

**Experimentelle Modulation der Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen in
Anwesenheit von mesenchymalen Stromazellen und professionellen
antigenpräsentierenden Zellen**

Inauguraldissertation

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

vorgelegt von Schildberg, Tom
aus Rostock

Gießen 2018

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

1. Gutachter: Prof. Dr. Holger Hackstein
2. Gutachter: Prof. Dr. Michael Kracht

Tag der Disputation: 18.03.2019

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Mesenchymale Stromazellen	2
1.2	Humane dendritische Zellen des peripheren Blutes.....	3
1.2.1	Myeloide dendritische Zellen.....	5
1.2.2	Plasmacytoide dendritische Zellen.....	8
1.3	T-Lymphozyten.....	10
1.4	Die immunmodulatorische Wirkung von MSC	13
1.4.1	Klinische Relevanz	17
1.5	Ziel der Arbeit.....	20
2	Material und Methoden.....	21
2.1	Material	21
2.1.1	Humane Leukozyten	21
2.1.2	Labormaterialien	21
2.1.3	Chemikalien	22
2.1.4	Antikörper	23
2.1.5	Stimulationsreagenzien	24
2.1.6	Kits	24
2.1.7	Zellkulturmedien und Pufferlösungen	24
2.1.8	Geräte und Software.....	25
2.2	Methoden	27
2.2.1	Kultivierung von MSC.....	27
2.2.2	Kryokonservierung und Auftauen von MSC und pDC.....	28
2.2.3	Isolation von PBMC.....	29
2.2.4	Negative Selektion von pDC.....	30
2.2.5	10-tägige PBMC-MSc Co-Kultur	31
2.2.6	10-tägige T-Zell-pDC-MSc Co-Kultur	34
2.2.7	Färbung von Zellen für die durchflusszytometrische Analyse	37
2.2.8	Durchflusszytometrische Sortierung und Messung	38
2.2.9	Statistik.....	40
3	Ergebnisse.....	41
3.1	Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Anwesenheit von MSC, pDC und CpG-ODN M362	41
3.2	Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Anwesenheit von MSC, PBMC und CpG-ODN M362	42

3.3	Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Anwesenheit von MSC, PBMC und LPS bzw. CpG-ODN 2216	44
3.4	Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung durch zweimalige MSC Gabe in Anwesenheit von PBMC und verschiedenen TLR-Agonisten	45
3.5	Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Abhängigkeit der MSC-Konzentration in Anwesenheit von PBMC und CpG-ODN M362.....	46
3.6	Spenderindividuelle Modulation von MSC auf die CMV-spezifische T-Zellaktivierung in Anwesenheit von PBMC und CpG-ODN M362	47
3.7	Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung von MSC in Abwesenheit von DC bzw. CD14/19 pos. Zellen	49
3.8	Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung von MSC in Abwesenheit von einzelnen DC-Subpopulationen.....	51
3.9	Einfluss von Poly I:C auf die Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung von MSC in Abwesenheit von einzelnen DC-Subpopulationen	52
4	Diskussion	53
4.1	In Anwesenheit von CpG-ODN M362 sind MSC in der Lage stimulierend auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen zu wirken	53
4.2	Eine zweimalige MSC-Gabe bewirkt keine wesentliche Veränderung der Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen.....	59
4.3	Die Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung ist abhängig von der MSC-Konzentration.....	61
4.4	MSC-PBMC Interaktion ist von Bedeutung für die MSC-modulierte Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen.....	62
4.5	Einfluss des Entfernens einzelner APC-Subpopulationen auf die MSC-modulierte Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen	63
4.6	Poly I:C vermindert den nennenswerten Einfluss von mDC2 auf die MSC-modulierte Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen.....	65
4.7	Ausblick	69
5	Zusammenfassung.....	i
6	Summary	iii
	Abkürzungsverzeichnis	iv
	Tabellenverzeichnis.....	vii
	Abbildungsverzeichnis.....	vii
	Literaturverzeichnis	ix
	Erklärung zur Dissertation	xxi
	Danksagung	xxii

1 Einleitung

Mesenchymale Stromazellen (MSC) sind durch ihre regenerativen Eigenschaften und die Fähigkeit der Immunregulation von medizinischem Interesse und befinden sich aus diesem Grund in einer Vielzahl von experimentellen und klinischen Studien. Sie sind in der Lage, Immunreaktionen verschiedenster Zellgruppen des angeborenen oder adaptiven Immunsystems zu regulieren und besitzen somit u.a. die Fähigkeit, die Aktivierung von T-Zellen zu beeinflussen. Dafür steht ihnen ein direkter Weg mittels Zell-Zell-Kontakten und Zytokinen oder ein indirekter Weg über beispielsweise antigenpräsentierende Zellen (*antigen-presenting cells*, APC) zur Verfügung. APC selbst sind wiederum verantwortlich für die Aktivierung von T-Zellen. Dies gelingt ihnen über die Präsentation von Antigenen, welche typischerweise in Form eines Peptids (z.B. eines Viruspeptids) vorliegen können und zu einer Aktivierung (antigen)spezifischer T-Zellen führt.

Klinisch stellen MSC wegen ihres oft beschriebenen immunregulatorischen Potenzials bereits eine Alternative in der Therapie der steroidrefraktären akuten Graft-versus-Host-Disease (aGVHD) dar (Wolff et al. 2013). Doch speziell in den letzten Jahren mehrten sich *in vivo* und *in vitro* Studien, die inkonsistente Einflüsse der MSC auf das Immunsystem demonstrierten (Galipeau 2013; Chan et al. 2006; Waterman et al. 2010). Als bedeutende Elemente auf die Art des Einflusses konnten neben der Stimulation über Toll-Like-Rezeptoren (TLR) auch das nach Stimulation der anwesenden Zellen veränderte Zytokin- und Expressionsprofil dargestellt werden (Tomchuck et al. 2008; Liotta et al. 2008; Chan et al. 2006; Cuerquis et al. 2014; Aggarwal & Pittenger 2005).

Die Beantwortung der Frage, wie sich der Einfluss der MSC speziell auf die Aktivierung Cytomegalievirus-spezifischer T-Zellen in Anwesenheit von APC und TLR-Liganden verhält, stellt daher den Gegenstand dieser Arbeit dar.

1.1 Mesenchymale Stromazellen

Mesenchymale Stromazellen wurden als Erstes von Friedenstein et al. 1974 als adhärenente, fibroblastenähnliche Zellen aus dem Knochenmark beschrieben (Friedenstein et al. 1974).

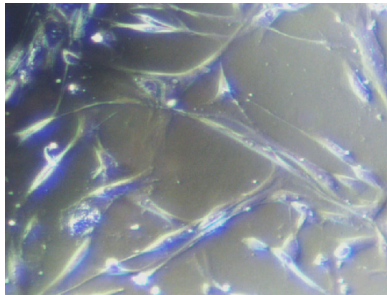


Abbildung 1 Mesenchymale Stromazellen

Es handelt sich um Zellen, die sich durch ein hohes Potenzial an Selbsterneuerung und Differenzierungsfähigkeit auszeichnen. Sie sind in der Lage, sich in Zellen des Mesoderms (Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten) zu differenzieren (Pittenger et al. 1999; Rastegar et al. 2010).

In der Literatur wird im Zusammenhang mit dem Akronym „MSC“ häufig der Begriff „Mesenchymale Stammzelle“ verwendet. Da zunächst von einer homogenen Population mit Stammzeleigenschaften ausgegangen wurde, beschrieb Caplan besagte Zellen als mesenchymale Stammzellen (Caplan 1991). Diese können sich beispielsweise in Zellen des Endoderms, z.B. Muskelzellen, und Zellen des Ektoderms, z.B. Neuroektoderm, differenzieren (Kopen et al. 1999; Petersen et al. 1999; Uccelli et al. 2008). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass nicht alle beschriebenen Zellen Stammzeleigenschaften besitzen und somit auch nicht als Stammzellen bezeichnet werden sollten (Dominici et al. 2005).

Im Folgenden soll das Akronym MSC stellvertretend für die Population von mesenchymalen Stromazellen stehen.

Gewonnen werden MSC aus einer Vielzahl von Geweben, u.a. aus Knochenmark, Fettgewebe, peripherem Blut und neonatalem Gewebe (Nabelschnur, Nabelschnurblut und Amnionflüssigkeit), wobei das Knochenmark weiterhin die verlässlichste Quelle darstellt (Friedenstein et al. 1974; Rodriguez et al. 2005; Simon et al. 1997; Hass et al. 2011; Nold et al. 2013).

Um eine einheitliche Charakterisierung zu gewährleisten, erstellte die International Society for Cellular Therapy eine Liste mit Minimalkriterien für die Definition von mesenchymalen Stromazellen (Dominici et al. 2006):

- MSC müssen plastikadhärent sein und fibroblastenähnliche Struktur in standardisierten Kulturbedingungen aufweisen
- MSC müssen die Marker Cluster of Differentiation (CD) 73, CD90 und CD105 exprimieren, dürfen jedoch folgende Marker nicht exprimieren: CD45, CD34, CD14, CD11b, CD9, CD9a und HLA-DR (Humanes Leukozytenantigen DR)
- MSC müssen die Fähigkeit haben, sich zu Adipozyten, Chondrozyten und Osteoblasten zu differenzieren

1.2 Humane dendritische Zellen des peripheren Blutes

Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DC) stellen eine heterogene Subpopulation von antigen-präsentierenden Zellen dar, der eine wichtige Rolle in der angeborenen und erworbenen Immunabwehr zukommt (Merad et al. 2013). Entwickelt im Knochenmark, können sie anschließend an diversen Orten lokalisiert werden und nehmen bei gesunden Menschen 0,5 - 1 % der zirkulierenden mononukleären Zellen des peripheren Blutes (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) im Blut ein (Fogg et al. 2006; Van Voorhis et al. 1982). Sie sind im peripheren Blut, in der Haut und anderen nicht-lymphatischen Organen, wie beispielsweise der Lunge, anzutreffen (Ziegler-Heitbrock et al. 2010; Haniffa et al. 2012). Ebenfalls in großer Zahl können sie in Milz, Lymphknoten und weiteren lymphatischen Organen auffindig gemacht werden (Liu et al. 2007).

Für das Anliegen der vorliegenden Arbeit, soll sich im Folgenden auf die humanen DC im peripheren Blut beschränkt werden.

DC wurden erstmalig von Steinman und Cohn im Jahre 1973 als neuer, sternförmiger Zelltyp in Mäusen beschrieben (Steinman 1973). Diese als klassische DC (*classical DC*, cDC) bezeichnete Population von Zellen zeichnete sich durch die Fähigkeit aus, naive T-Zellen zu aktivieren und bildet das Äquivalent zu den humanen myeloiden dendritischen Zellen (*myeloid DC*, mDC) (Steinman 1983; Crozat et al. 2010). Innerhalb der mDC wird mit Hilfe von Oberflächenmarkern zwischen mDC1 und mDC2 unterschieden. mDC1 exprimieren CD1c wohingegen mDC2 CD141 präsentieren (Dzionek et al. 2000).

Eine weitere Zellgruppe, später den dendritischen Zellen zugeordnet, wurde bereits im Jahre 1958 entdeckt (Remmele & Lennert 1958). Die als plasmazytoide dendritische Zellen

(*plasmacytoid DC*, pDC) benannte Population hebt sich durch die Sekretion hoher Mengen Interferon- α (IFN- α) hervor, die sie als Reaktion auf Viruskontakt ausschüttet (Cella et al. 1999). Durch ihre im Vergleich zu den mDC unterschiedlichen Oberflächenmarker und Eigenschaften, stellen sie eine separate Untergruppe der DC dar (Chehimi et al. 1989).

Diese drei Zellpopulationen, bestehend aus mDC1, mDC2 und pDC, bilden die gängigste Einteilung der DC im humanen peripheren Blut. Definiert sind sie durch den Mangel an den *lineage* (Lin) Markern CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56 sowie eine hohe Expression des *major histocompatibility complex class II* (MHC-Klasse II) (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Zudem besitzen sie für die optimale Präsentation von Antigenen die Kostimulator-moleküle CD40, CD80, CD83 und CD86, welche bei Aktivierung hochreguliert werden (Jongbloed et al. 2010).

Die Entwicklung der Zellgruppen startet zunächst gemeinsam. Aus der sich im Knochenmark befindlichen Vorläuferzelle MDP (*macrophage/DC progenitor cell*) können sowohl DC als auch Monozyten und Makrophagen entstehen (Auffray et al. 2009). Eine Restriktion auf die DC-Linie zeigt sich in der anschließenden Population der CDP (*common-DC progenitor cell*), die durch das Fehlen der *lineage* Marker sowie durch die Expression von CD135, CD115 und CD117 charakterisiert ist (Onai et al. 2007). Welche der drei Zelllinien im Laufe der Entwicklung entsteht, ist abhängig von Veränderungen des Umgebungsgewebes und der Expression von Transkriptionsfaktoren (Ghosh et al. 2010; Schlitzer et al. 2012).

Aktivierung der DC über Toll-Like Rezeptoren

Damit Zellen des Immunsystems Antigene wahrnehmen können, verfügen sie über eine individuelle Zusammenstellung von *pattern recognition receptors* (PRR), die eine Bindung mit einem *pathogen-associated molecular pattern* (PAMP), z.B. Nukleinsäuren oder Bakterienbestandteile, eingehen und eine Signalkaskade folgen lassen (Poltorak et al. 1998; Diebold et al. 2004). Die wichtigsten Vertreter der PRR stellen die Toll-like Rezeptoren (TLR) dar, welche beim Menschen in 10 verschiedene Gruppen unterteilt werden. Zu finden sind sie entweder auf der Zellmembran oder intrazellulär an Endosomen bzw. Endolysosomen (TLR 3, 7, 8, 9) gebunden und ermöglichen es, bakterielle oder virale Antigene wahrzunehmen (Matsumoto et al. 2003; Diebold et al. 2004; Poltorak et al. 1998).

Synthetisch hergestellte Liganden sind ebenfalls in der Lage an TLR zu binden und über diese die Zelle zu aktivieren. Beispiele dafür stellen Imiquimod und Resiquimod (R848) für TLR 7

und 8, polyinosinic-polycytidylic acid (Poly I:C) für TLR 3 und CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG-ODN) für TLR 9 dar (Lund et al. 2004; Vollmer et al. 2004; Mittag et al. 2011; Jurk et al. 2002). Das bakterielle Molekül Lipopolysaccharid (LPS) wird über TLR 4 wahrgenommen (Poltorak et al. 1998).

CpG-ODN beschreiben synthetisch hergestellte Einzelstrang-DNA mit reichlich enthaltenen CpG-Motiven und werden in die Klassen A, B und C unterteilt, die sich sowohl in Aufbau als auch Wirkung deutlich unterscheiden (Vollmer et al. 2004). Ein Vertreter der CpG-ODN-Klasse C ist CpG-ODN M362, während CpG-ODN 2216 der Klasse A zugeordnet wird.

