber hinaus wiesen Decalf et al. äußerst geringe Konzentrationen dieser Zytokine nach. Eine interindividuelle Streuung, wie es diverse Studien auch für IFN-α beschreiben (siehe 4.4), könnte diese unterschiedlichen Ergebnisse erklären.

In den Kokulturen von MSC mit pDC zeigten sich divergierende Effekte. So war IL-6 in Anwesenheit des TLR-7 Agonisten R848 im Vergleich zur konstitutiven Produktion der MSC (s.o.) in der Kokultur deutlich supprimiert, wohingegen sich nach TLR-9 Stimulation keine signifikante Änderung ergab (siehe Abbildung 9). Eine solche Suppression der konstitutiven Produktion von IL-6 in MSC wurde in einer tierexperimentellen Studie von Li et al. als Folge von Differenzierung in Endothel- und Muskelzellen beschrieben (Li et al. 2013). Somit könnte ein ursächlicher Faktor für diese Ergebnisse eine Induktion der Differenzierung von MSC durch pDC sein. Für eine direkte Modulation der MSC durch pDC oder andere DC fehlt die Evidenz (Dokić et al. 2015). Allerdings zeigten einige Studien, dass die osteogene Differenzierung von MSC durch proinflammatorische Zytokine getriggert werden kann, die auch von pDC produziert werden. TNF- α (Ding et al. 2009) und IL-6 (Erices et al. 2002) sind hierbei beschrieben. Erices et al. beschrieben, dass sich Knochenmark- MSC durch fehlende Expression des IL-6- Rezeptors der osteogenen Wirkung des selbst produzierten IL-6 entziehen und spekulierten, dass weitere Signale für die Differenzierung vonnöten sind. Sollte die Suppression der IL-6 Produktion in MSC dieser Arbeit Folge osteogener Differenzierung sein, könnten pDC ein solches Signal liefern.

Im Gegensatz zu IL-6 zeigte sich IL-8 in der Kokultur von MSC und pDC bei Stimulation mit dem Klasse A CpG ODN 2216 tendenziell erhöht (siehe Abbildung 10). Als ursächlich hierfür könnte ein von Decalf et al. sowie anderen Autoren beschriebener Effekt in Betracht gezogen werden. So konnte in verschiedenen Zelltypen eine Induzierbarkeit von IL-8 durch u.a. TNF- α gezeigt werden (Decalf et al. 2007; Matsushima & Oppenheim 1989). Osawa et al. konnten in humanen Hepatozyten zeigen, dass dies hierbei über Aktivierung des NF- \varkappa B Signalweges vermittelt wird (Osawa et al. 2002). Zugleich zeigten mehrere Arbeitsgruppen eine Induktion dieses Signalweges sowohl in murinen als auch in humanen MSC nach Stimulation dieser mit TNF- α (Crisostomo et al. 2008; Bai et al. 2017). In vorliegender Arbeit konnte eine Produktion von TNF α durch pDC nach A-CpG ODN gezeigt werden, welche in Anwesenheit von MSC noch stärker ausfiel (siehe Abbildung 11, Kapitel 3.5 und 4.5.2). Angesichts o.g. Zusammenhänge könnte die verstärkte Produktion von TNF- α von pDC nach TLR-9 Stimulation über einen NF- \varkappa B abhängigen Mechanismus ursächlich für die verstärkte Produktion von IL-8 durch MSC sein.

4.5.2 *TNF*-α

In den durchgeführten Experimenten zeigte sich in den pDC Monokulturen sowohl nach TLR-7, als auch nach TLR-9 Stimulation eine Produktion von TNF- α in pDC Monokulturen, wobei sie bei Ersterer größer ausfiel. Diese stärkere Produktion von TNF- α nach TLR-7- im Vergleich zur TLR-9-Stimulation zeigte sich auch bei Decalf et al. (Decalf et al. 2007). MSC verstärken die TNF- α Produktion nach TLR-9, nicht aber nach TLR-7 Stimulation (siehe Abbildung 11).

Wie auch im Falle von IFN- α zeigten Son et al. eine verminderte Produktion von TNF- α durch pDC unter dem Einfluss von PGE2 (Son et al. 2006). So scheinen auch in diesem Fall

die Effekte der MSC diese Wirkung des durch sie konstitutiv produzierten PGE2 zu maskieren (vgl. 4.4.2).

TNF- α wird auch von anderen DC Subpopulationen, wie cDC, nach Stimulation produziert (siehe 1.1). Der Einfluss von MSC hierauf wurden von Aggarwal und Pittenger beschrieben. MSC inhibieren die TNF- α Produktion in cDC signifikant. PGE2 fungiert bei dieser Inhibition als Mediator. Diese Wirkung steht im Gegensatz zur verstärkten Produktion des Proteins in dieser Arbeit. Aggarwal und Pittenger verzichteten in ihren Versuchen auf die Analyse der TNF- α Produktion in pDC aufgrund mangelnder Reinheit mit zu hohen cDC Fraktionen (Aggarwal & Pittenger 2005).

Wie in 4.4.1 angesprochen, fungieren Mikrovesikel aus MSC als Vermittler von *feeder*-Mechanismen. Der Einfluss von diesen auf cDC oder pDC ist noch nicht untersucht. Eine Studie von Angelot et al. beschrieb hingegen den Einfluss von endothelialen Mikrovesikeln auf pDC. Diese stimulieren eine Produktion von TNF-a. Eine "Kostimulation" mit TLR Agonisten, um eine Verstärkung dieses Effektes zu erreichen führten sie nicht durch (Angelot et al. 2009). (siehe 4.4.1 und 4.6)

4.6 pDC Reifung in MSC Kokultur

Vorliegende Arbeit konnte eine Verstärkung der Reifung TLR stimulierter pDC in Anwesenheit von MSC zeigen. Hierbei hebt sich besonders die Verstärkung der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 hervor, die sich in starker Ausprägung nach TLR-7 Stimulation (siehe Abbildung 12, Abbildung 13 und Abbildung 20) aber auch, mit stärkerer interindividueller Streuung, nach TLR-9 Stimulation mit Klasse C CpG ODN zeigt (siehe Abbildung 16 und Abbildung 17).

Bei TLR-9 Stimulation zeigten sich in dieser Arbeit abhängig von den verwendeten Stimulantien divergierende Effekte. Nach Stimulation mit dem Klasse A CpG ODN 2216 zeigte sich im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen keine Reifung hinsichtlich aller untersuchten Oberflächenmarker CD80, CD86, CD40 und HLA-DR. Auch die Anwesenheit von MSC zeigte keine Verstärkung (siehe 3.6). Anders verhielt es sich bei Stimulation mit dem Klasse C CpG ODN M362, bei dem eine konsistente Reifung aller dieser Oberflächenmarker zu verzeichnen war. Hierbei handelt es sich um einen Effekt, der schon in 1.2 genannt wurde. Verschiedene Klassen von CpG ODN als TLR-9 Agonisten erzielen verschiedene Wirkungen in pDC (siehe Tabelle 1). So zeigten Guiducci et al., dass Klasse A CpG ODN vor allem die IFN a Produktion, allerdings keine Reifung in pDC induzieren. Klasse C CpG ODN bewirken hingegen sowohl die IFN a Produktion als auch eine Reifung, was sich kongruent mit den vorliegenden Ergebnissen zeigt (Guiducci et al. 2006). MSC verstärkten in den durchgeführten Versuchen die Reifung nach Simulation mit dem Klasse C CpG ODN M362 in einigen Versuchsobjekten bei allen untersuchten Oberflächenmarkern und hinsichtlich CD40 und CD86 signifikant (siehe 3.7).