1.2.1 Myeloide dendritische Zellen

Innerhalb der Population der humanen myeloiden dendritischen Zellen (mDC) werden zwei Subpopulationen unterschieden, die man anhand der Oberflächenmarker CD1c⁺ (mDC1) bzw. 141⁺ (mDC2) differenziert. Wie alle DC im menschlichen Körper sind auch die mDC über einen Mangel der Lin Marker und eine Expression von MHC-Klasse-II definiert (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Die Abgrenzung zur Gruppe der pDC gelingt über den Marker CD11c, der im Gegensatz zu den pDC auf der Oberfläche der mDC nachzuweisen ist (Dzionek et al. 2000).

CD1c⁺ myeloide dendritische Zellen (mDC1)

Humane mDC1 bilden die größte Fraktion der dendritischen Zellen beim Menschen und sind im peripheren Blut durch die Expression der Marker CD1c, CD11b, CD11c, MHC-Klasse-II, CD45RO und CD172 charakterisiert (Dzionek et al. 2000; Mittag et al. 2011). Das Oberflächenmolekül CD1c separiert sie zwar von den mDC2, ist jedoch nicht ausschließlich auf mDC1 zu finden, sodass eine sicherere Abgrenzung über weitere Faktoren, z.B. CD64 gegenüber Monozyten, sinnvoll erscheint (Langlet et al. 2012). Über CD1c besitzen mDC1 das Potenzial, Antigene von Mykobakterien zu präsentieren, zu denen auch das *Mycobacterium tuberculosis*, der Erreger der Tuberkulose, zählt (Van Rhijn et al. 2013).

Anders als bei den mDC2, ist kein spezieller Toll-like Rezeptor für die CD1c⁺ DC bekannt. Mit Ausnahme von TLR 7 und 9 exprimieren sie jeden TLR, sodass die Möglichkeit der Aktivierung durch eine Vielzahl von viralen, bakteriellen und synthetischen Antigenen besteht (Hemont et al. 2013).

mDC1 gelten als wichtige Produzenten von Interleukin-12 (IL-12), welches sie bei Stimulation von TLR 8 in moderaten Mengen ausschütten und in Synergie mit TLR 3 oder 4 gesteigert wird (Napolitani et al. 2005). Um eine optimale IL-12 Produktion zu erzielen, benötigen sie ein weiteres Signal zur Stimulation, das Natürliche Killerzellen (NK-Zellen) über IFN- γ oder T-Helferzellen über CD40L liefern (Nizzoli et al. 2013). Wie sich die Produktionsmenge an IL-12 im Vergleich zu den mDC2 verhält, lassen bisherige Studien nicht eindeutig erkennen (Jongbloed et al. 2010; Mittag et al. 2011). Weiterhin werden über TLR Bindung IL-1 β , TNF- α , IL-6 und IL-23 freigesetzt (Hemont et al. 2013; Proietto et al. 2012; Gerosa et al. 2008).

Die Rolle der CD1c+ DC in der Präsentation an CD4+ T-Zellen scheint jener der mDC2 zu ähneln. Auch sie verfügen über die Fähigkeit mit Hilfe von u.a. IL-12, eine T_H1-Antwort einzuleiten, sind jedoch mit der Produktion von IL-4 und IL-13 auch in der Lage, eine Immuntoleranz durch Steigerung des T_H2-Weges zu unterstützen (Nizzoli et al. 2013; Yu et al. 2014; Jongbloed et al. 2010). Zytokine, die auf eine T_H17-Antwort hinweisen, konnten ebenfalls durch Einfluss von mDC 1 und 2 aus intestinalen Geweben nachgewiesen werden (Watchmaker et al. 2013).

Sie sind zwar in der Lage, Antigene an CD8+ T-Zellen zu präsentieren und diese zu aktivieren, zeigen sich jedoch in dieser Fähigkeit der Population der CD141+ DC deutlich unterlegen (Jongbloed et al. 2010).

CD141+ myeloide dendritische Zellen (mDC2)

MDC2 bilden mit 0,03 % der PBMC die kleinste Gruppe der DC im menschlichen Körper und sind aufgrund ihres geringen Vorkommens nur schwerlich zu analysieren.

Generell anerkannt ist, dass die Differenzierung zwischen mDC2 und mDC1 hauptsächlich über CD141 (BDCA-3) erfolgt, obwohl gezeigt werden konnte, dass sie, in Abgrenzung zu den mDC1, ebenfalls *C-type lectin 9A* (CLEC9A), *nectin-like protein 2* und den Chemokin-Rezeptor XCR1 exprimieren (Dzionic et al. 2000; Huysamen et al. 2008; Galibert et al. 2005; Bachem et al. 2010).

Die Entstehung der mDC2 führt, wie bei allen DC, über die gemeinsame Vorläuferzelle CDP, von der sie sich durch die Expression von *fms-like tyrosine kinase 3 ligand* unterscheidet (Proietto et al. 2012). Gemeinsam mit dem *interferon regulatory factor 8* scheint es die Entwicklung der mDC2 zu fördern (Hambleton et al. 2011).

Trotz ihrer geringen Anzahl scheinen sie eine nicht unerhebliche Rolle in der Regulation von T-Zell-Antworten einzunehmen, welche vornehmlich durch die Produktion von IFN- β , IFN- λ , TNF- α , IL-6 und IL-8 bedingt ist (Jongbloed et al. 2010; Nizzoli et al. 2013). Zur Ausschüttung dieser Zytokine kommt es durch Bindung von dsDNA oder synthetisch hergestelltem Poly I:C an den Toll-Like Rezeptor 3, welcher in großem Maße von mDC2 exprimiert wird (Matsumoto et al. 2003; Mittag et al. 2011). Ebenfalls scheinen sie TLR 1, 6, 8 und 10 zu besitzen (Hemont et al. 2013).

Humane mDC2 zeichnen sich durch die Fähigkeit der Kreuzpräsentation aus, wodurch sie in der Lage sind, CD8⁺ T-Zellen, insbesondere zytotoxische T-Zellen, zu aktivieren (Jongbloed et al. 2010). Über die Bindung an virusinfizierte Zellen wirken XCR1 und CLEC9A unterstützend auf die CD8⁺ T-Zell-Antwort (Bachem et al. 2010; Zhang et al. 2011). Poly I:C ist durch Stimulation des TLR 3 ein weiterer fördernder Faktor bei der Erkennung von löslichem Protein (Jongbloed et al. 2010).

CD141⁺ DC sind *in vitro*, wie CD1c⁺ DC, ein potenter Stimulator von allo genen CD4⁺ T-Zellen (Jongbloed et al. 2010). Sie induzieren die Produktion von IL-2 und IFN- γ und scheinen im Zusammenspiel mit IL-12 eine T_H1-Antwort zu fördern, obwohl sie in Abhängigkeit der Stimulation auch in der Lage sind, die Aktivierung von T_H2 Zellen zu stimulieren (Hemont et al. 2013; Yu et al. 2014).

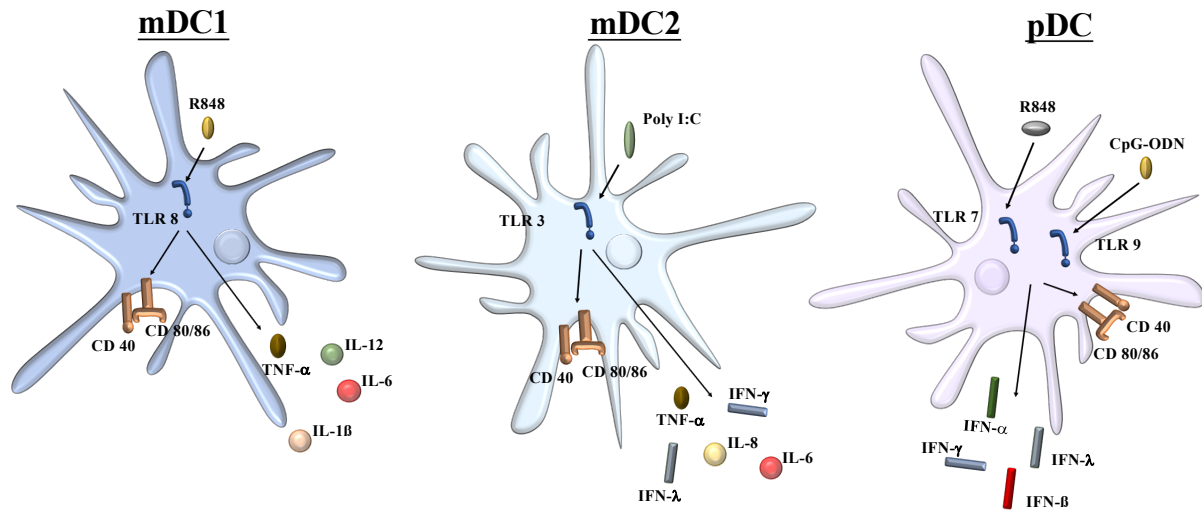


Abbildung 2 Aktivierung der DC-Subpopulationen über TLR

Durch passende Liganden (u.a. R848, Poly I:C oder CpG-ODN) erfolgt eine Aktivierung von mDC1, mDC2 und pDC über TLR mit anschließender Reifung, Sekretion von Zytokinen und Hochregulation der Kostimulormoleküle CD40, CD80 und CD86.

mDC1 sind in der Lage über die Bindung von R848 an TLR 8 die Expression der Kostimulormoleküle sowie die Ausschüttung von IL-12, IL-6, IL-1 β und TNF- α zu erhöhen. Über TLR 3 verfügen mDC2 über die Möglichkeit Poly I:C zu binden und nachfolgend vermehrt CD40, CD80 und CD86 zu exprimieren, sowie IL-6, IL-8, IFN- γ , IFN- λ und TNF- α zu sezernieren. pDC werden hauptsächlich über TLR 7 und TLR 9 nach Bindung von R848 bzw. CpG-ODN aktiviert, wodurch sie zu einer Hochregulation von Kostimulormolekülen sowie einer verstärkten Sekretion von IFN- α , - β , - γ und - λ befähigt sind.

1.2.2 Plasmacytoide dendritische Zellen

PDC zeichnen sich durch ihre vielfältigen Funktionen in angeborenem und adaptivem Immunsystem und die daraus resultierende Vielzahl an Oberflächenmolekülen, Zytokinen und Chemokinen aus. Wie alle humanen DC im peripheren Blut sind sie durch einen Mangel der *lineage* Marker sowie die Expression von MHC-Klasse-II definiert (Facchetti et al. 2003). Zusätzlich exprimieren sie u.a. CD68, *immunoglobulin-like transcript 7* und CD123 (Strobl et al. 1998; Facchetti et al. 2003). Letzterer dient als Rezeptor für IL-3 und bewirkt das Überleben der pDC *in vitro* (Cella et al. 1999). Die überschneidende Expression verschiedener Marker mit anderen Zelllinien erschwert die Diskrimination durch einen bestimmten Marker (Ziegler-Heitbrock et al. 2010). Am ehesten haben sich CD303 (BDCA-2) und CD304 (BDCA-4) als selektiv für humane Blut-pDC erwiesen und dienen somit der Abgrenzung zu anderen Zellgruppen (Dzionek et al. 2000). Innerhalb der pDC wiederum können 2 Subtypen durch die andersartige Expression von CD2 unterschieden werden, dessen Hochregulation

möglicherweise ein höheres Potenzial in der Aktivierung naiver CD4⁺ T-Zellen bzw. CD8⁺ T-Zellen zur Folge hat (Matsui et al. 2009).

In der Entstehung der pDC werden mehrere Stufen durchlaufen. Als entscheidend für das spätere Hervorgehen von pDC aus der gemeinsamen Vorläuferzelle CDP wird das erhöhte Vorhandensein von CD135 und dessen Liganden sowie der Transkriptionsfaktor E2-2 angesehen (Schmid et al. 2010; Ghosh et al. 2010). Während CD135 durch eine Aktivierung weiterer Transkriptionsfaktoren die Entwicklung der pDC stimuliert, bewirkt E2-2 eine Festlegung auf die pDC Linie (Nagasawa et al. 2008; Sathaliyawala et al. 2010).

Nach Beendigung der Entwicklung im Knochenmark zirkulieren pDC im Blut und migrieren über eine Vielzahl von Chemokinrezeptoren in sekundäre lymphatische Organe, wie z.B. Lymphknoten, oder andere, häufig entzündlich veränderte, periphere Gewebe (Sozzani et al. 2010).

Aufgrund der Expression der MHC-Klassen I und II sowie den Kostimulatorenmolekülen CD40, CD80 und CD86 sind pDC in der Lage, Antigene an CD4⁺ T-Zellen und über Kreuzpräsentation auch an CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren (Cella et al. 1999; Hoeffel et al. 2007). Dies kann, abhängig von den Begleitumständen, eine Aktivierung oder Suppression der T-Zelllinien und folglich des Immunsystems zur Folge haben (Schlecht et al. 2004; Gilliet & Liu 2002).

Damit pDC effektiv Antigene präsentieren können, bedarf es einer vorherigen Aktivierung mit anschließender Reifung der pDC (Schlecht et al. 2004). Der klassische und hauptsächliche Aktivierungsweg erfolgt über TLR wodurch eine intrazelluläre Signalkaskade startet und die Reifung der pDC mit Hochregulierung von MHC-Klasse-II und anderen Kostimulatorenmolekülen sowie die Produktion hoher Mengen Typ-I-Interferone (hauptsächlich IFN- α und IFN- β) sowie IFN- γ und IFN- λ induziert wird (Yin et al. 2012; Siegal et al. 1999; Takaoka et al. 2005). Dies bildet die Grundlage für die Bindung und Aktivierung pro-inflammatorischer Zellen des angeborenen, z.B. NK-Zellen, aber auch des adaptiven Immunsystems (Gerosa et al. 2005). Als Vertreter dieser Gruppe sind neben T-Zellen u.a. auch B-Zellen zu nennen (Hoeffel et al. 2007; Jego et al. 2003).

Obwohl pDC insbesondere durch die Produktion von IFN- α eine wichtige Rolle in der Aktivierung des Immunsystems einnehmen, zeichnen sie sich inaktiviert durch eine Induktion einer Immuntoleranz aus, indem sie Faktoren wie *indoleamine 2,3-dioxygenase* (IDO), OX40L, oder Granzym B1 produzieren und die Entwicklung von regulatorischen T-Zellen (T_{Reg}) fördern

(Pallotta et al. 2011; Diana et al. 2009; Jahrsdörfer et al. 2010; Hadeiba et al. 2008). Einen weiteren Regulationsfaktor besitzen sie durch CD303 (BDCA-2) und ILT7, welche die als Folge einer TLR-Aktivierung einsetzende Typ-I-Interferon Antwort abschwächen (Dzionek et al. 2001; Cao et al. 2006).

Durch die Expression großer Mengen von TLR 7 und 9 haben pDC eine besondere Stellung in der Erkennung und Abwehr verschiedener viraler Pathogene inne (Hornung et al. 2002).

TLR 7 dient zur Erkennung von viraler Einzelstrang-RNA von u.a. Influenza- oder RS-Viren (*respiratory syncytial virus*) (Diebold et al. 2004; Lund et al. 2004). Virale Einzelstrang-DNA u.a. vorhanden beim Herpes-Simplex-Virus 1 bzw. 2 (HSV 1 bzw. 2) wird über TLR 9 erkannt (Krug et al. 2004; Lund et al. 2003). Weiterhin wurde ein Vorkommen von TLR 2 und 12 auf Maus-pDC nachgewiesen, womit sie die Fähigkeit besitzen auch bakterielles Polysaccharid A zu erkennen (Dasgupta et al. 2014).

Die genannten Funktionen verdeutlichen die Stellung der pDC als Vermittler zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem in der Bekämpfung viraler Pathogene.

1.3 T-Lymphozyten

Die klassischen T-Lymphozyten oder T-Zellen gehören zu den weißen Blutzellen (Leukozyten) und stellen einen wichtigen Teil des adaptiven Immunsystems dar. Sie besitzen einen spezifischen T-Zell-Rezeptor ($\alpha\beta$ -T cell receptor, TCR) mit dem sie über MHC-Klasse I- bzw. MHC-Klasse II-Moleküle mit anderen Zellen per direktem Zell-Zell-Kontakt kommunizieren können. Nach Aktivierung einer naiven T-Zelle durch die Bindung ihres TCR an einen passenden peptidtragenden MHC-Komplex, übt die T-Zelle eine Reaktion aus, wodurch man sie im Folgenden in verschiedene Subgruppen einteilt. Gemeinsam mit dem Oberflächenmolekül CD3, welches sämtliche T-Zell-Populationen tragen, bildet der TCR den T-Zell-Rezeptor-Komplex.

Für eine optimale Aktivierung sind zudem Kostimulator-moleküle, wie CD28, notwendig. Durch die Bindung an einen passenden Liganden der APC wird eine Interaktion ermöglicht und somit die T-Zell-Antwort moduliert.

Im Folgenden sollen die einzelnen Subpopulationen der T-Zellen vorgestellt werden.

Zytotoxische T-Zellen (*cytotoxic t-lymphocyte, CTL*) besitzen das Oberflächenmolekül CD8 und sind damit CD8 positiv (CD8⁺). Über spezifische MHC-Klasse I Moleküle werden sie von professionellen APC aktiviert und erkennen erkrankte oder virusinfizierte Zellen, die sie in den Zelltod, die Apoptose, führen. Dies gelingt ihnen über Granzyme und Perforine (Tschopp & Jongeneel 1988). Des Weiteren produzieren aktivierte CTL große Mengen IFN- γ , welches sie sezernieren und somit einen Einfluss auf das angeborene Immunsystem und andere T-Zellen erzielen. So stärken sie u.a. die Differenzierung von CD4⁺ Zellen in Typ1-T-Helferzellen (T_H1-Zellen). (Das et al. 2001)

T-Helfer-Zellen sind in der Regel CD4⁺ und werden durch die Bindung an MHC-Klasse II tragende professionelle APC aktiviert, die das passende Peptid tragen. Anhand ihrer Wirkweise und Sekretion lässt sich die Mehrheit der T-Helfer Zellen in verschiedene Subpopulationen einteilen. Beispielsweise in T_H1-Lymphozyten, die typischerweise IFN- γ , IL-2 und TNF- α ausschütten, oder T_H2-Lymphozyten, dessen Zytokinspektrum sich durch das Sezernieren von IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-13 auszeichnet. (Mosmann et al. 1986; Murphy et al. 2002)

Durch die IFN- γ Produktion der T_H1-Lymphozyten wird neben der Aktivierung von B-Zellen auch eine Aktivierung und Differenzierung von Makrophagen induziert, die dadurch wiederum ihre eigenen antigenpräsentierenden Eigenschaften verstärken. Ebenso steigert IFN- γ gemeinsam mit IL-2 eine Differenzierung von CD8⁺ T-Zellen zu CTL. Die Unterstützung der CTL-Differenzierung wird zudem über Zell-Zell-Kontakte mit DC gefördert, indem T_H-Zellen eine Bindung mit CD40 der DC eingehen, welche daraufhin die CTL-Aktivierung steigern (Bennett et al. 1998). Eine T_H2-Antwort wird außerdem über IL-12 und IFN- γ eingedämmt. Durch diese Eigenschaften sind T_H1-Zellen vorwiegend pro-inflammatorisch.

Überwiegend gegensätzlich agieren T_H2-Lymphozyten im Immunsystem, die eher modulierend wirksam sind. Sie inhibieren Zytokine der T_H1-Lymphozyten und verhindern die Aktivierung von Makrophagen. Für letztere Wirkweise zeichnen sich IL-4 und IL-10 aus, die zudem die IFN- γ Produktion in T-Zellen und Makrophagen vermindert. (Abbas et al. 1996; Mosmann et al. 1986). Eine weitere Gruppe der T-Helferzellen stellt die Subpopulation der T_H17-Zellen dar, die durch das von Ihnen produzierte IL-17 charakterisiert sind und dadurch einen pro-inflammatorischen Charakter besitzt. Sie scheinen z.B. eine Rolle in der Autoimmunität zu spielen. Ihre Entwicklung bedarf des Vorhandenseins von IL-6 und TNF- β , welche sie auch selbst produzieren. Sollte insbesondere IL-6 fehlen, werden nicht T_H17-Zellen, sondern T_{Reg} gebildet.

Diese *forkhead box protein 3* positiven (FoxP3+) T-Zellen tragen ebenfalls CD4 und CD25 auf ihrer Oberfläche. Ihren Effekt der Immunsuppression üben sie u.a. durch eine Expression von CTLA-4 auf ihrer Oberfläche sowie einer Sekretion von IL-10 aus. (Korn et al. 2007)

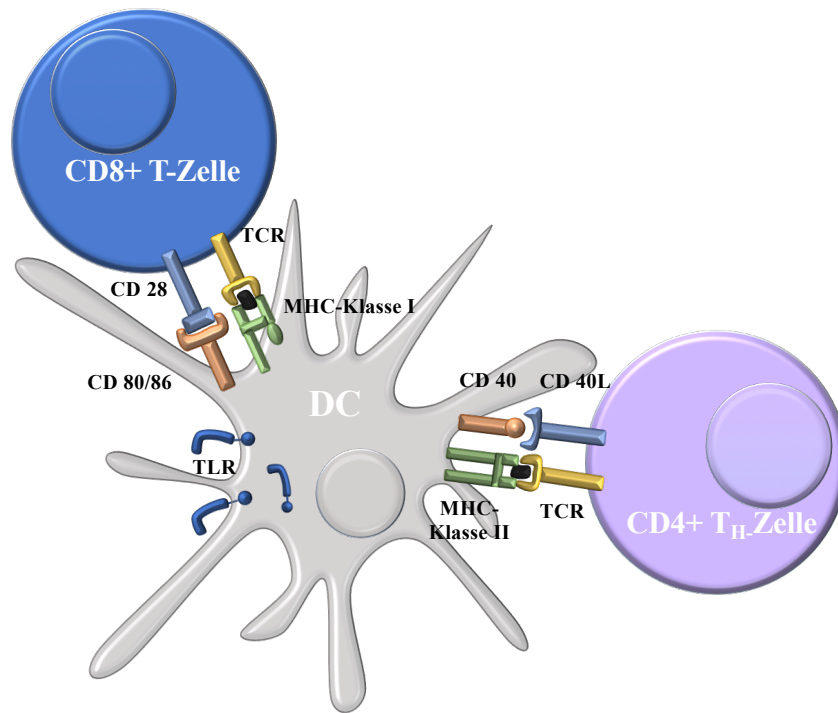


Abbildung 3 Aktivierung CD8+ T-Zellen mittels Interaktion mit DC und T_HZell Unterstützung

Über TLR wird eine Reifung und Aktivierung der DC induziert, die sie als APC zur Aktivierung von T-Zellen befähigt. Naive T-Zellen werden aktiviert, indem die dendritische Zelle über MHC-Moleküle (MHC-Klasse I bei CD8+ T-Zellen bzw. MHC-Klasse II bei CD4+ T-Zellen) eine Bindung mit dem TCR der T-Zelle eingeht. Zusätzlich ist eine Ligation zwischen CD28 der T-Zelle und CD80/86 der DC von Nöten. Die effektive Aktivierung von CD8+ T-Zellen zur CTL wird unterstützt von T_H-Zellen. Sie bekommen dasselbe Antigen über MHC-Klasse II präsentiert und fördern über die Bindung von CD40L an CD40 der DC die Aktivierung CD8+ T-Zellen. Modifiziert nach Thaiss 2011(Thaiss et al. 2011)

1.4 Die immunmodulatorische Wirkung von MSC

Blanc et al. (Blanc 2003) fassten 2003 als Erste Ergebnisse zusammen, die auf eine Beeinflussung von MSC auf das Immunsystem *in vitro* hindeuteten. In den folgenden Jahren konnte diese These von mehreren Arbeitsgruppen gefestigt und *in vivo* ebenfalls nachgewiesen werden (Meisel et al. 2004; Krampera et al. 2003; Chiesa et al. 2011; Nicola et al. 2002; Le Blanc et al. 2008).

Die immunmodulatorische Wirkung wird als überwiegend immunsuppressiv angegeben obwohl eine hohe Heterogenität unter den MSC besteht (Ren et al. 2008; Phinney 2007). Dafür werden diverse Gründe diskutiert u.a. Genetik und Alter des Spenders, sowie Art und Passagenummer der MSC (Siddappa et al. 2007; Choudhery et al. 2014; Choudhery et al. 2013; Choi et al. 2015). Kulturbedingungen, wie das Zellkulturmedium oder die Sauerstoffkonzentration scheinen ebenfalls eine wichtige Rolle zu spielen (Sotiropoulou et al. 2006; Nold et al. 2015).

MSC scheinen sowohl einen Einfluss auf das angeborene als auch das adaptive Immunsystem zu haben und üben diesen über einen direkten Kontakt mit anderen Zellen und lösliche Faktoren aus (Le Blanc & Davies 2015; Cao et al. 2015). Dabei scheint es nicht wesentlich zu sein, ob es sich um allogene oder autologe MSC handelt. Zudem scheinen MSC nicht dauerhaft immunmodulatorisch tätig zu sein, sondern vielmehr auf eine Aktivierung durch ihre Umgebung angewiesen zu sein (Hosseini et al. 2017; Renner et al. 2009). Als bedeutsam zeigen sich hierbei die Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-1 β , die sich auf die Sekretion von IDO, Prostaglandin E2 (PGE2), *transforming growth factor* β (TGF- β), und Stickstoffmonoxid auswirken (Cuerquis et al. 2014; Meisel et al. 2004; English et al. 2009; Aggarwal & Pittenger 2005; Ren et al. 2008). Eine Aktivierung über TLR, vorzugsweise über TLR 3, 4 und 9, ist ebenfalls möglich, allerdings wird kontrovers diskutiert, ob die Aktivierung pro- oder anti-inflammatorische Eigenschaften der MSC fördert (Waterman et al. 2010; Liotta et al. 2008).

Ihre immunmodulatorische Wirkung auf das angeborene Immunsystem üben sie nicht nur auf die Zellen des Immunsystems aus, sondern beeinflussen ebenfalls das Komplementsystem (Moll et al. 2011). MSC sind in der Lage das Komplementsystem zu aktivieren und gleichzeitig schützen sie sich vor der Lyse des Komplementsystems durch Hochregulierung von Proteinen, wie z.B. CD59 (Le Blanc & Davies 2015). Die Aktivierung des Komplementsystems scheint zudem die immunsuppressiven Eigenschaften der MSC zu verstärken (Moll et al. 2011).

Ebenfalls fördern MSC sowohl Differenzierung von pro-inflammatorischen M1-Makrophagen zu anti-inflammatorischen M2-Makrophagen als auch die direkte Entwicklung von M2-Makrophagen aus Monozyten über Zell-Zell-Kontakt und Zytokine (IDO und PGE₂) (François et al. 2012; Nemeth et al. 2009; S. Gao et al. 2014).

Durch die Inhibierung von Mastzellen über eine Einwirkung auf den Cyclooxygenase-2 Signalweg wird eine Immuntoleranz induziert (Brown et al. 2011). Einen gegensätzlichen Effekt hat hingegen der von MSC induzierte Schutz der neutrophilen Granulozyten vor der Apoptose (Raffaghello et al. 2007).

Natürliche Killerzellen nehmen eine wichtige Stellung in der Erkennung und Eliminierung virusinfizierter Zellen und Tumorzellen ein und werden in Abhängigkeit von deren Aktivierungszustand von MSC beeinflusst (Biron 1997).

Ruhende NK-Zellen werden von MSC an der Proliferation und der Produktion von IFN- γ vollständig gehindert. Die Hemmung von voraktivierten NK-Zellen ist nur noch eingeschränkt möglich während aktivierte NK-Zellen in der Lage sind, MSC aufgrund einer zu geringen MHC-Klasse I Expression an ihrer Oberfläche *in vitro* zu lysieren und damit zu töten. Ein partieller Schutz davor kann eine erhöhte Produktion von u.a. IDO und PGE₂ zusammen mit einer IFN- γ reichen Umgebung erzielen, da es zu einer Steigerung der MHC-I Moleküle führt. (Spaggiari et al. 2006)

Die als Vermittler zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem angesehenen DC zeigen nach Kultivierung mit MSC eine verminderte Expression der Oberflächenmoleküle MHC-Klasse II, CD40, CD80, sowie CD86 (English et al. 2008; Djouad et al. 2007; Nauta et al. 2006). Dies führt zu einer eingeschränkten Antigen-Präsentation und Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen (Beyth et al. 2005). Durch Verminderung der Sekretion von inflammatorischen Zytokinen, wie IL-12 und TNF- α , sowie Erhöhung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 erzielen MSC eine geringere Immunantwort (Jiang et al. 2005; Aggarwal & Pittenger 2005). Ebenso scheinen die MSC Einfluss auf die Rückkehr der DC in die Lymphknoten zu besitzen, denn diese wird durch Suppression von C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor 7 (CCR7) auf der DC-Oberfläche behindert (Chiesa et al. 2011). Zusammenfassend führen die Veränderungen der Oberfläche und des Sekretionsspektrums der DC zu einer verminderten Selbstaktivierung und damit einhergehenden verminderten Aktivierung des Immunsystems.

Einen ähnlich immunsuppressiven Einfluss scheinen MSC bei der Interaktion mit dem adaptiven Immunsystem auszuüben.

B-Zellen sind durch die Bildung von Antikörpern als humoraler Teil des adaptiven Immunsystems charakterisiert und werden Studien zufolge von MSC über lösliche Faktoren (CCL2 (C-C-Motiv-Chemokin-Ligand 2)) sowie Zell-Zell-Kontakte (*programmed cell death protein*, PD-1) an Proliferation und Differenzierung in antikörperproduzierende Plasmazellen gehemmt (Corcione et al. 2006; Augello et al. 2005; Rafei et al. 2008). Demgegenüber existieren jedoch auch konträre Daten (Rasmusson, Blanc, et al. 2007). Allgemein scheinen B-Zellen eine untergeordnete Rolle in der Immunmodulation durch MSC im Vergleich zu den T-Zellen einzunehmen und werden durch letztere ebenfalls bedeutend beeinflusst (Cao et al. 2015).