Im Falle der TLR-7 Stimulation ergab diese Arbeit bei verschiedenen Liganden konsistentere Ergebnisse. So zeigte die Stimulation mit Resiquimod (R848) hinsichtlich der untersuchten Oberflächenmarker im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen eine deutliche Verstärkung (siehe 3.6). Auch bei der Stimulation mit Gardiquimod konnte eine Reifung von CD86 nachgewiesen werden (siehe 3.8). Ligandenspezifische Unterschiede im oben beschriebenen Sinne bei der TLR-9 Stimulation ergaben sich hier nicht. Eine solche Reifungsinduktion bezüglich der untersuchten Marker auf pDC der Imidazoquinolin-Derivate Resiquimod und Gardiquimod wurde in diversen Arbeiten gezeigt (Bajwa et al. 2016; Gibson et al. 2002). MSC verstärkten in dieser Arbeit die Induktion der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 nach TLR-7 Stimulation.

Diese erstmalig beschriebene stimulierende Wirkung auf die Reifung TLR stimulierter pDC steht im Gegensatz zu vielen beschriebenen Effekten von MSC auf andere DC Subpopulationen. Nauta et al. beschrieben eine verminderte Expression der untersuchten Proteine nach Reifungsinduktion mit CD40L. Zugleich zeigten sie, dass eine TLR induzierte Reifung durch LPS bei in Anwesenheit von MSC differenzierten moDC ausblieb (Nauta et al. 2006). Ähnliches beschrieben Spaggiari et al. und konnten in zugleich zeigen, dass dieser inhibitorische Effekt abhängig von PGE2 aus MSC ist (Spaggiari et al. 2009). Aber einige publizierte Daten suggerieren auch gegensätzliche Effekte. Van den Berk et al. wiesen nach, dass die LPS induzierte Reifung ausdifferenzierter moDC durch Nabelschnur- MSC keine signifikante Hemmung erfahren. Zugleich beschrieben sie eine signifikant verstärkte Produktion des proinflammatorischen Zytokins IL-12 in Anwesenheit von MSC (Van Den Berk et al. 2009). Einen ähnlichen, im Gegensatz zur

Inhibition stehenden Effekt auf die Reifung von moDC zeigten Dokić et al. Sie konnten sogar eine signifikante Verstärkung der zytokininduzierten Reifung, verstärkte IL-12 Produktion sowie Lymphozytenproliferation durch moDC in Kokultur mit MSC aus dentalen periapikalen Läsionen nachweisen (Dokić et al. 2013). Die Ursachen für die Unterschiede dieser Daten sind noch nicht vollständig geklärt. Diese Studien unterscheiden sich in einigen Parametern, wie der Art der Reifungsinduktion oder der Herkunft der MSC, von dieser Arbeit. Sie weisen aber darauf hin, dass unter bestimmten Umständen MSC in der Lage sind, die Reifung von bestimmten DC-Subpopulationen zu stimulieren, wie es diese Arbeit und auch Dokić et al. zeigten.

In den Ergebnissen von Consentius (siehe 4.4) zeigt sich bezüglich des Einflusses allogener MSC auf die Reifung aktivierter humaner pDC ein schwacher Effekt. Hinsichtlich CD80 und CD83 konnten sie vergleichbar zur dieser Arbeit eine schwache Verstärkung beobachten (Consentius 2016).

Wie schon in den Kapiteln 4.4.1 und 4.5.2 angedeutet, kommen für die verstärkte Reifung über Mikrovesikel vermittelte *feeder*-Wirkungen der MSC infrage. Eine Studie von Angelot et al. beschrieb die Wirkung endothelialer Mirkovesikel auf die Reifung humaner pDC. Hiernach sind diese in der Lage eine Reifung in pDC in ähnlichem Ausmaß wie TLR-7 und -9 Liganden zu induzieren (siehe 4.4.1 und 4.5.2). Eine "Kostimulation" von Mikrovesikeln und TLR-Agonisten führten sie nicht durch. Die Autoren beschrieben, dass diese Wirkung mit Mikrovesikeln endothelialen, aber nicht thromo- oder lymphozytären Ursprungs erreicht wird (Angelot et al. 2009). Somit ist eine vergleichbare Wirkung von MSC- Mikrovesikeln nicht zwangsläufig. Einige Autoren beschrieben, dass die Membranen von Mikrovesikeln einiger Zellen Phosphatidylserin beinhalten (Biancone et al. 2012; Sabatier et al. 2002), welches in einer Reihe von Immunprozessen vor allem der Apoptose beteiligt ist (Savill et al. 2002). pDC exprimieren Phosphatidylserin-Rezeptoren, welche in der Aufnahme von Virionen eine Rolle spielen (Feng et al. 2015). Dies könnte einen möglichen Wirkmechanismus von MSC-Mikrovesikeln darstellen.

4.7 Tolerogene Funktionen

Die tolerogene Kapazität von pDC durch MSC wurde bereits in Kapitel 1.2 angesprochen. Vorliegende Arbeit zeigte, dass die Stimulation mit TLR-7 eine deutliche Verstärkung des PD-L1 Expression in pDC hervorruft (siehe Abbildung 20). Diese spezielle Art des Reifungsprozesses wurde bereits durch Meier et al. mit Imiquimod statt Gardiquimod als Stimulanz gezeigt (Meier et al. 2008).

Neben pDC präsentieren auch MSC, insbesondere bei Kokultivierung mit allogenen Zellen oder nach Priming mit IFN- PD-L1 was einen weiteren Wirkmechanismus der T-Zell Hemmung durch MSC darstellt (Augello et al. 2005; Chinnadurai et al. 2014). Aus diesem Grund erfolgte bei der Analyse der Oberflächenmarker das vorherige Gating der pDC als CD123 positive Zellen (siehe Abbildung 21).

Die Anwesenheit von MSC bewirkte eine signifikante Hemmung dieser verstärkten PD-L1 Expression auf pDC nach TLR-7 Stimulation und somit eine Reduktion ihrer tolerogenen Kapazität. Ein derartiger Einfluss auf die PD-L1 Expression humaner pDC ist hier erstmalig beschrieben. Den Einfluss muriner MSC auf die PD-L1 Expression von TLR-4 stimulierte zeigten cDC beschrieben Moravej et al. Sie eine signifikante zellkontaktabhängige Verstärkung der Expression in Anwesenheit von MSC (Moravej et al. 2017). Sie berichten weiterhin bei einem bestimmten Verhältnis von MSC zu cDC von signifikant höheren Konzentrationen von PD-L1 messenger-RNA (mRNA), während hinsichtlich der Proteinexpression keine Unterschiede zu sehen waren. Sie beschrieben diese Ergebnisse als konsistent mit früheren Studien, wonach das Ausmaß der PD-L1 mRNA Produktion nicht zwangsläufig mit der Produktion des Proteins korrelieren (Dong et al. 1999; Ishida et al. 2002). Die Ergebnisse von Moravej et al. mit murinen cDC sind gegensätzlich zu denen in dieser Arbeit anhand humaner pDC beschriebenen. Zugleich zeigten sie aber, dass bei der Analyse des Einflusses auf die PD-L1 Expression neben der quantitativen Messung der Proteinexpression die Analyse der mRNA Transskripte das Bild vervollständigt.

4.8 Immunprivilegierung von MSC

Eine Reihe von Studien zeigen, dass MSC ihre immunmodulatorischen Wirkungen auf DC und andere Effektorzellen auch bei allogener Anwendung ausüben (siehe 1.5 und 4.6). Als Grund hierfür wird eine Immunprivilegierung diskutiert, die eine verminderte Alloimmunantwort durch MSC hervorruft. Ursächlich scheint eine geringe Expression von HLA- und kostimulatorischen Domänen (Tse et al. 2003; Consentius et al. 2015).