Die Immunantwort der T-Lymphozyten kann von MSC über die Einwirkung auf Überleben, Aktivierung, Differenzierung und Proliferation auf vielen Wegen beeinflusst werden. Eine überwiegende Zahl von Studien zeigt eine Induktion der Immuntoleranz mit Hemmung der Proliferation von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen *in vitro* (Rasmusson, Blanc, et al. 2007; Ren et al. 2008; Bartholomew et al. 2002). Dies wird über eine Vielzahl von Faktoren beeinflusst, u.a.IDO, IL-6, IL-10, PD-1, PD-L 1/2, TGF- β und PGE2 (Beyth et al. 2005; Djouad et al. 2007; Meisel et al. 2004; Augello et al. 2005; Aggarwal & Pittenger 2005). Nicht alle T-Zellen werden an der Proliferation gehemmt, sondern vielmehr nur diejenigen, die einer pro-inflammatorischen T-Zellantwort angehören. Dementsprechend hemmen MSC die Proliferation von T_H1- sowie T_H17-Zellen, welche Bestandteile einer T_H1-Antwort sind, über PD-1 und die Sekretion von PGE2 (Aggarwal & Pittenger 2005; Augello et al. 2005). Gleichzeitig wird durch Zytokine wie IL-4, IL-10 und TGF- β eine T_H2-Antwort durch Differenzierung zu T_{Reg} und T_H2-Zellen gestärkt (Aggarwal & Pittenger 2005).

Allerdings existieren auch Studien, die gegensätzliche Ergebnisse mit Stimulierung der T_H1-Zellen und Inhibition der T_H2-Lymphozyten demonstrieren (Carrión et al. 2011). Das deutet darauf hin, dass MSC nicht zu jeder Zeit mit einer Suppression antworten.

Daneben ist zu vermuten, dass nicht nur die Anwesenheit an sich, sondern auch die Menge der Zytokine entscheidend bei der Beeinflussung der MSC ist. So konnte gezeigt werden, dass bei hohen Mengen IFN- γ die Proliferation CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen gehemmt wird, niedrige Mengen hingegen zu einer Aktivierung der T-Zell-Populationen mit Immunstimulation durch MSC führen können (Ren et al. 2008; Chan et al. 2006; Cuerquis et al. 2014).

Eine weitere Funktion der MSC, die von der vorherrschenden IFN- γ Konzentration beeinflusst wird, ist die Regulation der Oberflächenmoleküle MHC-Klasse I aber auch MHC-Klasse II. MHC-Klasse I wird konstitutiv exprimiert und in IFN- γ Anwesenheit hochreguliert (Rasmusson, Uhlin, et al. 2007; Francois et al. 2009). MHC-Klasse II, eigentlich professionellen antigenpräsentierenden Zellen vorbehalten, ist unstimuliert wenig bis gar nicht auf MSC vorhanden, erfährt jedoch eine Erhöhung in Co-Kultur mit IFN- γ (Chan et al. 2006; Blanc et al. 2003). Durch diese Eigenschaften sind MSC in der Lage, als APC wirksam zu sein. Es zeigt, dass MSC, obwohl sie meist als immunsuppressiv beschrieben werden, in Abhängigkeit der Umgebungsfaktoren, speziell der Zytokine, ganz verschieden Einfluss auf die Immunantwort nehmen können.

1.4.1 Klinische Relevanz

Seit der ersten klinischen Studie im Jahr 1995 ist die klinische Relevanz der MSC in den letzten Jahren zu einem großen Thema der Forschung geworden und wird gegenwärtig in einer Vielzahl von Studien weiter eruiert (Lazarus et al. 1995). Das Hauptaugenmerk lag zunächst auf Ihrer Fähigkeit der Selbsterneuerung, wodurch sie u.a. für die Gebiete der Orthopädie und Unfallchirurgie in der Regeneration von Knochen- oder Knorpelmaterial interessant wurden (Quarto et al. 2001; Wakitani et al. 2007). Erst später wurden ihre Eigenschaften in der Modulation des Immunsystems erkannt, welche nun einen Großteil klinischer Studien bilden. Ein wichtiges Feld der Forschung besteht in der Behandlung der *graft-versus-host-disease* (GVHD). Zu dieser Erkrankung kann es durch fehlende Übereinstimmung der humanen Leukozytenantigene (HLA) von Spender und Empfänger bei allogenen Stammzelltransplantationen kommen (Petersdorf et al. 2001). Dies führt zu einer Aktivierung der Spender T-Zellen und einer Reaktion gegen das Empfängergewebe. Kommt es innerhalb der ersten 100 Tage zu Hautausschlägen, gastrointestinalen Symptomen, wie z.B. Erbrechen und Diarrhöe, oder einer hepatischen Manifestation, spricht man von einer akuten GVHD

(aGVHD). Bei Symptomen der Lunge, Haut und des Gastrointestinaltrakts nach 2-18 Monaten geht man in der Regel von einer chronischen GVHD (cGVHD) aus. (Herold et al. 2016)

Die Therapie richtet sich nach dem Schweregrad der Erkrankung. Im Wesentlichen stehen jedoch Kortikosteroide und Immunsuppressiva zur Verfügung, die topisch oder systemisch appliziert werden können (Wolff et al. 2013).

Durch ihre überwiegend immunsuppressive Wirkung stehen MSC im Mittelpunkt mehrerer Studien, welche ein positives Ansprechen auf die MSC-Therapie insbesondere bei fortgeschrittener, therapierefraktärer aGVHD zeigten (Kurtzberg et al. 2014; Le Blanc et al. 2008). Derzeit stellen MSC der Leitlinie entsprechend eine Alternative in der Therapie der steroidrefraktären aGVHD dar (Wolff et al. 2013).

Klinische Studien in der Neurologie befassen sich nach vielversprechenden Tierversuchen insbesondere mit dem Einsatz bei Multipler Sklerose (Zappia et al. 2008). Es wird sich eine Inhibition der Entzündungsreaktion erhofft, die für die Demyelinisierung der Nerven im ZNS verantwortlich ist und in der u.a. T_H17+ $CD4+$ T-Zellen eine zentrale Rolle zu spielen scheinen (Christensen et al. 2013).

MSC werden momentan zumeist intravenös appliziert und durchlaufen einen pulmonalen First-Pass Effekt, der ein Hindernis für Stammzellen darstellt, sofern nicht die Lunge selbst der Bestimmungsort ist (Fischer et al. 2009). Dieser Sachverhalt gepaart mit der Fähigkeit Inflammationen, welche die Grundlage einer Vielzahl von pulmonalen Erkrankungen bilden, zu reduzieren, macht sie zum Gegenstand verschiedener pulmologischer Studien. In Tierversuchsmodellen konnte u.a. sowohl bei der *chronic obstructive pulmonary disease* (COPD) durch Herunterregulierung pro-inflammatorischer Zytokine, als auch beim Asthma als Folge einer Inhibierung der T_H2 -Antwort ein Benefit gezeigt werden (Guan et al. 2013; Ouyang et al. 2011). Erste klinische Studien konnten bei höchstens minimaler Verbesserung durch Behandlung mit MSC die erfolgversprechenden Ergebnisse aus den Tierversuchsmodellen bisher nicht reproduzieren (Wang et al. 2016).

In der experimentellen Therapie des Diabetes Mellitus Typ 1, bei der durch autoimmunologische Vorgänge die insulinproduzierenden Beta-Zellen der Bauchspeicheldrüse zerstört werden, konnte durch Gabe von MSC in Mausmodellen eine Erniedrigung des Blutzuckers sowie eine Regeneration der Beta-Zellen in Anzahl und Funktion gezeigt werden (X. Gao et al. 2014; Bassi et al. 2012).

Weitere Studien mit MSC beziehen sich auf die Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen, z.B. Morbus Crohn, und der Behandlung von Gelenkerkrankungen (Molendijk et al. 2015). Während Ergebnisse in der Therapie der Arthrose ermutigend sind, stellen sich diese für die rheumatoide Arthritis jedoch widersprüchlich dar (Vega et al. 2015; Bouffi et al. 2009).

Trotz vieler vielversprechender Ergebnisse mangelt es den Studien aufgrund verschiedener Bedingungen an Vergleichbarkeit. Dies könnte ein Grund für nicht konsistente Ergebnisse sein. Verschiedene Ursprungsorte der MSC sowie deren Kultivierungsart und -dauer könnten dahingehend ein wichtiger Faktor sein, sodass eine standardisierte Herstellung ein wichtiger Schritt sein könnte (Molendijk et al. 2015; Nold et al. 2013).

Auch in Fragen der Sicherheit besteht weiterer Forschungsbedarf, da insbesondere durch die Immunsuppression durch die MSC eine theoretische Anfälligkeit von onkologischen Erkrankungen und Infektionen besteht (Djouad et al. 2003). In beiden Fällen konnte jedoch bislang kein erhöhtes Risiko des Neuaufretens nachgewiesen werden (Lalu et al. 2012).

1.5 Ziel der Arbeit

Inhomogene Beobachtungen bei der Untersuchung des MSC-Einflusses auf immunregulatorische Vorgänge mehren sich in den letzten Jahren. Gründe dafür werden kontrovers diskutiert und beinhalten das umgebende Zytokinmilieu, Kulturbedingungen und die Aktivierung anwesender Zellen (Liotta et al. 2008; Waterman et al. 2010; Rasmusson, Uhlin, et al. 2007; Morandi et al. 2009; Chan et al. 2006). Um jedoch einen sicheren klinischen Einsatz von MSC gewährleisten zu können, werden mehr Informationen darüber benötigt, welchen Effekt sie unter bestimmten Bedingungen auf definierte Zellpopulationen haben und wodurch dieser beeinflusst wird.

Ziel dieser Arbeit ist es, durch *in vitro* Co-Kulturen mit MSC, APC und T-Zellen die Modulation der antigenspezifischen Aktivierung von T-Lymphozyten durch MSC experimentell zu untersuchen.

Folgende Fragestellungen sollen untersucht werden:

- a) Ist es möglich Bedingungen zu schaffen, unter denen MSC stimulierend auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen wirken?
- b) Welche weiteren Zellpopulationen sind notwendig, um eine Beeinflussung von MSC auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen zu ermöglichen?
- c) Wie wirkt sich die Hinzugabe verschiedener TLR-Liganden auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen in Anwesenheit von MSC aus?
- d) Ist die Höhe der MSC-Konzentration während der Co-Kultur oder deren additive Gabe zu späteren Zeitpunkten für die Art und Stärke der Modulation von Bedeutung?
- e) Wirken bestimmte MSC-Linien per se aktivierend bzw. inhibierend oder variiert die Art ihres Einflusses abhängig von dem Zusammenwirken mit allogenen Blutzellspendern?
- f) Gibt es Zellpopulationen, die den MSC-Einfluss wesentlich verstärken oder antagonisieren, sodass deren Abwesenheit zu einer deutlichen Veränderung der Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen führt?

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Humane Leukozyten

Für die Gewinnung von PBMC wurde Restblut von tagesfrischen buffy coats von Vollblutspendern der Transfusionsmedizin und Hämotherapie UKGM Gießen verwendet, gemäß Ethikvotum Nr. 05/00.

2.1.2 Labormaterialien

Tabelle 1 Labormaterialien

Name	Hersteller
Zellkulturflaschen rot (75cm ² , 175cm ²)	Sarstedt, Nürnberg, D
96-Well Platte, flat bottom	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
Spritzen (1ml, 5ml, 10ml, 20ml)	B. Braun, Melsungen, D
Falcon Röhrchen (15ml, 50ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A
Cell Strainer (40µm, 70µm)	BD Biosciences, Heidelberg, D
Filter 0,8µm Minisart	Sartorius, Göttingen, D
Pipettenspitzen (1000µl, 200µl)	Sarstedt, Nürnberg, D
Pipettenspitzen (100µl, 10µl)	Sarstedt, Nürnberg, D
FACS Röhrchen	Sarstedt, Nürnberg, D
Eppendorf Tubes	Sarstedt, Nürnberg, D
Kryo-Röhrchen CyroPure (2ml, 5ml)	Sarstedt, Nürnberg, D
EasySep™ Magnet “The Big Easy”	Stemcell Technologies, Grenoble, F
Mr. Frosty™ Gefrierbehälter	Nalgene
Transferpipetten 3,5ml	Sarstedt, Nürnberg, D
Stabpipetten (2ml, 5ml, 10ml, 25ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, A

2.1.3 Chemikalien

Tabelle 2 Chemikalien

Name	Hersteller
Aqua dest.	B. Braun, Melsungen, D
Biofreeze Einfriermedium	Biochrom AG, Berlin, D
DMEM, low Glucose (1 g/L) with L-Glutamine	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Ficoll Paque™	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
Ethyldiamintetraacetat (EDTA)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, D
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
SYTOX® Blue Dead Cell Stain	Life Technologies, Carlsbad, US
UltraComp eBeads	eBioscience, San Diego, US
Trypan Blue solution 0.4	Sigma-Aldrich, Missouri, US
MEM Non-Essential Amino Acid Solution 100x	Sigma-Aldrich, Missouri, US
HEPES Buffer Solution	gibco Life Technologies, Carlsbad, US
Sodium Pyruvat	gibco Life Technologies, Carlsbad, US
RPMI 1640 Medium (with stable Glutamine)	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Brefeldin A	eBioscience, San Diego, US
Accutase	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
Fetal Bovine Serum „Gold“	PAA Laboratories GmbH, Pasching, A
SPHERO™ AccuCount Fluorescent Particles	Spherotech, Lake Forest, US

2.1.4 Antikörper

Tabelle 3 Antikörper

Name	Klon	Fluorochrom	Hersteller
CD3	HIT3a	Pacific Blue	BioLegend, San Diego, US
CD4	RPA-T4	APC	BioLegend, San Diego, US
CD4	RPA-T4	APC-Cy7	BioLegend, San Diego, US
CD8	HIT8a	PerCP/Cy5.5	BioLegend, San Diego, US
CD8	RPA-T8	APC	BioLegend, San Diego, US
CD8	RPA-T8	APC	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD14	M5E2	FITC	BD Biosciences, Heidelberg, D
CD14	HCD14	Brilliant Violet 421 TM	BioLegend, San Diego, US
CD19	HIB19	Alexa Fluor488	BioLegend, San Diego, US
CD19	HIB19	Brilliant Violet 421 TM	BioLegend, San Diego, US
CD1c	L161	PE	BioLegend, San Diego, US
CD141	M80	PE	BioLegend, San Diego, US
CD303	201A	PE	BioLegend, San Diego, US
IFN- γ	4s.B3	FITC	BioLegend, San Diego, US
Isotype Ctrl	MOPC-21	FITC	BioLegend, San Diego, US
Mouse IgG1, κ			

2.1.5 Stimulationsreagenzien

Tabelle 4 Stimulationsreagenzien

Name	Hersteller
CpG-ODN M362	InvivoGen, San Diego, US
CpG-ODN 2216	InvivoGen, San Diego, US
Resiquimod (R848)	InvivoGen, San Diego, US
Polyinosinic-polycytidylic acid(Poly I:C)	Sigma-Aldrich, Missouri, US
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma-Aldrich, Missouri, US
Proleukin IL-2	Novartis Pharma, Basel, CH
PepTivator CMV pp65 Peptid - human	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D

2.1.6 Kits

Tabelle 5 Kits

Name	Hersteller
BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Solution Kit	BD Biosciences, Heidelberg, D
EasySep™ Human plasmacytoid DC Enrichment Kit	Stemcell Technologies, Grenoble, F

2.1.7 Zellkulturmedien und Pufferlösungen

Tabelle 6 Zellkulturmedien und Pufferlösungen

Name	Zusammensetzung
Medium der MSC- Kultur	88,9997 % DMEM, low Glucose (1 g/L) with L-Glutamine 10 % Humanes Plättchenlysat (HPL) 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S) 0,0003% Heparin-Natrium-25.000

Medium der Co-Kultur	86 % RPMI 1640 Medium (with stable Glutamine) 10 % Inaktiviertes AB-Serum 1 % MEM Non-Essential Amino Acid Solution 100x (NEAA) 1 % Natrium Pyruvat 1 % HEPES Buffer Solution 1 % Penicillin/Streptomycin (P/S)
Einfriermedium der MSC	90 % Fetales Kälberserum (FKS) 10% Dimethylsulfoxid (DMSO)
Waschpuffer der Intrazellulärfärbung	90 % Aqua dest. 10 % BD Perm/Wash™ Buffer
PBS-EDTA	99,6 % PBS 0,4 % (2mM) EDTA
Sort-Puffer	97,6 % PBS 2 % inaktiviertes AB-Serum 0,4 % (2mM) EDTA

2.1.8 Geräte und Software

Tabelle 7 Geräte

Name	Hersteller
FACS Canto™ II	BD Biosciences, Heidelberg, D
FACS Aria™ III	BD Biosciences, Heidelberg, D
Automatischer Hämatologie-Analysator KX-21N	Sysmex Deutschland, Norderstedt, D
MACSmix™ Tube Rotator	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, D
Zentrifuge Rotina 380R	Hettich, Kirchlengern, D
VisiCam® TC 10	WVR International, Radnor, US
Labormikroskop DM IL LED	Leica, Wetzlar, D

Tabelle 8 Software

Name	Hersteller
BD FACS Diva	BD Biosciences, Heidelberg, D
Prism 6	GraphPad Software, La Jolla, US
Office 2015	Microsoft, Redmond, US
Mendeley	Mendeley Ltd., London, GB

2.2 Methoden

2.2.1 Kultivierung von MSC

Die Gewinnung sowie Isolation der mesenchymalen Stromazellen wurde am UKGM Marburg durchgeführt. Bei Hüftoperationen gesunder Spender wurde Knochenmark aus dem Beckenkamm entnommen und in mehreren Schritten aufgereinigt, gemäß Ethikvotum der Universität Marburg (#25/10).

Kultur der MSC

Die isolierten MSC wurden in Zellkulturflaschen mit einem speziellen Kulturmedium (s. Tabelle 6) im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ expandiert. Ein Wechsel des Mediums erfolgte in regelmäßigen Abständen alle 3-4 Tage bis eine Konfluenz der Zellen von 80 % erreicht wurde (Nold et al. 2013). Dies diente dem Entfernen von Stoffwechselabbauprodukten und nicht adhären Zellen sowie der Hinzugabe frischer Nährstoffe.

Ernten der MSC

Ein Ernten der MSC wurde durchgeführt, sobald mikroskopisch 80 % der Oberfläche der jeweiligen Kulturflasche mit Zellen bedeckt war oder die Zellen für eine Zellkultur benutzt werden sollten.

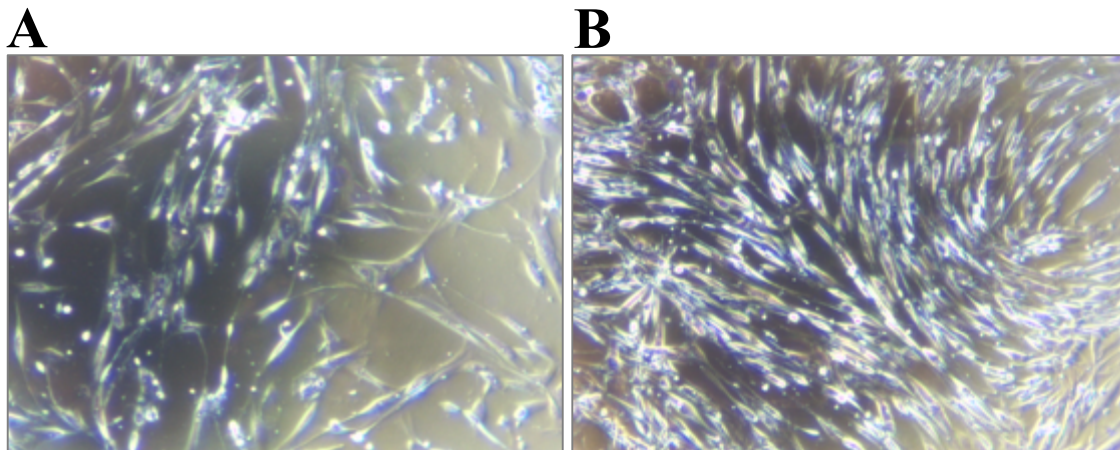


Abbildung 5 Kultur mesenchymaler Stromazellen

Dargestellt sind mesenchymale Stromazellen der Passagenummer 4 mit einer Konfluenz von 50-60 % (A) bzw. 80-90% (B)

- Sämtliches Medium aus der Zellkulturflasche entfernen
- Mehrmals mit 10 ml PBS spülen

- 3 ml bzw. 5 ml Accutase in die 75 cm² bzw. 175 cm² Zellkulturflaschen pipettieren (Durch den Kontakt lösen sich die Zellen von der Flaschenoberfläche)
- 10 min im Brutschrank inkubieren
- Mikroskopische Kontrolle des Ablösens aller Zellen
- Zellsuspension zu einem 15 ml Falcon Röhrchen gefüllt mit 10 ml PBS hinzufügen
- Suspension bei 350 g für 7 min waschen
- Mit 2 ml PBS homogenisieren und auf Eis lagern
- Zur Zellzahlbestimmung 10 µl Zellsuspension entnehmen, mit 10 µl Trypanblau mischen und zur Neubauer-Zählkammer hinzufügen (im Nachfolgenden stets nach dem gleichen Prinzip durchgeführt)
- Die Zellen haben nun die nächst höhere Passagenummer erreicht und stehen für die weitere Verwendung bereit:
 - Kryokonservierung: s. 2.2.2.
 - Verwendung in Co-Kulturen s. 2.2.5 oder 2.2.6
 - Aussäen: Hinzugabe der MSC mit einer Dichte von 2000 – 3000 cm² in neue Zellkulturflaschen befüllt mit 20 ml MSC-Kulturmedium (75 cm² Flaschenoberfläche) bzw. 35ml (175 cm² Flaschenoberfläche)

2.2.2 Kryokonservierung und Auftauen von MSC und pDC

Kryokonservierung

- MSC bzw. pDC liegen in Suspension vor (vorherige Schritte s. 2.2.1 oder 2.2.4)
- Zellsuspension mit 10 ml PBS auffüllen und bei 350 g für 8 min waschen
- Zusätzliches Abpipettieren sämtlicher Restflüssigkeit
- Hinzugabe von Einfriermedium FKS + DMSO (MSC) bzw. Biofreeze (pDC)
- Erstellung von Aliquots mit maximal 1 x 10⁶ Zellen in 1 ml Einfriermedium und Überführung in Kryokonservierungsröhrchen
- Platzierung der Röhrchen in Gefrierbehälter gefüllt mit Isopropanol (Sicherstellung von schonender Kühlgeschwindigkeit von < 1 °C / min)
- Gefrierbehälter in Gefrierschrank bei -80 °C für 24 Stunden platzieren
- Kryokonservierung in Gasphase des Stickstoffs bei -155 °C

Auftauen:

- Kryokonservierungsröhrchen in 37 °C Wasserbad halten
- Bei beginnender Verflüssigung der Suspension rasches Überführen in ein mit 10 ml Medium befülltes 15 ml Falcon-Röhrchen
- Für 8 min bei 350 g waschen, anschließend mit jeweiligem Kulturmedium resuspendieren und auf Eis lagern
- 10 µl Suspension entnehmen, mit 10 µl Trypanblau vereinigen und Zellzahlbestimmung mit Neubauer-Zählkammer
- Zellen stehen zur Verwendung bereit

2.2.3 Isolation von PBMC

Die Isolation der PBMC wurde mit der Standard-Dichtegradientenzentrifugation durchgeführt (Böyum 1968). Dazu wurden buffy coats gesunder Spender aus der Transfusionsmedizin und Hämotherapie UKGM Gießen, gemäß Ethikvotum der Universität Gießen # 05/00, verwendet.

- 3 Falcon-Röhrchen mit je 30 ml gekühlter phosphatgepufferter Salzlösung mit 2 mM EDTA (PBS-EDTA) befüllen
- Buffy coat (60 ml) zu gleichen Teilen hinzugeben und vorsichtig mischen
- Inhalt zu gleichen Teilen auf je 15 ml Ficoll-Paque in 4 weiteren Falcon-Röhrchen
- Waschen der Suspensionen bei 450 g für 30 min ohne Bremse
Durch die Zentrifugation ergibt sich aufgrund der verschiedenen Dichte-Werte folgende Schichtung (von unten nach oben): Erythrozyten – Granulozyten – Ficoll – PBMC - Plasma
- Mit Hilfe einer Transferpipette den Interphasering mit PBMC entnehmen und auf 2 neue Falcon-Röhrchen aufteilen
- Auffüllen der Röhrchen mit PBS-EDTA auf 50 ml und 5 min Waschen bei 1500 RPM
- Zwei weitere Waschschriffe (800 RPM 10 min) und Auffüllen auf 30 ml folgen
- Nach den Waschschriffen Pellet mit 4 ml Co-Kulturmedium homogenisieren
- Entnahme von 10 µl Suspension, Vermischung mit 90 µl PBS und Zellzahlbestimmung im Sysmex KX-21N
- Lagerung auf Eis bis zur Verwendung

2.2.4 Negative Selektion von pDC

Die Selektion der humanen pDC wurde auf der Basis des Informationsblattes des „Easy Sep™ human plasmacytoid DC Enrichment Kit“ der Firma Stemcell nach vorheriger Isolation der PBMC (s. 2.2.3) durchgeführt.

- Entnahme von 4×10^8 PBMC und Überführung in 14 ml Tube (sollte passend zur Öffnung des EasySep™ Magneten sein)
- Mit Sort-Puffer (s. Tabelle 6) auf eine Konzentration von 5×10^7 Zellen / ml bringen
- 30 μ l / ml Zellen Anti-Human CD32 Blocker hinzugeben (Verhinderung von Quervernetzungen)
- 50 μ l / ml Zellen EasySep™ Human Plasmacytoid DC Enrichment Cocktail hinzugeben
- Tube in Röhren-Rotator einsetzen und bei Raumtemperatur 30 min mischen
- EasySep™ DC Magnetic Particles 30 Sekunden mischen und mit einer Konzentration von 200 μ l / ml Zellen hinzufügen
- Tube in Röhren-Rotator einsetzen und bei Raumtemperatur 10 min mischen
- Mit Sortpuffer auf eine Gesamtmenge von 10 ml im Tube ergänzen und vorsichtig kurz mischen
- Tube in EasySep™ Magnet platzieren und 10 min erschütterungsfrei inkubieren
- Tube in EasySep™ Magnet belassen und Suspension in ein neues Röhren gießen.
So werden nur die pDC in das neue Röhren überführt, während die restlichen Zellen durch den Magnetismus an der Oberfläche des Tubes verweilen
- Neues Röhren in EasySep™ Magnet platzieren und 5 min erschütterungsfrei inkubieren
- Tube in EasySep™ Magnet belassen und Suspension in ein 15 ml Falcon-Röhren gießen
- Waschen bei 450 g für 8 min, Resuspension mit 1 ml Co-Kulturmedium und Lagerung auf Eis bis zur Verwendung
- Durchflusszytometrische Kontrolle der Reinheit über die Färbung mit CD303 (BDCA-2) und Sytox®. Die Reinheit befand sich stets bei > 90 %. (s. Abbildung)

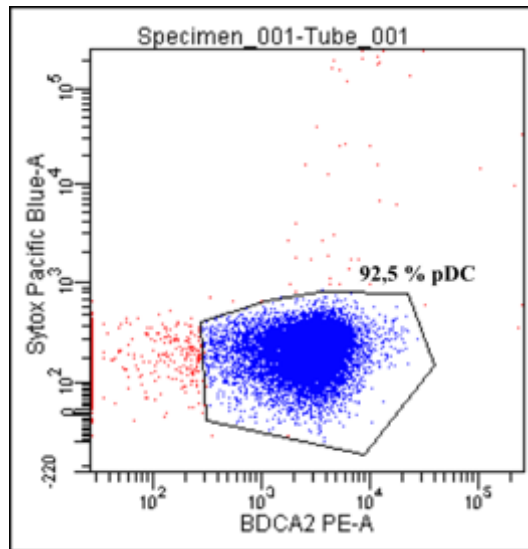


Abbildung 6 Durchflusszytometrische Reinheitskontrolle der negativ selektierten pDC im Dot-Plot.

2.2.5 10-tägige PBMC-MSC Co-Kultur

Tag 0

MSC:

Für die PBMC-MSC Co-Kultur über 10 Tage wurden am Morgen des Versuchstages die MSC geerntet. Es wurden ausschließlich MSC verwendet, die sich > 1 Woche in Kultur befanden und deren Passagenummer < 5 war. Zudem wurde eine Konfluenz von > 80 % vermieden.

- Ernten der MSC mit Accutase und anschließendem Waschvorgang (s. 2.2.1)
- Homogenisierung in 1 ml Co-Kulturmedium und Zellzahlbestimmung in Neubauer-Zählkammer durch Vereinigung von 10 µl Suspension mit 10 µl Trypanblau
- Suspension mit Co-Kulturmedium auf eine Konzentration von 3×10^3 Zellen / ml bringen → bei einer Gesamtendzellzahl von 3×10^5 Zellen / Well ergibt sich eine Kultur mit 1 % MSC
- 100 µl Aliquots in die jeweiligen Vertiefungen einer 96-Well Platte pipettieren und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubieren
- Inkubation von mindestens sechs Stunden, bevor weitere Zellgruppen hinzugefügt werden, um eine ausreichende Adhäsion der MSC zu gewährleisten

Wurde nicht mit einer MSC Konzentration von 1 % kultiviert, so wurde die MSC Zellzahl an die Gesamtendzellzahl von 3×10^5 Zellen / Well angepasst:

- 0,1 % MSC entspricht 3×10^2 MSC / Well
- 10 % MSC entspricht 3×10^4 MSC / Well

Wenn nicht anders angegeben, wurde stets eine MSC-Konzentration von 1 % benutzt.