Inwieweit eine solche Immunprivilegierung auch in vivo relevant ist, ist in Anbetracht der Frage nach der therapeutischen Anwendung allogener MSC von besonderem Interesse (siehe 1.6). Eine Reihe präklinischer und klinischer Studien untersuchen daher die Immunogenität allogener MSC in vivo. Hierbei zeigt sich, dass allogene MSC in gewissen Umständen sowohl eine zelluläre wie auch eine humorale Alloimmunantwort zu induzieren, diese aber aufgrund ihrer immunmodulierenden Wirkungen abgeschwächt werden kann (Griffin et al. 2010). Dies zeigt, dass besonders angesichts der steigenden klinischen Anwendung von MSC im Rahmen zukünftiger klinischer Studien der Frage nach Alloimmunantwort und der Konsequenz für die jeweilige Indikation besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden muss (Consentius et al. 2015).

4.9 Immunstimulation durch MSC

Oben beschriebene verstärkende Effekte von MSC auf die Zytokinproduktion, besonders IFN-a und TNF-a, sowie die Reifung stimulierter pDC stehen im Gegensatz zu den vielseitig beschriebenen immunsuppressiven Wirkungen von MSC (siehe 1.5). Wie in den Kapiteln 4.4.1, 4.5.2 und 4.6 beschrieben, könnte hierbei ein *feeder*-Effekt durch MSC Mikrovesikel eine ursächliche Rolle spielen. Allerdings kommen auch direkte immunstimulierende Wirkungen der MSC in Betracht. Eine Reihe publizierter Daten verschiedener Arbeitsgruppen stützt die Annahme, dass es sich bei MSC nicht um per se immunsupprimierende Zellen handelt.

So zeigten klinische Beobachtungen, dass nach Behandlung von akuter GVHD mittels allogener MSC in einigen Patienten ein ineffektiver Effekt zu verzeichnen war, während bei anderen gar eine Verschlechterung des klinischen Zustandes auftrat (Le Blanc et al. 2008; Miura et al. 2008). Darüber hinaus zeigten einige in vivo Studien nach Fremdorgantransplantation in einzelnen Versuchstieren eine verstärkte Transplantatabstoßung nach Behandlung mit MSC (Inoue et al. 2006; Kuo et al. 2009). In vitro Studien zeigten, dass der Status der Entzündung mit dem Vorhandensein oder dem Mangel diverser Zytokine entscheidend dafür ist, ob MSC immunsupprimierend oder stimulierend wirken. So beschreiben Li et al., dass verminderte Konzentrationen von TNF- α oder IFN- γ , wie sie aus geringer T-Zell Dichte resultieren, eine verstärkte T-Zell-Proliferation in Anwesenheit von MSC bewirken. Höhere Zytokinkonzentrationen bei respektive höherer Lymphozytendichte wiederum haben eine Hemmung der Proliferation zur Folge (Li et al. 2012). Zugleich konnten sie anhand muriner MSC zeigen, dass eine geringe Konzentration dieser proinflammatorischen Zytokine eine geringere Produktion von NO nach sich zieht. NO fungiert in murinen Zellen als Mediatior einer Reihe immunsuppressiver Wirkungen von MSC (Ren et al. 2008). Li et al. zeigten, dass oben beschriebene verminderte Produktion von NO wie auch dessen gezieltes Ausschalten in MSC eine Immunstimulation zur Folge hat. Ähnliches beschrieben sie auch anhand humaner Zellen, bei denen nicht durch NO, sondern vielmehr durch IDO viele immunsupprimierende Wirkungen vermittelt werden (Ren et al. 2009). Durch IDO-Knockdown in MSC humanen zeigten sie ebenfalls eine verstärkte Lymphozytenproliferation (Li et al. 2012). Vergleichbare Effekte zeigten auch Renner et al. Sie beschrieben, dass nach mangelhafter Stimulation von T-Zellen mittels niedriger Dosen Concanavalin A MSC auf diese einen stimulierenden Effekt zeigen. Erfolgt die Stimulation hingegen mittels adäquater Dosen, hemmen MSC die daraus resultierende Proliferation (Renner et al. 2009). Eine ähnliche bimodale Natur der MSC wurde bereits in Kapitel 1.5 mit der Polarisation von MSC über TLR-4 Stimulation in ein proinflammatorisches Subset angesprochen (Waterman et al. 2010). Die Arbeit von Dokić et al., welche den stimulierenden Einfluss von MSC aus dentalen apikalen Läsionen, also einem entzündlichen Milieu, auf moDC beschreibt, stützt dies (vgl. 4.6) (Dokić et al. 2013).

Diese beschriebenen Daten zur immunstimulatorischen Wirksamkeit von MSC gründen vor allem auf in vivo Beobachtungen oder Nachweisen ihrer Funktion, die Proliferation von T-Zellen zu fördern. Unter bestimmten Umständen konnte eine solche stimulierende Wirkung auch auf diverse DC-Subpopulationen gezeigt werden (siehe 4.6.).

4.10Ausblick

Diese Arbeit konnte einen stimulierenden Effekt humaner MSC auf die IFN-α und die TNF-α-Produktion sowie die Reifung TLR-stimulierter humaner pDC zeigen. Zudem konnte eine Hemmung der Expression des tolerogenen PD-L1 auf pDC gezeigt werden. Diese Daten zeigen erstmals die mögliche stimulierende Wirkung auf humane pDC durch MSC hinsichtlich verschiedener Aspekte.

Viele Studien über die immunregulatorischen Eigenschaften von MSC wie auch ihre klinische Anwendung suggerieren, dass es sich bei ihnen um per se immunsupprimierende Zellen handelt. Allerdings mehren sich die Hinweise, dass sie unter bestimmten Umständen auch zu immunstimulierenden Wirkungen in der Lage sind (siehe 4.9). Dies ist aufgrund der stetig wachsenden Anzahl klinischer Studien und der damit einhergehenden Berichte über Verschlechterungen oder Versagen unter Therapie von besonderem Interesse. Die stimulierende Wirkung von MSC auf pDC liefert eine weitere Facette dieser Immunstimulation durch MSC. Es wird wichtig sein, die genauen Voraussetzungen sowie Mechanismen dieser Stimulation sowie ihre Bedeutung in vivo und in klinischen Studien zu beleuchten.

Diese Arbeit, gepaart mit den Ergebnissen weiterer Studien lassen die Hypothese zu, dass MSC- Mikrovesikel, zumindest in Teilen, ursächlich für die Stimulation von pDC sind (siehe 4.4.1, 4.5.2 und 4.6.). Physiologische Wirkungen und mögliche klinische Anwendungen dieser Vesikel sind Gegenstand vielfältiger Studien. Rad et al. beschrieben ein Protokoll zur Isolation von MSC-Mikrovesikeln (Rad et al. 2016). Ein interessanter Ansatz zur Prüfung o.g. Hypothese könnte die Reproduktion der beschriebenen Experimente unter Verwendung solcher Mikrovesikel sein.

Einen weiteren interessanten Ansatz liefern Li et al., die einen Mangel an NO in MSC für immunstimulierende Wirkungen auf murine Lymphozyten verantwortlich machten. Sie berichteten gleichzeitig davon, dass analog dazu in humanen MSC durch Knockdown von IDO ebenfalls stimulatorische Wirkungen erzielt werden können (siehe 4.9) (Li et al. 2012). Eine Prüfung dieser Zusammenhänge auf pDC könnte ebenfalls Erkenntnisse über zugrundeliegende Mechanismen liefern. Die stimulierenden Wirkungen von MSC auf pDC betreffen sowohl ihre Zytokinproduktion als auch die Reifung von Markern für die T-Zell Stimulation. Die funktionelle Relevanz dieser Reifung bleibt nicht untersucht. So wäre beispielsweise die Proliferation antigenspezifischer T-Zellen unter dem Einfluss MSC- und Antigengeprimter pDC, auch vor dem Hintergrund einer möglichen klinischen Relevanz, interessant. Tel, Aarntzen et al. beschrieben die klinische Anwendung Tumorantigenbeladener pDC in Patienten mit metastasiertem Melanom und zeigten eine suffiziente Proliferation tumorspezifische CD8 positiver T-Zellen mit zugleich vielversprechendem klinischen Ansprechen (Tel, Aarntzen, et al. 2013). Eine Reifungsamplifikation von pDC, wie in der vorliegenden Arbeit durch MSC gezeigt, könnte diese Ergebnisse nochmals verbessern.

5 Zusammenfassung

pDC übernehmen vielfältige Aufgaben des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Über Stimulation durch Detektion freier Nukleinsäuren mittels ihrer TLR-7 und -9 produzieren sie große Mengen an IFN-a sowie eine Reihe weiterer proinflammatorischer Zytokine. Darüber hinaus resultiert die TLR-Stimulation in einem Reifungsprozess hinsichtlich verstärkter Expression von Komplexen zur T-Zell Aktivierung (z.B. HLA-DR, CD80, CD86 und CD40). MSC zeigen beachtliche Fähigkeiten in Differenzierung sowie Immunmodulation. Eine Reihe von Studien beschrieben ihre hauptsächlich immunsupprimierenden Wirkungen auf diverse Zellen des Immunsystems wie Lymphozyten, Granulozyten und cDC. Diese Effekte werden teils durch zellkontaktabhängige, teils durch lösliche Faktoren, wie PGE2, vermittelt. Der Einfluss humaner MSC auf pDC ist noch nicht vollständig verstanden. Diese Studie soll dies hinsichtlich Zytokinproduktion und Reifung anhand aufgereinigter Zellen untersuchen.

Hierfür wurden Knochenmark MSC mit aufgereinigten pDC kokultiviert. pDC wurden aus PBMC aus den Buffy-Coats gesunder Blutspender immunmagnetisch angereichert. Hierdurch konnte eine Reinheit von >90% lebender BDCA-4 positiver Zellen erreicht werden. pDC wurden TLR- spezifisch mit Klasse A (2216) und Klasse C (M362) CpG ODN als TLR-9 Agonisten sowie Resiquimod (R848) und Gardiquimod als TLR-7 Agonisten stimuliert. IFN- α und andere proinflammatorische Zytokine (TNF- α , IL6, IL-8) in den Kulturüberständen wurden mittels ELISA bzw. Zytokin-bead assay gemessen. Die Messung der Expression der Oberflächenmarker HLA-DR, CD80, CD86, CD40 und PD-L1 erfolgte nach spezifischer Oberflächenfärbung durchflusszytometrisch.

Diese Arbeit zeigt eine signifikante Verstärkung der IFN-α Produktion TLR-9 stimulierter pDC in Kokultur mit MSC. Dieser Effekt ist, aufgrund durchgeführter Transwell-Experimente, zumindest in Teilen nicht zellkontaktabhängig. COX-Inhibition in MSC durch NS398 zeigen keine Verringerung dieses Effekts, was PGE2 als möglichen Mediator ausschließt. MSC zeigen eine konstitutive Produktion von IL-6 und IL-8. IL-6 war in Anwesenheit TLR-7 stimulierter pDC signifikant verringert wohingegen IL-8 in Anwesenheit TLR-9 stimulierter pDC verstärkt wird. Die Produktion von TNF-α durch TLR-9 stimulierter pDC wird durch MSC signifikant erhöht. Die Expression der Oberflächenmarker CD80 und CD86 auf TLR-7 stimulierten pDC zeigt sich durch MSC signifikant verstärkt. CpG ODN M362 stimulierte pDC zeigen eine verstärkte Reifung in Anwesenheit von MSC. Dies ist bei verschiedenen Antigenen verschieden stark ausgeprägt und im Falle von HLA-DR und CD40 signifikant. Daneben verringern MSC die Expression des tolerogenen PD-L1 auf pDC nach TLR-7 Stimulation.

Diese Studie zeigt erstmals mögliche stimulierende Effekte humaner MSC auf IFN-a Produktion und Reifung TLR stimulierter humaner pDC. Die funktionelle Relevanz dieser Ergebnisse wie ihr Einfluss auf T-Zell Aktivierung sowie die zugrundeliegenden Mechanismen bedürfen weiterer Studien.
6 Summary

pDC take part in a variety of processes of the innate and the adaptive immune system. Through stimulation by detection of free nucleic acids by their TLR-7 and -9, pDC produce high amounts of IFN- α as well other proinflammatory cytokines. Furthermore, TLR-stimulation results in phenotypical maturation by upregulation of T-cell-activation-complexes like HLA-DR, CD80, CD86 and CD40. MSC show substantial differential and immunoregulatory capacities. Many studies describe the mainly immunosuppressive effects of MSC on several immune-cells like lymphocytes, granulocytes and cDCs. These effects are mediated by cell-contact-dependent and soluble factors like PGE2. The effects of human MSC on human pDC remain not fully understood. This study attempts to examine the effects of human MSC on cytokine production and maturation of purified human pDC.

Therefore, human bone marrow derived MSC were cocultured with pDC. pDC were immunomagnetically enriched from PBMCs of buffy-coats from healthy blood donors with a purity of >90% living BDCA-4 positive cells. pDC were TLR specifically stimulated with class A (2216) and class C (M362) CpG ODN as TLR-9 ligands and Resiquimod (R848) and Gardiquimod as TLR-7 ligands. IFN- α and other proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-6, IL-8) in the coculture supernatants were measured by ELISA and cytokine-bead-assay respectively. For examination of surface marker expression of HLA-DR, CD80, CD86, CD40 and PD-L1 cells were specifically surface-labeled and measured by flow-cytometry.

This study shows a significant increase of IFN-α production by TLR-9 and -7 stimulated pDC when cocultured with MSC. This effect is, due to performed transwell-experiments, at least in part cell contact independent. COX-inhibition of MSC by NS398 cannot diminish this effect which excludes PGE2 as a possible mediator. IL-6 and IL-8 are constitutively produced by MSC. The production of IL-6 is significantly decreased in the presence of TLR-7 stimulated pDC whereas the IL-8 production is significantly increased by TLR-9 stimulated pDC. The TNF-α production of TLR 9 stimulated pDC is significantly higher in presence of MSC. Surface marker expression of CD80 und CD86 of TLR-7 stimulated pDC is increased by MSC. CpG ODN M362 stimulated pDC show a significant increased expression of maturation markers in the presence of MSC. Especially CD40 and CD86 are

significantly increased. Besides this amplification of maturation, MSC inhibit the upregulation of the tolerogenic PD-L1 in TLR-7 stimulated pDC.

This study presents for the first time possible immunostimulatory effects of human MSC on TLR- stimulated pDC regarding IFN-a production and maturation. The functional relevance of this stimulation on immunological processes like T-cell activation as well as the underlying mechanisms needs to be further examined.

7 Abkürzungsverzeichnis

AML	akute myeloische Leukämie
ANA	Antinukleäre Antikörper
APC	Allophycocyanin
BPDCN	Blastische Plasmazytoide Dendritische Zellneoplasie
CD	cluster of differentiation
cDC	konventionelle dendritische Zelle
CpG	Cytosin-Phosphatbrücke-Guanin
CTL	zytotoxische T- Lymphozyten
CTLA4	cytotoxic T-lmyphocyte-associated Protein 4
Cy7	Cyanin Cy7
DC	dendritische Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsDNA	Doppelstrang- DNA
ELISA	enzyme linked immunosorbent assay
FITC	Fluorescein-5-isocyanat
FSC	Vorwärtsstreulich, forward scatter
G-CSF	granulocyte- colony stimulating factor
GVHD	Graft-versus-Host disease
H7	Analogon von Cyanin Cy7
HPL	Humanes Plättchenlysat
HRP	horseradish Peroxidase
HSC	hämatopoietische Stammzellen
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
IKK	I <i>x</i> B Kinase
IL	Interleukin
IRAK	interleukin-1 receptor associated kinase
IRF	interferon regulatory factor
ISCT	International Society for Cellular Therapy
LPS	Lipopolysaccharid
LVEF	linksventrikuläre Ejektionsfraktion
MFI	mediane Fluoreszenz Intensität
МНС	Major Histocompatibility Complex
moDC	monozytär differentierte dendritische Zelle
mRNA	messenger RNA
MSC	mesenchymale Stammzellen/ Stromazellen
MyD88	myeloid differentiation primary response protein 88
NF- <i>H</i> B	nuclear factor- <i>xB</i>
NK Zellen	Natürliche Killer Zellen