PBMC-Isolation:

- PBMC Gewinnung durch Nutzung gesamter buffy coats CMV-positiver Spender, welche nicht älter als 40 Jahre waren
- Isolation der PBMC durch Standard-Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Paque und Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Sysmex KX-21N (s. 2.2.3)
- Lagerung auf Eis zwischen Phasen der Verwendung

d0 Messung:

Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Ausgangsmenge an CMV-spezifischen T-Zellen vorhanden ist, wurde eine Messung am Tag des Versuchsbeginns durchgeführt.

- Entnahme von zwei Aliquots mit je $1,5 \times 10^6$ PBMC aus der Suspension und Überführung in zwei Wells einer 96-Well Platte
- Hinzugabe von 3 μ l CMV-pp65 Peptid (1 μ g / ml) in ein Well
- Hinzugabe von 3 μ l Brefeldin (3 μ g / ml) in beide Vertiefungen
- Ergänzung von Co-Kulturmedium auf ein Endvolumen im Well von 150 μ l
- Inkubation für 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂
- Anschließende extra- und intrazelluläre Färbung (s. 2.2.7)
- Durchflusszytometrische Messung der IFN- γ produzierenden CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Zellen am BD FACS Canto™ II.

Optionale Zellsortierung der PBMC:

War ein Entfernen bestimmter Zellgruppen notwendig, so wurde eine Zellsortierung am BD FACS Aria™ III durchgeführt (s. 2.2.8 „Sortierung“).

Erstellung der Zellkultur:

Im Folgenden wurden die einzelnen Suspensionen und Stimulationsreagenzien der jeweiligen Gruppen der Zellkultur hergestellt und zu den 100 µl MSC-Suspension hinzugefügt. Die Vorverdünnung erfolgte mit Co-Kulturmedium.

- PBMC auf eine Konzentration von $7,5 \times 10^6$ Zellen / ml bringen und in 40 µl Aliquots (entspricht 3×10^5 Zellen) hinzugeben
- Proleukin IL-2 vorverdünnen und in 20 µl Aliquots hinzugeben (Endkonzentration im Well: 10 U / ml)
- CMV-pp65 Peptid vorverdünnen und in 20 µl Aliquot hinzufügen (Endkonzentration im Well: 1 µg / ml)
- Je 20 µl vorverdünnte Aliquots des jeweiligen Stimulationsreagenz hinzufügen (Endkonzentration im Well: 2 µg / ml CpG-ODN M362, 3 µg / ml CPG-ODN 2216, 1 µg / ml LPS, 50 µg / ml Poly I:C, 1 µg / ml R848)
- Abschließende Hinzugabe von Co-Kulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 200 µl / Well
- Inkubation der Kultur für 10 Tage bei 37° C und 5 % CO₂

Tag 5 und Tag 8:

An den Tagen 5 und 8 der Zellkultur wurde ein Wechsel des Kulturmediums durchgeführt, um Abbauprodukte des Stoffwechsels zu entfernen und frisches Medium und Zusätze hinzuzufügen.

- Kulturplatte bei 300 g 5 min zentrifugieren
- Unmittelbares vorsichtiges Entfernen von 100 µl Medium ohne Mitnahme von Zellen durch oberflächliches Pipettieren.
- 20 µl vorverdünntes Proleukin IL-2 (10 U / ml) hinzufügen
- 20 µl vorverdünntes Stimulanz hinzufügen (1 µg / ml CpG-ODN M362, 1,5 µg / ml CPG-ODN 2216, 0,5 µg / ml LPS, 25 µg / ml Poly I:C, 0,5 µg / ml R848)
- Abschließende Hinzugabe von Co-Kulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 200 µl / Well

Tag 10:

Restimulation:

- Ohne vorheriges Zentrifugieren Hinzugabe der Zusätze zu den im Well befindlichen 200 µl
- 20 µl vorverdünntes CMV-pp65 Peptid (1 µg / ml) hinzufügen
- 20 µl vorverdünntes Proleukin IL-2 (10 U / ml) hinzufügen
- 20 µl vorverdünntes Stimulanz hinzufügen (2 µg / ml CpG-ODN M362, 3 µg / ml CPG-ODN 2216, 1 µg / ml LPS, 50 µg / ml Poly I:C, 1 µg / ml R848)
- 3 µl Brefeldin (Endkonzentration im Well: 3 µg / ml) in sämtliche Wells pipettieren, um eine Akkumulation von IFN-γ im endoplasmatischen Retikulum zu induzieren
- Abschließende Hinzugabe von Co-Kulturmedium auf ein Gesamtendvolumen von 300 µl / Well
- Inkubation der Kultur für 6 Stunden bei 37° C und 5 % CO₂

Färbung und Messung:

Nach 6 Stunden Inkubation wurde eine extra- und intrazelluläre Färbung durchgeführt (s. 2.2.7). Dieser schloss sich die durchflusszytometrische Messung der IFN-γ positiven CD8⁺ sowie CD4⁺ Zellen am BD FACS Canto™ II an. Es wurden stets Isotyp-Klone mitgeführt, welche als Negativkontrolle dienen.

2.2.6 10-tägige T-Zell-pDC-MSC Co-Kultur

Tag 0

MSC:

Für die T-Zell-pDC-MSC Co-Kultur über 10 Tage wurden, wie auch bei der PBMC-MSC Co-Kultur, am Morgen des Versuchstages die MSC geerntet. Es wurden ausschließlich MSC verwendet, die sich > 1 Woche in Kultur befanden und in der Passage nicht höher als Passage 5 lagen. Zudem wurde eine Konfluenz von > 80 % vermieden.

- Ernten der MSC mit Accutase und anschließendem Waschvorgang (s. 2.2.1)
- Homogenisierung in 1 ml Co-Kulturmedium und Zellzahlbestimmung in Neubauer-Zählkammer durch Vereinigung von 10 µl Suspension mit 10 µl Trypanblau

- Suspension mit Co-Kulturmedium auf eine Konzentration von $2,2 \times 10^4$ Zellen / ml bringen → bei einer Gesamtzellzahl von $2,2 \times 10^5$ Zellen / Well ergibt sich eine Kultur mit 1 % MSC
- 100 µl Aliquots in die jeweiligen Vertiefungen einer 96-Well Platte pipettieren und bei 37 °C und 5 % CO₂ im Brutschrank inkubieren
- Inkubation von mindestens sechs Stunden, bevor weitere Zellgruppen hinzugefügt werden, um eine ausreichende Adhäsion der MSC zu gewährleisten

Wurde nicht mit einer MSC Konzentration von 1 % kultiviert, so wurde die MSC Zellzahl an die Gesamtzellzahl von $2,2 \times 10^5$ Zellen / Well angepasst:

- 0,1 % MSC entspricht $2,2 \times 10^2$ MSC / Well
- 10 % MSC entspricht $2,2 \times 10^4$ MSC / Well

Wenn nicht anders angegeben, wurde stets eine MSC-Konzentration von 1 % benutzt.

PBMC-Isolation:

- PBMC Gewinnung durch Nutzung gesamter buffy coats CMV-positiver Spender, welche nicht älter als 40 Jahre alt waren
- Isolation der PBMC durch Standard-Dichtegradientenzentrifugation mittels Ficoll-Paque und Bestimmung der Gesamtzellzahl mit Sysmex KX-21N (s. 2.2.3)
- Lagerung auf Eis zwischen Phasen der Verwendung

d0 Messung:

Um eine Aussage darüber treffen zu können, welche Ausgangsmenge an CMV-spezifischen T-Zellen vorhanden ist, wurde eine Messung am Tag des Versuchsbeginns durchgeführt.

- Entnahme von zwei Aliquots mit je $1,5 \times 10^6$ PBMC aus der Suspension und Überführung in zwei Wells einer 96-Well Platte
- Hinzugabe von 3 µl CMV-pp65 Peptid (1 µg / ml) in ein Well
- Hinzugabe von 3 µl Brefeldin (3 µg / ml) in beide Vertiefungen
- Ergänzung von Co-Kulturmedium auf ein Endvolumen im Well von 150 µl
- Inkubation für 6 h bei 37 °C und 5 % CO₂
- Anschließende extra- und intrazelluläre Färbung (s. 2.2.7)
- Durchflusszytometrische Messung der IFN-γ produzierenden CD8⁺ sowie CD4⁺ T-Zellen am BD FACS Canto™ II

T-Zell-Sortierung:

Die T-Zellen wurden durchflusszytometrisch mit dem BD FACSAria™ III Zellsortierer aus den PBMC gewonnen (s. 2.2.8).

- Färbung der T-Zellen mit CD 3, CD4 und CD8 Antikörpern
- Sortierung CD4+ und CD8+ T-Zellen im Verhältnis 50:50
- Nach Sortierung in Co-Kulturmedium aufnehmen
- Zellzahlbestimmung in Neubauer-Zählkammer durch Vereinigung von 10 µl Suspension mit 10 µl Trypanblau
- Suspension auf eine Konzentration von 4×10^6 T-Zellen / ml bringen
- Lagerung auf Eis bis zur Verwendung

pDC-Selektion:

Die pDC wurden durch negative Selektion mit dem Easy Sep™ human plasmacytoid DC Enrichment Kit gewonnen. (s. 2.2.4)

- Resuspension in 1 ml Co-Kulturmedium
- Aufteilung der Zellen, sodass für die Tage 0, 5 und 10 der Co-Kultur die gleiche Menge vorhanden ist
- pDC für Tag 0 eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ pDC / ml bringen
- Bis zur Verwendung auf Eis lagern
- Restliche Zellmenge für Tag 5 und 10 aufteilen und kryokonservieren (s. 2.2.2)

Erstellung der Zellkultur:

Im Folgenden wurden die einzelnen Suspensionen und Stimulationsreagenzien der jeweiligen Gruppen der Zellkultur hergestellt. Anschließend wurde die 96-Well-Platte aus dem Brutschrank entnommen und 50 µl aus jedem Well entfernt, sodass sich noch 50 µl in den Wells befanden. Nachfolgend wurden die hergestellten Zusätze hineinpipettiert. Die Vorverdünnung erfolgte mit Co-Kulturmedium

- T-Zellen auf eine Konzentration von 4×10^6 Zellen / ml bringen und in 50 µl Aliquots (entspricht 2×10^5 Zellen) hinzugeben
- pDC auf eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml bringen und in 40 µl Aliquots (entspricht 2×10^4 Zellen) hinzugeben
- Proleukin IL-2 vorverdünnen und in 20 µl Aliquots hinzugeben (Endkonzentration im Well: 10 U / ml)

- CMV-pp65 Peptid vorverdünnen und in 20 µl Aliquot hinzufügen (Endkonzentration im Well: 1 µg / ml)
- Je 20 µl vorverdünnte Aliquots des jeweiligen Stimulationsreagenz hinzufügen (Endkonzentration im Well: 2 µg / ml CpG-ODN M362, 3 µg / ml CPG-ODN 2216, 1 µg / ml LPS, 50 µg / ml Poly I:C, 1 µg / ml R848)
- Abschließende Hinzugabe von Co-Kulturmedium auf ein Gesamtvolumen von 200 µl / Well
- Inkubation der Kultur für 10 Tage bei 37° C und 5 % CO₂

Tag 5 und Tag 10

Die Tage 5 und 10 wurden wie im Kapitel 2.2.5 „PBMC-MSC Co-Kultur“ beschrieben durchgeführt mit der Ausnahme, dass ergänzend an beiden Tagen pDC hinzugefügt wurden. Auf einen Mediumwechsel an Tag 8 wurde verzichtet.

Die pDC wurden am Tag des Versuchsbeginns kryokonserviert und an Tag 5 bzw. 10 aufgetaut (s. 2.2.2).

- Resuspension mit Co-Kulturmedium und auf eine Konzentration von $0,5 \times 10^6$ Zellen / ml bringen
- In 40 µl Aliquots zur Kultur hinzufügen

2.2.7 Intrazelluläre Färbung von Zellen für die durchflusszytometrische Analyse

- Zellen aus der Wellplatte durch auf- und abpipettieren lösen und in FACS Rörchen überführen
- Jedes Well mit 300 µl PBS spülen und zum jeweiligen Rörchen hinzufügen
- 2 ml PBS hinzugeben und bei 500 g 5min zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Zellpellet lösen
- Aus jedem Tube 10 µl entnehmen und einem Rörchen zur Bestimmung des Isotyps hinzufügen. Es wurde ein Isotyp-Tube pro buffy coat bestimmt
- 10 µl inaktiviertes AB-Serum zum Blocken von Fc-Rezeptoren hinzugeben
- 10 min bei Raumtemperatur inkubieren
- Hinzugabe der Antikörper für die extrazelluläre Färbung

- 20 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- 2 ml PBS hinzugeben und bei 500 g 5 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Zellpellet lösen
- 400 µl Cytotfix/CytopermTM Fixation/Permeabilization solution hinzugeben
- 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- Bei 500 g 5 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Zellpellet lösen
- 2 ml Waschpuffer (s. Tabelle 6) hinzugeben
- 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- Bei 500 g 5 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Zellpellet lösen
- 10 µl inaktiviertes AB-Serum hinzugeben
- 10 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- Hinzugabe der Antikörper für die intrazelluläre Färbung
- 30 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren
- 2 ml Waschpuffer hinzugeben und bei 500 g 5 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Zellpellet lösen
- 2 ml Waschpuffer hinzugeben und bei 500 g 5 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen und Zellpellet lösen
- Messung per Durchflusszytometrie

2.2.8 Durchflusszytometrische Sortierung und Messung

Die Messung sowie das Sortieren der Zellen wurde mit einem Durchflusszytometer bzw. FACS durchgeführt. Der Name „FACS“ steht für „fluorescence-activated-cell-sorter“. Mit dieser Methode ist es möglich verschiedene Zellgruppen anhand ihrer Größe, Granularität sowie ihrer extra- und intrazellulären Eigenschaften zu identifizieren.

Bei der Durchflusszytometrie wird ein laminarer Probenstrom erzeugt, indem eine Zellsuspension durch eine Kapillare geleitet wird. Dabei trifft monochromatisches Licht (Licht einer bestimmten Wellenlänge) eines Lasers in der Messküvette auf den Zellstrom und wird abgelenkt. Die nach vorne abgelenkten Strahlen werden als Forwardscatter (FSC) bzw. Vorwärtsstreulicht detektiert und geben Informationen über die Größe der Zellen. Die

Strahlung, die um 90° abgelenkt wird, gibt Aufschluss über die Granularität und wird im Sidescatter (SSC) bzw. Seitwärtsstreulicht ermittelt.

Zusätzlich können Zellen durch eine Antigen-Antikörper-Bindung (intra- und extrazellulär) mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern identifiziert und quantifiziert werden. Bei Auftreffen des monochromatischen Lichts auf eine Zelle mit fluoreszenzgekoppeltem Antikörper wird der Fluoreszenzfarbstoff angeregt und emittiert Licht verschiedener Wellenlänge. Die Strahlen werden abhängig von ihren Wellenlängen an den jeweiligen Detektoren registriert. Je nach Fluochrom ist die Wellenlänge des emittierten Lichts unterschiedlich und ermöglicht eine Diskrimination verschiedener Zellgruppen.

Eine Erweiterung stellt der Zellsortierer dar. Er erkennt die Zellgruppen nicht nur durchflusszytometrisch, sondern ist zudem in der Lage, diese räumlich zu trennen.

Dazu werden die Zellen nach Erkennung der Fluoreszenz in der Kanüle in Schwingung versetzt, sodass der laminare Strom der Zellsuspension abreißt und Tröpfchen entstehen. Die gewünschten Zellen erhalten eine positive Ladung, werden durch ein elektromagnetisches Feld geleitet und in einem Probenröhrchen aufgefangen. Somit stehen die Zellen für eine weitere Nutzung zur Verfügung. Die nicht benötigten Zellen werden aufgrund Ihrer negativen Ladung in den Abfall geleitet. (Luttmann et al. 2006)

Sortierung

Das Sortieren einzelner Zellgruppen erfolgte nach der Isolation der PBMC (s. 2.2.3) mit dem Zellsorter BD FACS Aria™ III.

Vor der Sortierung

- Für die Sortierung benötigte Menge an Zellen in ein FACS-Tube überführen und mit PBS auf eine Gesamtmenge von 200 µl ergänzen
- Hinzugabe der Menge an Antikörpern in Abhängigkeit der Zellzahl
- 30 min im Dunkeln auf Eis inkubieren
- 2 ml PBS hinzufügen und bei 350 g 5 min zentrifugieren
- Überstand verwerfen und mit 1 ml sterilem Sort-Puffer homogenisieren

Nach der Sortierung

- Positiv selektierte Zellen in 5 ml Co-Kulturmedium auffangen

- 8 min waschen bei 4 °C und 350 g, Resuspension in 1 ml Co-Kulturmedium und Lagerung auf Eis bis zur Verwendung
- Zellzahlbestimmung mit der Neubauer-Zählkammer oder Sysmex KX-21N

Messung

Die Messung der IFN- γ positiven T-Zellen wurde per Durchflusszytometrie mit dem BD FACS Canto™ II durchgeführt. Nach dem letzten Waschvorgang wurden die Zellen homogenisiert, sodass sie in 100 – 200 μ l Waschpuffer vorlagen, und schnellstmöglich gemessen.

2.2.9 Statistik

Die statistische Analyse in dieser Arbeit erfolgte mit der Software GraphPad Prism 6 unter Verwendung des gepaarten t-Tests.

Die Ergebnisse der unabhängig durchgeführten Experimente wurden als Mittelwert plus Standardfehler (SEM) dargestellt. Als signifikante p-Werte wurden *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001 angesehen.

3 Ergebnisse

3.1 Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Anwesenheit von MSC, pDC und CpG-ODN M362

Um zu untersuchen, ob MSC einen Einfluss auf die CMV-spezifische Aktivierung der T-Zellen haben können, wurden zunächst T-Zellen zusammen mit pDC und MSC über 10 Tage in Anwesenheit von CpG-ODN M362 co-kultiviert. Abbildung 7 ist zu entnehmen, dass die Hinzugabe von MSC in Anwesenheit von CMV-Peptid, pDC und CpG-ODN M362 den prozentualen Anteil der IFN- γ pos. CD8⁺ T-Zellen erhöhen kann. CpG-ODN M362 scheint hier der entscheidende Faktor zu sein, denn ohne die TLR 9 Stimulation sind keine signifikante Erhöhung sowie sehr heterogene Ergebnissen ersichtlich. Ebenfalls ist in den Gruppen mit CMV-Peptid, pDC und MSC eine signifikante Verstärkung durch Erweiterung mit CpG-ODN M362 zu erkennen. Nicht aufgeführt sind die CD4⁺ T-Zellen, bei denen bei Werten von < 1% keine Aktivierung stattgefunden hat.

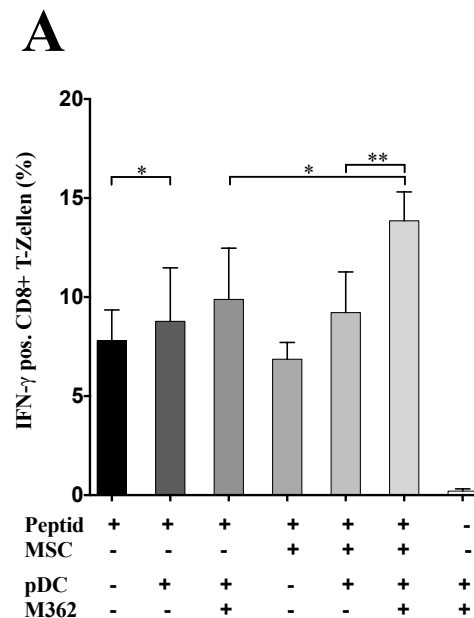


Abbildung 7 Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Anwesenheit von MSC, pDC und CpG-ODN M362

10-tägige T-Zell-pDC-MS-Co-Kultur mit (+) CMV-Peptid und mit bzw. ohne (-) CpG-ODN M362. Anschließende Restimulation und Messung der IFN- γ positiven CMV-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Gruppe ohne CMV-Peptid dient als Negativkontrolle. Es wurden n=7-10 unabhängige Experimente durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwert + SEM. **p < 0,01, *p < 0,05

3.2 Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Anwesenheit von MSC, PBMC und CpG-ODN M362

Da die T-Zell-pDC-MSC Co-Kultur Hinweise dafür lieferte, dass unter Bedingungen mit CpG-ODN M362 MSC fördernd auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen wirken können, sollte nun analysiert werden, ob sich diese Effekte auch in einer PBMC-MSC Co-Kultur zeigen lassen.

In Abbildung 8 offenbart sich bei Hinzugabe von MSC in Anwesenheit von CMV-Peptid und CpG-ODN M362 eine hochsignifikante Erhöhung des Anteils der IFN- γ pos. CMV-spez. T-Zellen, die durch eine hohe Anzahl an Wiederholungen (CD8: n=38, CD4: n=27) verifiziert werden konnte. Abbildung 8 B ist eine Aufgliederung der einzelnen

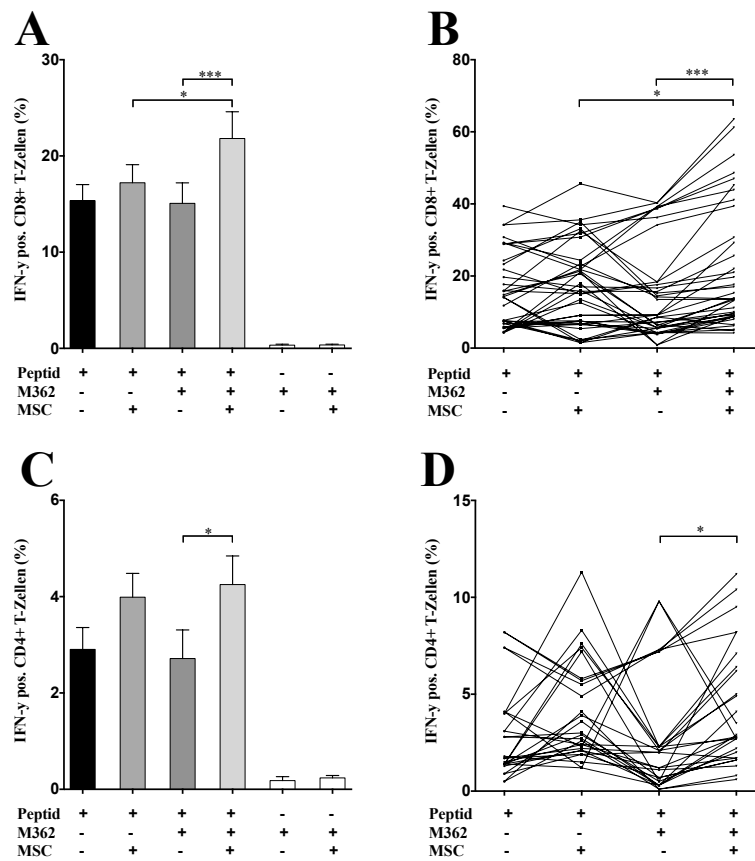


Abbildung 8 Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Anwesenheit von MSC, PBMC und CpG-ODN M362

10-tägige PBMC Co-Kultur mit (+) bzw. ohne (-) MSC, CMV-Peptid und CpG-ODN M362 und anschließender Restimulation. Dargestellt sind die IFN- γ positiven CD8+ T-Zellen in (A), (B) sowie die CD4+ T-Zellen in (C), (D). (B) und (D) zeigen die einzelnen Experimente und ein überwiegendes Ansteigen der Werte bei Hinzugabe von MSC in Anwesenheit von CpG-ODN M362. Gruppen ohne CMV-Peptid dienen als Negativkontrolle. Es wurden n=38 bzw. n=27 unabhängige Experimente durchgeführt. Dargestellt sind Mittelwert + SEM. ***p < 0,001, *p < 0,05

Experimente von 8 A und verdeutlicht, dass die Hinzugabe von MSC zu CMV-Peptid und CpG-ODN M362 in der überwiegenden Zahl der Experimente eine Erhöhung des Anteils aktivierter CMV-spez. CD8+ T-Zellen bewirkt.

Im Kontrast zu der T-Zell-pDC-MSK Co-Kultur scheint in Abbildung 8 C und 8 D ebenfalls bei den CD4+ T-Zellen ein zu den CD8+ T-Zellen vergleichbarer Effekt vorhanden zu sein, auch wenn sich dieser etwas heterogener und in prozentual niedrigeren Werten darstellt.

Ist keine Stimulation durch CpG-ODN M362 vorhanden, stellen sich die Auswirkungen durch teils hemmende, teils fördernde Wirkung unterschiedlich dar.

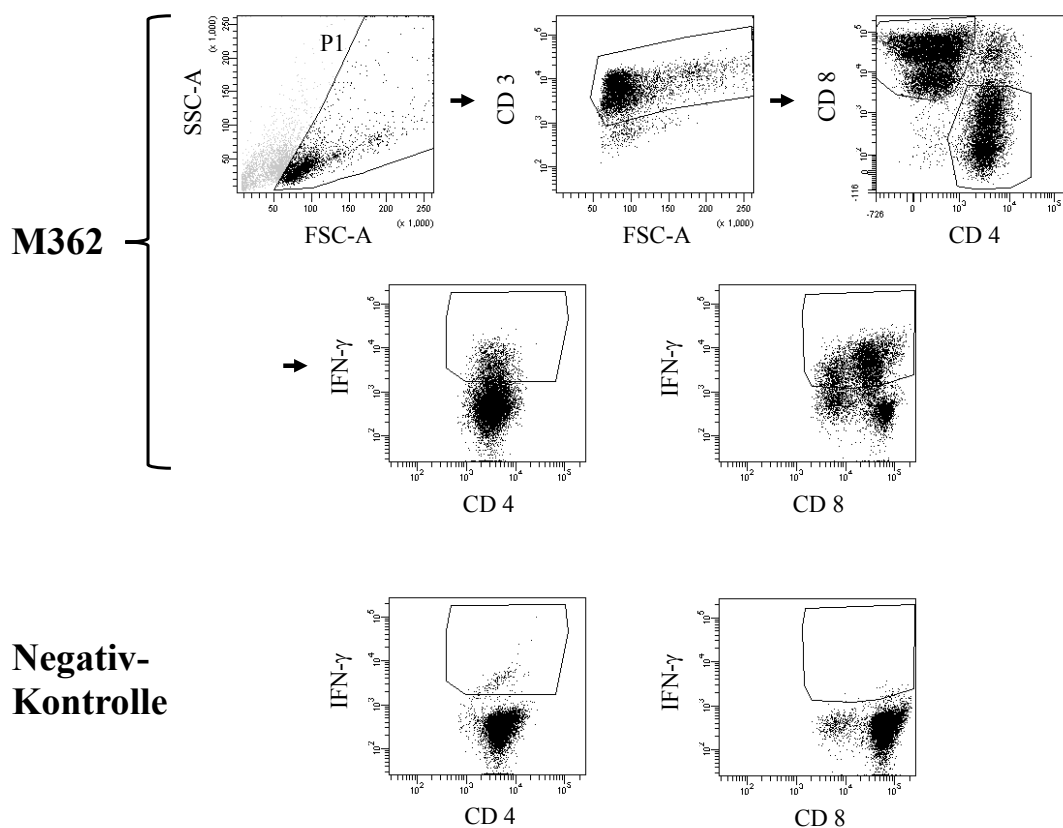


Abbildung 9 Durchflusszytometrische Darstellung der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Anwesenheit von MSC, PBMC und CpG-ODN M362

Darstellung einer beispielhaften Gatingstrategie bei der Messung mittels Durchflusszytometer nach 10-tägiger Co-Kultur mit PBMC, MSC, CpG-ODN M362 sowie mit (A-E) bzw. ohne (F-G) CMV-Peptid und Restimulation an Tag 10. Großzügige Auswahl der Lymphozyten (P1 in A). Anschließendes Gating der T-Zellen über CD3 (B) und nachfolgende Bestimmung der T-Zell-Subpopulationen mit den Oberflächenantikörpern CD8 bzw. CD4 (C). Aus diesen Populationen erfolgte die Messung der aktivierten CD4+ T-Zellen (D) und CD8+ T-Zellen (E) über intrazelluläre IFN-γ Bestimmung. Kontrollbestimmung ohne CMV-Peptid zeigt einen wesentlich geringeren Anteil aktivierter CD4+ bzw. CD8+ T-Zellen (F bzw. G).

3.3 Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Anwesenheit von MSC, PBMC und LPS bzw. CpG-ODN 2216

Die bisher durchgeführten Analysen bezogen sich auf den Einfluss von MSC auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen unter Anwesenheit des Klasse C TLR 9 Agonisten CpG-ODN M362.

Die Frage, ob sich auch andere Liganden zusammen mit MSC förderlich auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen auswirken können, soll mit der Co-Kultur von PBMC und MSC bei Stimulation mit dem Klasse A TLR 9 Agonisten CpG-ODN 2216 sowie dem TLR 4 Agonisten LPS untersucht werden. Der Klasse C Agonist CpG-ODN M362 induziert eher eine Reifung von pDC während CpG-ODN 2216 vornehmlich die Produktion von IFN- α anregt.