NO	Stickstoffmonoxid
ODN	Oligodesoxynukleotide
РВМС	Mononukleäre Zellen aus peripherem Blut
PD	programmed death protein
PD-L	programmed-death- Ligand
pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
PE	Phycoerythrin
R848	Resiquimod
RNA	Ribonukleinsäure
SLE	Systemischer Lupus Erythematodes
SSC	Seitwärtsstreulicht, side scatter
ssRNA	Einzelstrang-RNA
TGF-β	Transforming growth factor β
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAF	TNF receptor associated factor,
TZR	T-Zell-Rezeptor
	-

8 Literaturverzeichnis

- Aggarwal, S. & Pittenger, M.F., 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), pp.1815–1822.
- Angelot, F. et al., 2009. Endothelial cell-derived microparticles induce plasmacytoid dendritic cell maturation: Potential implications in inflammatory diseases. *Haematologica*, 94(11), pp.1502–1512.
- Arikawa, T., Omura, K. & Morita, I., 2004. Regulation of bone morphogenetic protein-2 expression by endogenous prostaglandin E2 in human mesenchymal stem cells. *Journal of Cellular Physiology*, 200(3), pp.400–406.
- Augello, A. et al., 2005. Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European Journal of Immunology*, 35(5), pp.1482–1490.
- Bai, X. et al., 2017. TNF-α promotes survival and migration of MSCs under oxidative stress *via* NF-κB pathway to attenuate intimal hyperplasia in vein grafts. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, XX(X), pp.1–15.
- Bajwa, G. et al., 2016. Cutting Edge: Critical Role of Glycolysis in Human Plasmacytoid Dendritic Cell Antiviral Responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, p.1501557.
- Banchereau, J. & Palucka, A.K., 2005. Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. *Nature Reviews Immunology*, 5(4), pp.296–306.
- Barrat, F.J. et al., 2005. Nucleic acids of mammalian origin can act as endogenous ligands for Toll-like receptors and may promote systemic lupus erythematosus. *The Journal of experimental medicine*, 202(8), pp.1131–9.
- Bartholomew, A. et al., 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*, 30(1), pp.42–48.

- Båve, U. et al., 2003. FcγRIIa Is Expressed on Natural IFN-α-Producing Cells (Plasmacytoid Dendritic Cells) and Is Required for the IFN-α Production Induced by Apoptotic Cells Combined with Lupus IgG. *The Journal of Immunology*, 171(6).
- Berghöfer, B. et al., 2007. Natural and synthetic TLR7 ligands inhibit CpG-A- and CpG-Coligodeoxynucleotide-induced IFN-alpha production. *Journal of immunology* (*Baltimore, Md. : 1950*), 178(7), pp.4072–4079.
- Berghöfer, B. et al., 2006. Production in Females α TLR7 Ligands Induce Higher IFN-TLR7 Ligands Induce Higher IFN- Production in Females. *J Immunol References*, 177(4), pp.2088–2096.
- van den Berk, L.C.J. et al., 2009. Toll-like receptor triggering in cord blood mesenchymal stem cells. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(9B), pp.3415–26.
- Van Den Berk, L.C.J. et al., 2009. Cord blood mesenchymal stem cells propel human dendritic cells to an intermediate maturation state and boost interleukin-12 production by mature dendritic cells. *Immunology*, 128(4), pp.564–572.
- Biancone, L. et al., 2012. Therapeutic potential of mesenchymal stem cell-derived microvesicles. *Nephrology Dialysis Transplantation*, 27(8), pp.3037–3042.
- Le Blanc, K. et al., 2005. Fetal Mesenchymal Stem-Cell Engraftment in Bone after In Utero Transplantation in a Patient with Severe Osteogenesis Imperfecta. *Transplantation*, 79(11), pp.1607–1614.
- Le Blanc, K. et al., 2008. Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*, 371(9624), pp.1579–1586.
- Le Blanc, K. et al., 2004. Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet*, 363(9419), pp.1439–1441.
- Blasius, A.L. & Beutler, B., 2010. Intracellular Toll-like Receptors. *Immunity*, 32(3), pp.305–315.
- Boesteanu, A.C. & Katsikis, P.D., 2009. Memory T cells need CD28 costimulation to remember. *Seminars in Immunology*, 21(2), pp.69–77.

- Buitendijk, M., Eszterhas, S.K. & Howell, A.L., 2013. Gardiquimod: a Toll-like receptor-7 agonist that inhibits HIV type 1 infection of human macrophages and activated T cells. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 29(6), pp.907–918.
- Campagnoli, C. et al., 2001. Identification of mesenchymal stem / progenitor cells in human first-trimester fetal blood , liver , and bone marrow. *Blood*, 98(8), pp.2396–2403.
- Cella, M. et al., 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature Medicine*, 5(8), pp.919–923.
- Chen, L.-B., Jiang, X.-B. & Yang, L., 2004. Differentiation of rat marrow mesenchymal stem cells into pancreatic islet beta-cells. *World journal of gastroenterology : WJG*, 10(20), pp.3016–3020.
- Chinnadurai, R. et al., 2014. IDO-Independent Suppression of T Cell Effector Function by IFN-γ–Licensed Human Mesenchymal Stromal Cells. *The Journal of Immunology*, 192(4).
- Consentius, C., 2016. *Inhibition of the crosstalk between dendritic*, *natural killer and T cells by mesenchymal stromal / stem cells.* Dissertation, Humboldt-Universität Berlin.
- Consentius, C., Reinke, P. & Volk, H., 2015. Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells : what has been seen in vitro and in vivo ? *Rege*, 10, pp.305–315.
- Crisostomo, P.R. et al., 2008. Human mesenchymal stem cells stimulated by TNF-, LPS, or hypoxia produce growth factors by an NF B- but not JNK-dependent mechanism. *AJP: Cell Physiology*, 294(3), pp.C675–C682.
- Cyranoski, D., 2012. Canada approves stem cell product. *Nature Biotechnology*, 30(7), pp.571–571.
- Decalf, J. et al., 2007. Plasmacytoid dendritic cells initiate a complex chemokine and cytokine network and are a viable drug target in chronic HCV patients. *The Journal of experimental medicine*, 204(10), pp.2423–37.
- Delarosa, O., Dalemans, W. & Lombardo, E., 2012. Toll-like receptors as modulators of mesenchymal stem cells. *Frontiers in immunology*, 3, p.182.

- Diana, J. et al., 2011. Viral infection prevents diabetes by inducing regulatory T cells through NKT cell-plasmacytoid dendritic cell interplay. *The Journal of experimental medicine*, 208(4), pp.729–45.
- Ding, J. et al., 2009. TNF- α and IL-1 β inhibit RUNX2 and collagen expression but increase alkaline phosphatase activity and mineralization in human mesenchymal stem cells. *Life Sciences*, 84(15), pp.499–504.
- Djouad, F. et al., 2007. Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. *Stem Cells*, 25(8), pp.2025– 2032.
- Dokić, J. et al., 2013. Mesenchymal stem cells from periapical lesions modulate differentiation and functional properties of monocyte-derived dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 43(7), pp.1862–1872.
- Dokić, J.M., Tomić, S.Z. & Čolić, M.J., 2015. Cross-Talk Between Mesenchymal Stem/Stromal Cells and Dendritic Cells. *Current stem cell research & therapy*, pp.51– 65.
- Dominici, M. et al., 2006. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 8(4), pp.315–317.
- Dong, H. et al., 1999. B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion. *Nature Medicine*, 5(12), pp.1365–9.
- Dzionek, A. et al., 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 165(11), pp.6037–46.
- Edwards, A.D. et al., 2003. Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *European journal of immunology*, 33(4), pp.827–33.
- Egen, J.G., Kuhns, M.S. & Allison, J.P., 2002. CTLA-4: new insights into its biological function and use in tumor immunotherapy. *Nature immunology*, 3(7), pp.611–618.

- English, K. et al., 2007. IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunology Letters*, 110(2), pp.91–100.
- English, K., 2013. Mechanisms of mesenchymal stromal cell immunomodulation. *Immunology and cell biology*, 91(1), pp.19–26.
- Erices, A., Conget, P. & Minguel, J.J., 2002. gp130 Activation by Soluble Interleukin-6 Receptor/Interleukin-6 Enhances Osteoblastic Differentiation of Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *Experimental Cell Research*, 280(1), pp.24–32.
- Fabricius, D. et al., 2010. Prostaglandin E2 inhibits IFN-alpha secretion and Th1 costimulation by human plasmacytoid dendritic cells via E-prostanoid 2 and Eprostanoid 4 receptor engagement. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 184(2), pp.677–684.
- Facchetti, F. et al., 2003. The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells. *Virchows Archiv*, 443(6), pp.703–717.
- Farkas, L. et al., 2001. Plasmacytoid dendritic cells (natural interferon- alpha/betaproducing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *The American journal of pathology*, 159(1), pp.237–43.
- Feng, Z. et al., 2015. Human pDCs preferentially sense enveloped hepatitis A virions. Journal of Clinical Investigation, 125(1), pp.169–176.
- Feuillard, J. et al., 2002. Clinical and biologic features of CD4+ CD56+ malignancies. *Blood*, 99(5), pp.1556–1563.
- Freeman, G.J. et al., 2000. Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation. *The Journal of experimental medicine*, 192(7), pp.1027–34.
- Friedenstein, A.J. et al., 1974. Stromal cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. Cloning in vitro and retransplantation in vivo. *Transplantation*, 17(4), pp.331–40.

- Friis, T. et al., 2011. Mesenchymal stromal cell derived endothelial progenitor treatment in patients with refractory angina. *Scandinavian cardiovascular journal : SCJ*, 45(3), pp.161–168.
- Fuse, C., Zhang, W. & Usherwood, E.J., 2008. Control of Memory CD8+ T Cell Differentiation by CD80/CD86-CD28 Costimulation and Restoration by IL-2 during the Recall Response. *J Immunol*, 180(2), pp.1148–1157.
- Gibson, S.J. et al., 2002. Plasmacytoid dendritic cells produce cytokines and mature in response to the TLR7 agonists, imiquimod and resiquimod. *Cellular Immunology*, 218(1–2), pp.74–86.
- Griffin, M.D., Ritter, T. & Mahon, B.P., 2010. Immunological Aspects of Allogeneic Mesenchymal Stem Cell Therapies. *Human Gene Therapy*, 21(12), pp.1641–1655.
- Guiducci, C. et al., 2006. Properties regulating the nature of the plasmacytoid dendritic cell response to Toll-like receptor 9 activation. *The Journal of experimental medicine*, 203(8), pp.1999–2008.
- Hackstein, H. et al., 2016. Contact-dependent abrogation of bone marrow-derived plasmacytoid dendritic cell differentiation by murine mesenchymal stem cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 476(1), pp.15–20.
- Haynesworth, S.E., Baber, M.A. & Caplan, A.I., 1996. Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: effects of dexamethasone and IL-1 alpha. *Journal of cellular physiology*, 166(3), pp.585–92.
- Honda, C. et al., 2005. Spatiotemporal regulation of MyD88 IRF-7 signalling for robust type-I interferon induction. *Nature*, 434(0), pp.1–6.
- Inoue, S. et al., 2006. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model. *Transplantation*, 81(11), pp.1589–1595.
- Ishida, M. et al., 2002. Differential expression of PD-L1 and PD-L2, ligands for an inhibitory receptor PD-1, in the cells of lymphohematopoietic tissues. *Immunology Letters*, 84(1), pp.57–62.

Izaguirre, A. et al., 2003. Comparative analysis of IRF and IFN-alpha expression in human

plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells., 74(December), pp.1125–1138.

- Jang, Y.K. et al., 2006. Mesenchymal stem cells feeder layer from human umbilical cord blood for ex vivo expanded growth and proliferation of hematopoietic progenitor cells. *Annals of Hematology*, 85(4), pp.212–225.
- Kadowaki, N. et al., 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different tolllike receptors and respond to different microbial antigens. *The Journal of experimental medicine*, 194(6), pp.863–869.
- Karussis, D. et al., 2011. Safety and Immunological Effects pf Mesenchymal Stem Cell Transplantation in Patients With Multiple Sclerosis and Amyotrophic Lateral Sclerosis. Archives of neurology, 67(10), pp.1187–1194.
- Kiel, M.J. & Morrison, S.J., 2008. Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nature Reviews Immunology*, 8(4), pp.290–301.
- Kim, D.H. et al., 2005. Gene expression profile of cytokine and growth factor during differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cell. *Cytokine*, 31(2), pp.119–126.
- Kögler, G. et al., 2005. Cytokine production and hematopoiesis supporting activity of cord blood-derived unrestricted somatic stem cells. *Experimental Hematology*, 33(5), pp.573–583.
- Krieg, A.M. et al., 1995. CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature*, 374(6522), pp.546–549.
- Kuo, Y.-R. et al., 2009. Mesenchymal Stem Cells Prolong Composite Tissue Allotransplant Survival in a Swine Model. *Transplantation*, 87(12), pp.1769–1777.
- Lanier, L.L. et al., 1995. CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 154(1), pp.97–105.
- Lee, J.-W. et al., 2014. A randomized, open-label, multicenter trial for the safety and efficacy of adult mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction. *Journal of Korean medical science*, 29(1), pp.23–31.

- Li, P. et al., 2013. Interleukin-6 downregulation with mesenchymal stem cell differentiation results in loss of immunoprivilege. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 17(9), pp.1136–1145.
- Li, W. et al., 2012. Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death and Differentiation*, 19(9), pp.1505–1513.
- Li, Y.-P. et al., 2008. Human mesenchymal stem cells license adult CD34+ hemopoietic progenitor cells to differentiate into regulatory dendritic cells through activation of the Notch pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(3), pp.1598–608.
- Libri, N.A. et al., 2009. A class C CpG toll-like receptor 9 agonist successfully induces robust interferon-alpha production by plasmacytoid dendritic cells from patients chronically infected with hepatitis C. , pp.315–324.
- Majumdar, M.K. et al., 2000. Human Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells (MSCs) Express Hematopoietic Cytokines and Support Long-Term Hematopoiesis When Differentiated Toward Stromal and Osteogenic Lineages. *Cell Biochemistry and Function*, 848, pp.841–848.
- Mamidi, M.K. et al., 2012. Comparative cellular and molecular analyses of pooled bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells during continuous passaging and after successive cryopreservation. *Journal of Cellular Biochemistry*, 113(10), pp.3153– 3164.
- Martin, P.J.J. et al., 2010. Prochymal Improves Response Rates In Patients With Steroid-Refractory Acute Graft Versus Host Disease (SR-GVHD) Involving The Liver And Gut: Results Of A Randomized, Placebo-Controlled, Multicenter Phase III Trial In GVHD. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 16(2), pp.S169–S170.
- Matsushima, K. & Oppenheim, J.J., 1989. Interleukin 8 and MCAF: novel inflammatory cytokines inducible by IL 1 and TNF. *Cytokine*, 1(1), pp.2–13.
- Means, T.K. et al., 2005. Human lupus autoantibody-DNA complexes activate DCs through cooperation of CD32 and TLR9. *The Journal of clinical investigation*, 115(2),

pp.407–17.

- Meier, A. et al., 2008. Upregulation of PD-L1 on monocytes and dendritic cells by HIV-1 derived TLR ligands. *AIDS*, 22(5), pp.655–658.
- Méndez-Ferrer, S. et al., 2010. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*, 466(7308), pp.829–34.
- Mescher, M.F. et al., 2006. Signals required for programming effector and memory development by CD8+ T cells. *Immunological Reviews*, 211, pp.81–92.
- Miura, Y. et al., 2008. Mesenchymal stem cells for acute graft-versus-host disease. *Lancet*, 372, pp.715–716.
- Miyamura, K., 2016. Insurance approval of mesenchymal stem cell for acute GVHD in Japan: need of follow up for some remaining concerns. *International Journal of Hematology*, 103(2), pp.155–164.
- Moravej, A. et al., 2017. Mesenchymal Stem Cells Upregulate the Expression of PD-L1 But Not VDR in Dendritic Cells. *Immunological Investigations*, 46(1), pp.80–96.
- Murphy, K.M., Travers, P. & Walport, M., 2009. Janeway Immunologie,
- Najar, M. et al., 2010. Mesenchymal stromal cells use PGE2 to modulate activation and proliferation of lymphocyte subsets: Combined comparison of adipose tissue, Wharton's Jelly and bone marrow sources. *Cellular Immunology*, 264(2), pp.171–179.
- Nauta, A.J. et al., 2006. Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol*, 177(4), pp.2080–2087.
- Nicola, M. Di et al., 2002. induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), pp.3838–3843.
- Nold, P. et al., 2013. Good manufacturing practice-compliant animal-free expansion of human bone marrow derived mesenchymal stroma cells in a closed hollow-fiber-

based bioreactor. *Biochemical and biophysical research communications*, 430(1), pp.325–30.

- O'Sullivan, B.J. & Thomas, R., 2002. CD40 Ligation Conditions Dendritic Cell Antigen-Presenting Function Through Sustained Activation of NF-B. *The Journal of Immunology*, 168(11), pp.5491–5498.
- Orozco, L. et al., 2013. Treatment of Knee Osteoarthritis With Autologous Mesenchymal Stem Cells. *Transplantation Journal*, 95(12), pp.1535–1541.
- Osawa, Y. et al., 2002. Tumor necrosis factor alpha-induced interleukin-8 production via NF-kappaB and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathways inhibits cell apoptosis in human hepatocytes. *Infection and immunity*, 70(11), pp.6294–6301.
- Panara, M.R. et al., 1995. Effects of the novel anti-inflammatory compounds , N-[2-(cyclohexyloxy)-4-nitrophenyl] methanesulphonamide (NS-398) and 5methanesulphonamido-6-(2,4-difluorothio- phenyl)-1-indanone (L-745,337), on the cyclo-oxygenase activity of human blood prostaglandin. *British Journal of Pharmacology*, 116, pp.2429–2434.
- Panda, A. et al., 2010. Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *Journal of immunology* (*Baltimore, Md. : 1950*), 184(5), pp.2518–27.
- Pevsner-fischer, M. et al., 2007. Toll-like receptors and their ligands control mesenchymal stem cell functions. *Differentiation*, 109(4), pp.1422–1432.
- Pittenger, M.F. et al., 1999. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem Cells. *Science*, 284(5411).
- Rad, F. et al., 2016. Microvesicles preparation from mesenchymal stem cells. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*, 30, p.398.
- Raffaghello, L. et al., 2008. Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem cells (Dayton, Ohio)*, 26(1), pp.151–62.

Raicevic, G. et al., 2010. Inflammation modifies the pattern and the function of Toll-like

receptors expressed by human mesenchymal stromal cells. *Human Immunology*, 71(3), pp.235–244.

- Reizis, B. et al., 2011. Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions. Annual review of immunology, 29, pp.163–83.
- Ren, G. et al., 2008. Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*, 2(2), pp.141–150.
- Ren, G. et al., 2009. Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cellmediated immunosuppression. *Stem Cells*, 27(8), pp.1954–1962.
- Renner, P. et al., 2009. Mesenchymal Stem Cells Require a Sufficient, Ongoing Immune Response to Exert Their Immunosuppressive Function. *Transplantation Proceedings*, 41(6), pp.2607–2611.
- Sabatier, F. et al., 2002. Interaction of endothelial microparticles with monocytic cells in vitro induces tissue factor-dependent procoagulant activity. *Blood*, 99(11), pp.3962–3970.
- Samuelsson, H. et al., 2009. Optimizing in vitro conditions for immunomodulation and expansion of mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy*, 11(2), pp.129–136.
- Savill, J. et al., 2002. A blast from the past: clearance of apoptotic cells regulates immune responses. *Nature reviews. Immunology*, 2(12), pp.965–975.
- Schallmoser, K. et al., 2007. Human platelet lysate can replace fetal bovine serum for clinical-scale expansion of functional mesenchymal stromal cells. *Transfusion*, 47(8), pp.1436–46.
- Schellenberg, A. et al., 2012. Population dynamics of mesenchymal stromal cells during culture expansion. *Cytotherapy*, 14(4), pp.401–11.
- Shi, C., 2012. Recent progress toward understanding the physiological function of bone marrow mesenchymal stem cells. *Immunology*, 136(2), pp.133–138.
- Shi, S. & Gronthos, S., 2003. Perivascular Niche of Postnatal Mesenchymal Stem Cells in Human Bone Marrow and Dental Pulp. *Journal of Bone and Mineral Research*, 18(4),

pp.696-704.

- da Silva Meirelles, L. et al., 2009. Mechanisms involved in the therapeutic properties of mesenchymal stem cells. *Cytokine and Growth Factor Reviews*, 20(5–6), pp.419–427.
- Smits, E.L.J.M. et al., 2008. The use of TLR7 and TLR8 ligands for the enhancement of cancer immunotherapy. *The oncologist*, 13(8), pp.859–75.
- Son, Y. et al., 2006. Prostaglandin E2 is a negative regulator on human plasmacytoid dendritic cells. *Immunology*, 119(1), pp.36–42.
- Spaggiari, G.M. et al., 2006. Mesenchymal stem cell-natural killer cell interactions: evidence that activated NK cells are capable of killing MSCs, whereas MSCs can inhibit IL-2induced NK-cell proliferation. *Blood*, 107(4).
- Spaggiari, G.M. et al., 2009. MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: Central role of MSCderived prostaglandin E2. *Blood*, 113(26), pp.6576–6583.
- Steinman, R.M., 2012. Decisions About Dendritic Cells: Past, Present, and Future. Annual Review of Immunology, 30(1), pp.1–22.
- Steinman, R.M. & Cohn, Z.A., 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *The Journal of experimental medicine*, 137(5), pp.1142–62.
- Steinman, R.M., Hawiger, D. & Nussenzweig, M.C., 2003. Tolerogenic Dendritic Cells. Annual Review of Immunology, 21(1), pp.685–711.
- Sumanasinghe, R.D. et al., 2009. Expression of proinflammatory cytokines by human Mesenchymal stem cells in response to cyclic tensile strain. *Journal of Cellular Physiology*, 219(1), pp.77–83.
- Swiecki, M. & Colonna, M., 2015. The multifaceted biology of plasmacytoid dendritic cells. *Nature reviews. Immunology*, 15(8), pp.471–485.
- Szabolcs, P. et al., 2010. Treatment Of Steroid-Refractory Acute GVHD With Mesenchymal Stem Cells Improves Outcomes In Pediatric Patients; Results Of The

Pediatric Subset In A Phase III Randomized, Placebo-Controlled Study. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 16(2), p.S298.

- Tel, J. et al., 2012. Harnessing human plasmacytoid dendritic cells as professional APCs. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 61(8), pp.1279–1288.
- Tel, J., Schreibelt, G., et al., 2013. Human plasmacytoid dendritic cells efficiently crosspresent exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets. *Blood*, 121(3), pp.459–67.
- Tel, J., Aarntzen, E., et al., 2013. Natural Human Plasmacytoid Dendritic Cells Induce Antigen-Specific T-Cell Responses in Melanoma Patients. *Cancer Research*, 73(3), pp.1063–1075.
- Tokita, D. et al., 2008. High PD-L1/CD86 Ratio on Plasmacytoid Dendritic Cells Correlates With Elevated T-Regulatory Cells in Liver Transplant Tolerance. *Transplantation*, 85(3), pp.369–377.
- Tse, W.T.T. et al., 2003. Suppression of allogeneic T-cell proliferation by human marrow stromal cells: implications in transplantation. *Transplantation*, 75(3), pp.389–97.
- Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V., 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 8(9), pp.726–736.
- Ueda, Y. et al., 2003. Frequencies of dendritic cells (myeloid DC and plasmacytoid DC) and their ratio reduced in pregnant women: comparison with umbilical cord blood and normal healthy adults. *Human Immunology*, 64(12), pp.1144–1151.
- Villadangos, J.A. & Young, L., 2008. Antigen-Presentation Properties of Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity*, 29(3), pp.352–361.
- Wagner, W., Ho, a D. & Zenke, M., 2010. Different facets of aging in human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part B Rev.*, 16(4), pp.445–453.
- Waterman, R.S. et al., 2010. A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PloS one*, 5(4), p.e10088.

- Wilson, A. & Trumpp, A., 2006. Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. Nature reviews. Immunology, 6(2), pp.93–106.
- Worbs, T., Hammerschmidt, S.I. & Förster, R., 2016. Dendritic cell migration in health and disease. *Nature Reviews Immunology*.
- Xie, H. et al., 2016. Mesenchymal stem cell-derived microvesicles support Ex vivo expansion of cord blood-derived CD34+ cells. *Stem Cells International*, 2016.
- Yamout, B. et al., 2010. Bone marrow mesenchymal stem cell transplantation in patients with multiple sclerosis: A pilot study. *Journal of Neuroimmunology*, 227(1), pp.185– 189.
- Zhao, K. et al., 2015. Immunomodulation effects of mesenchymal stromal cells on acute graft-versus-host disease after hematopoietic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 21(1), pp.97–104.
- Zuk, P.A. et al., 2002. Human Adipose Tissue Is a Source of Multipotent Stem Cells. *Molecular Biology of the Cell*, 13(12), pp.4279–4295.

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1 Übersicht über die unterschiedlichen Funktionen reifer und unreifer DC4
Abbildung 2 Die verschiedenen Signalwege nach TLR-7&-9 Stimulation von pDC6
Abbildung 3 Reinheit der pDC
Abbildung 4 Fotografische Darstellung der MSC
Abbildung 5 IFN-α im Überstand nach Kultur aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10% MSC nach Stimulation mit CpG ODN 221637
Abbildung 6 IFN-α im Überstand nach Kultur aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10% MSC nach Stimulation mit R84838
Abbildung 7 IFN-α im Überstand nach Kultur aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 30% MSC mit und ohne Trennung durch Transwell-Einsätze nach Stimulation mit CpG ODN 2216
Abbildung 8 IFN-α im Überstand nach Kultur aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10% MSC mit und ohne Präinkubation mit NS398 nach Stimulation mit CpG ODN 2216
Abbildung 9 IL-6 im Überstand nach Kultur aufgereinigter pDC und 10% MSC nach Stimulation
Abbildung 10 IL-8 im Überstand nach Kultur aufgereinigter pDC und 10% MSC nach Stimulation
Abbildung 11 TNF-a im Überstand nach Kultur aufgereinigter pDC und 10% MSC nach Stimulation
Abbildung 12 CD80 Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 20% MSC nach TLR-Stimulation
Abbildung 13 CD 86 Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 20% MSC nach TLR-Stimulation

Abbildung 14 HLA-DR Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 20%
MSC nach TLR-Stimulation46
Abbildung 15 CD40 Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 20%
MSC nach TLR-Stimulation46
Abbildung 16 CD80 Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10%
MSC nach TLR 9-Stimulation mit Typ C CpG M36247
Abbildung 17 CD86 Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10%
MSC nach TLR 9-Stimulation mit Typ C CpG M36248
Abbildung 18 HLA-DR Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10%
MSC nach TLR 9-Stimulation mit Typ C CpG M36249
Abbildung 19 CD40 Expression aufgereinigter pDC in An- und Abwesenheit von 10%
MSC nach TLR 9-Stimulation mit Typ C CpG M36249
Abbildung 20 PD-L1 (a) und CD86 (b) Expression aufgereinigter pDC in An- und
Abwesenheit von 10% MSC nach Stimulation50
Abbildung 21 Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Messung
aufgereinigter, gefärbter pDC nach 20h Kokultur und TLR-7 Stimulation51

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Übersicht über verschiedene Wirkungen (links) unterschiedlicher Klassen
synthetischer CpG ODN (oben) als TLR-9 Liganden auf pDC8
Tabelle 2 Übersicht über alle verwendeten Fluoreszenz markierten Antikörper
Tabelle 3 Übersicht über alle verwendenten Stimulantien19
Tabelle 4 Übersicht über alle verwendeten Chemikalien19
Tabelle 5 Übersicht über alle verwendeten fertigen Reagenziensätze
Tabelle 6 Übersicht über alle verwendeten Verbrauchsgegenstände20
Tabelle 7 Übersicht über alle verwendeten Geräte21
Tabelle 8 Übersicht über die verwendete Software22
Tabelle 9 Übersicht über das verwendete humane Probenmaterial
Tabelle 10 Kokultur Medium27
Tabelle 11 Übersicht über die verwendeten Zellzahlen in den einzelnen Versuchsreihen29
Tabelle 12 Übersicht über die verwendeten Stimulantien sowie die jeweiligen Endkonzentrationen

11 Publikationsverzeichnis

Vortrag:

Philipp Ensel, Philipp Nold, Gabriela Haley, Andreas Neubauer, Gregor Bein, Cornelia Brendel, Holger Hackstein: Human mesenchymal stem cells can promote Interferon α production in human plasmacytoid dendritic cells in a Toll-like receptor 9 dependent manner. *Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie (DGTI) 2013, Münster*

12 Erklärung zur Dissertation

"Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der "Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter Praxis" wissenschaftlicher niedergelegt sind. eingehalten ethische, sowie datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden."

Dresden, 05.11.2018

Ort, Datum

Unterschrift

13 Danksagung

Hiermit bedanke ich mich recht herzlich bei Prof. Holger Hackstein für die Vergabe dieses spannenden und lehrreichen Themas und seine stetige Bereitschaft mit Rat und Tat zur Seite zu stehen. Weiterhin gilt mein Dank Prof. Gregor Bein für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut durchführen zu können.

Besonders bedanken möchte ich mich darüber hinaus bei allen medizinisch-technischen Assistenten des Labors. Hierbei allen voran bei Gabriela Michel für ihre großartige und allzeit offene, geduldige, herzliche sowie kompetente Art. Sie hat mit ihrer Hilfe wesentlich zum Gelingen dieser Studie beigetragen. Mein Dank gilt auch Dr. Nelli Baal für ihren zielsicheren fachlichen Rat.

Ebenfalls bedanke ich mich bei PD Dr. Cornelia Brendel und ihrer Arbeitsgruppe für die unkomplizierte und enge Zusammenarbeit. Besonderer Dank gilt Dr. Philipp Nold für sein großes Engagement und die außerordentliche und freundschaftliche Unterstützung.

Zum Schluss bedanke ich mich bei meinem Vater für seine immerwährende Geduld und Unterstützung. Für ihr schonungsloses und zielführendes Auge in der Lektüre bedanke ich mich bei meiner Schwester Anita. Bei Juliane Traser bedanke ich mich für ihre motivierende und positive Art. Zum Schluss gilt mein Dank dem Rest meiner Familie und meiner Freunde für ihren Rückhalt. Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.

The curriculum vitae was removed from the electronic version of the paper.