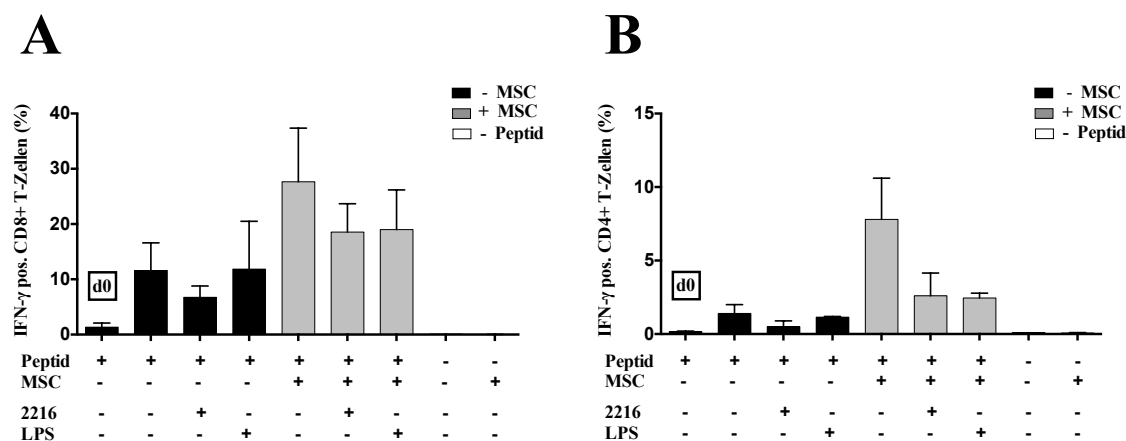


Abbildung 10 Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Anwesenheit von MSC, PBMC und LPS bzw. CpG-ODN 2216

Co-Kultur mit PBMC und MSC über 10 Tage mit anschließender Restimulation sowie mit (+) bzw. ohne (-) Hinzugabe von CMV-Peptid und CpG-ODN 2216 bzw. LPS. Darstellung der IFN- γ positiven CD8+ (A) und CD4+ (B) T-Zellen. Messung von Tag 0 (d0) als Aktivierungskontrolle, sowie Gruppen ohne CMV-Peptid als Negativkontrollen. Es wurden 4 separate Experimente durchgeführt (Mittelwert + SEM).

Abbildung 10 demonstriert einen förderlichen Effekt durch Zugabe von MSC unabhängig von einer Stimulation bei beiden Subpopulationen der T-Zellen. Durch das Hinzufügen von MSC in Bedingungen von LPS oder CpG-ODN 2216 stellt sich eine verstärkende Wirkung auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen ein. Allerdings konnte in Anwesenheit von MSC, im Gegensatz zum vorher dargestellten CpG-ODN M362, durch das Hinzufügen von LPS bzw. CpG-ODN 2216 keine verstärkende Auswirkung erzielt werden. MSC scheinen unter diesen Bedingungen eher inhomogen bis supprimierend zu wirken. Diese Beobachtungen sind sowohl auf CD8+ als auch CD4+ T-Zellen zu

beziehen. Der Vergleich der Messung des Ausgangswertes an d0 mit den weiteren Messungen an d10 stellt die stattgefundenene prozentuale Erhöhung aktivierter CMV-spezifischen T-Zellen dar.

3.4 Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung durch zweimalige MSC Gabe in Anwesenheit von PBMC und verschiedenen TLR-Agonisten

In den Co-Kulturen wurden MSC jeweils nur am Tag des Versuchsbeginns hinzugegeben. Jedoch ist unklar, ob die MSC bis zum Versuchsende an Tag 10 überleben. Daher wurde analysiert, ob eine ergänzende Hinzugabe an Tag 5 von 1 % MSC einen Einfluss auf die Aktivierung der CMV-spezifischen T-Zellen hat.

Abbildung 11 demonstriert keinen eindeutig fördernden Einfluss von zusätzlichen MSC an Tag 5 auf die Erhöhung des Anteils IFN- γ produzierender CMV-spez. T-Zellen.

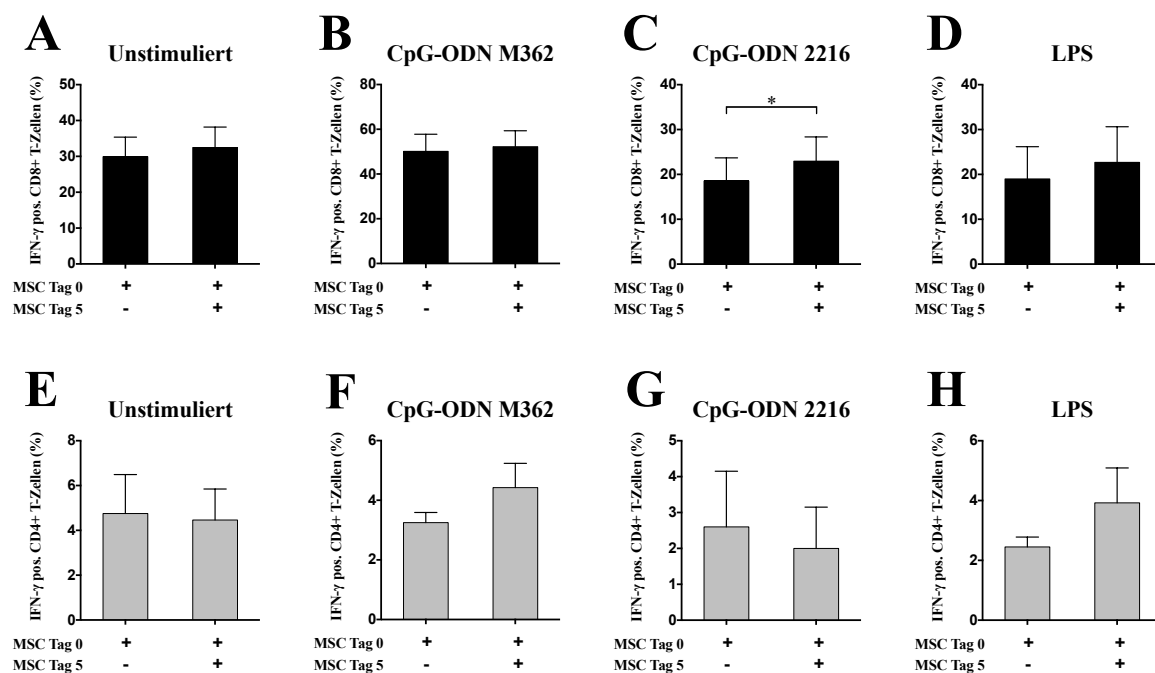


Abbildung 11 Beeinflussung der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung durch zweimalige MSC Gabe in Anwesenheit von PBMC und verschiedenen TLR-Agonisten

PBMC in Co-Kultur mit MSC über 10 Tage mit anschließender Restimulation. Hinzugabe (+) von MSC an Tag 0 oder an Tag 0 und 5. Weiterhin wurde CMV-Peptid sowie CpG-ODN M362 (B & F), CpG-ODN 2216 (C & G) oder LPS (D & H) hinzugefügt. „Unstimuliert“ (A & E) erhielt keinen weiteren Zusatz. Darstellung der IFN- γ positiven CD8+ (A-D) und CD4+ T-Zellen (E-H). Negativkontrolle ohne CMV-Peptid nicht aufgeführt, Werte stets < 1%. Anzahl unabhängiger Experimente: (A & E) n=8; (B & F), (C & G), (D & H) n=4. Dargestellt sind (Mittelwert + SEM).

*p < 0,05

Diese Ergebnisse ergeben sich unabhängig davon, ob und mit welcher Substanz stimuliert wurde. Obwohl ubiquitär ein geringer fördernder Effekt insbesondere unter Stimulation mit CpG-ODN 2216 und LPS (Abbildung 11 C und D) für die CD8⁺ T-Zellpopulation vorhanden zu sein scheint, der bei CpG-ODN 2216 sogar signifikant ist, tritt diese Wirkung nicht einheitlich in den durchgeführten Experimenten auf. Bei Betrachtung der CD4⁺ T-Zellen ist verdeutlicht, dass eine sehr inhomogene Reaktion auf die zweimalige Hinzugabe von MSC folgt. Negativkontrollen ohne CMV-Peptid sind nicht aufgeführt, ergaben jedoch Werte von < 1 %.

3.5 Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Abhängigkeit der MSC-Konzentration in Anwesenheit von PBMC und CpG-ODN M362

Im Folgenden wurde die Menge der MSC im Verhältnis zur Gesamtzellzahl in Co-Kultur mit PBMC variiert, um zu ermitteln, ob die Höhe des MSC-Anteils einen beeinflussenden

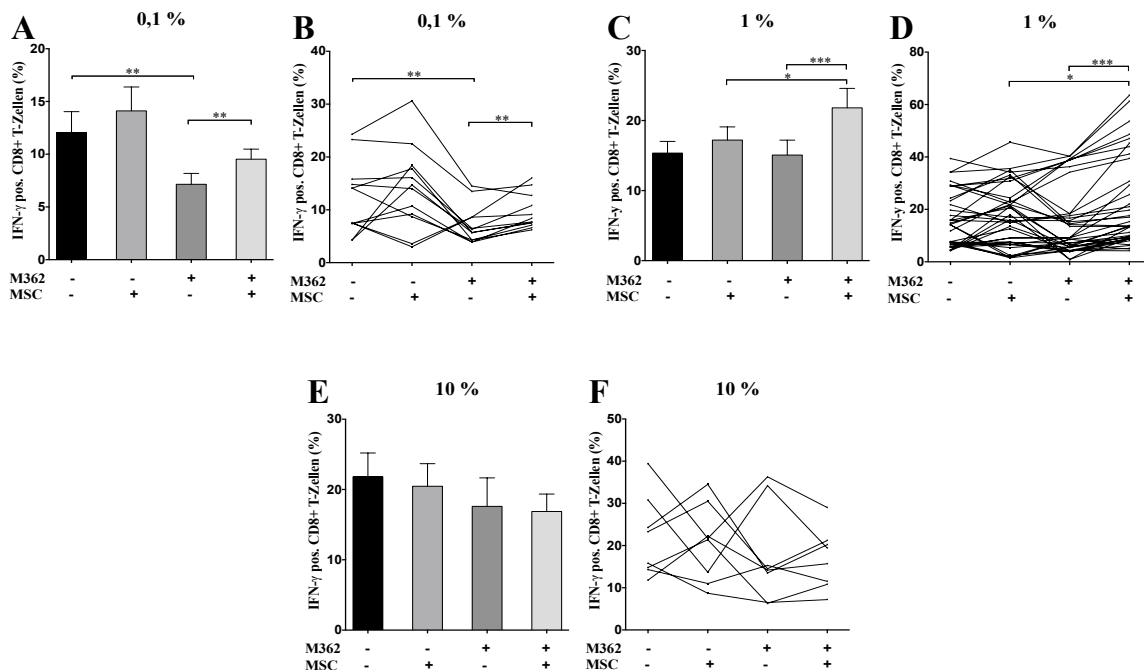


Abbildung 12 Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Abhängigkeit der MSC-Konzentration in Anwesenheit von PBMC und CpG-ODN M362

Co-Kultur von PBMC und CMV-Peptid über 10 Tage mit (+) oder ohne (-) Hinzugabe von MSC und CpG-ODN M362 und anschließender Restimulation. Der Anteil der MSC an der Gesamtzellzahl variierte zwischen 0,1 % (A, B), 1 % (C, D) und 10 % (E, F). Dargestellt ist der Anteil der IFN- γ positiven CD8⁺ T-Zellen an allen CD8⁺ T-Zellen. Die den Balkendiagrammen zugehörigen Liniendiagramme stellen eine Aufgliederung der einzelnen Experimente dar. Negativkontrollen ohne CMV-Peptid sind nicht aufgeführt, die Werte befanden sich stets in vernachlässigbar geringen Bereichen. Anzahl der unabhängig durchgeführten Experimente in alphabetischer Reihenfolge: 12, 38, 8. Darstellung (Mittelwert + SEM). ***p < 0,001, **p < 0,01, *p < 0,05

Faktor darstellt. Die Abbildungen 12 A und 12 B der Kultivierung mit 0,1 % MSC demonstriert eine Verminderung des Anteils der IFN- γ produzierenden CD8+ T-Zellen bei Hinzugabe von CpG-ODN M362. Werden unter diesen Bedingungen MSC ergänzt, kommt es zu einer signifikanten Förderung der Aktivierung.

Letztere Aussage ist auch bezüglich der Kultur mit 1 % MSC (Abbildung C, D) zu treffen, bei der eine hochsignifikante Förderung durch die Ergänzung von MSC in CpG-ODN M362 Bedingungen zu erzielen ist.

Durch die Erhöhung der Konzentration der MSC auf 10 % ist nun ein Rückgang des Anteils IFN- γ produzierender CMV-spez. CD8+ T-Zellen durch MSC Gabe nachweisbar. Im Gegensatz zu den Co-Kulturen mit 0,1 bzw. 1 % MSC ist nun unabhängig von einer Stimulation eine inhomogene bis hemmende Wirkung zu erkennen. Aus der Hinzugabe von MSC in Anwesenheit von CpG-ODN M362 folgt sodann keine Erhöhung des relativen Anteils der IFN- γ produzierenden CD8+ T-Zellen. Ebenfalls bewirkt die Hinzugabe von MSC in Bedingungen mit CpG-ODN M362, im Gegensatz zu Co-Kulturen mit 0,1 % bzw. 1 % MSC, eine weitere Verminderung der Aktivierung.

Zusammenfassend lässt sich eine übereinstimmende Förderung durch Hinzugabe von MSC in Anwesenheit von CpG-ODN M362 in den Gruppen mit 0,1 % und 1 % MSC zeigen. In der Co-Kultur mit 10 % MSC ist dieser Effekt nicht mehr zu erkennen. Bei den CD4+ T-Zellen konnte nur sehr inhomogen eine Aktivierung beobachtet werden und ist auf diesem Grund nicht aufgeführt.

3.6 Spenderindividuelle Modulation von MSC auf die CMV-spezifische T-Zellaktivierung in Anwesenheit von PBMC und CpG-ODN M362

Es konnte bei verschiedenen Experimenten stellenweise eine stimulierende, zum Teil aber auch eine inhibierende Wirkung auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen beobachtet werden. Ob dabei die MSC-Linie per se fördernd oder hemmend wirkt, oder die gegenseitige Wirkbeziehung zwischen MSC-Linie und Blutspender der hauptsächliche Faktor für die heterogenen Ergebnisse sind, konnte bisher nicht festgestellt werden. Dazu wurden zeitgleich 8 unabhängige Experimente unter identischen Bedingungen durchgeführt.

In Abbildung 13 A und C bzw. B und D sind die Auswirkungen des Einflusses von 4 MSC-Linien auf die Aktivierung der T-Zellen des jeweiligen PBMC-Spender aufgeführt.

In Abbildung A und C folgt in Anwesenheit von CpG-ODN M362 eine Erhöhung der Anteils IFN- γ positiver CMV-spezifischer CD8+ bzw. CD4+ T-Zellen durch Hinzugabe

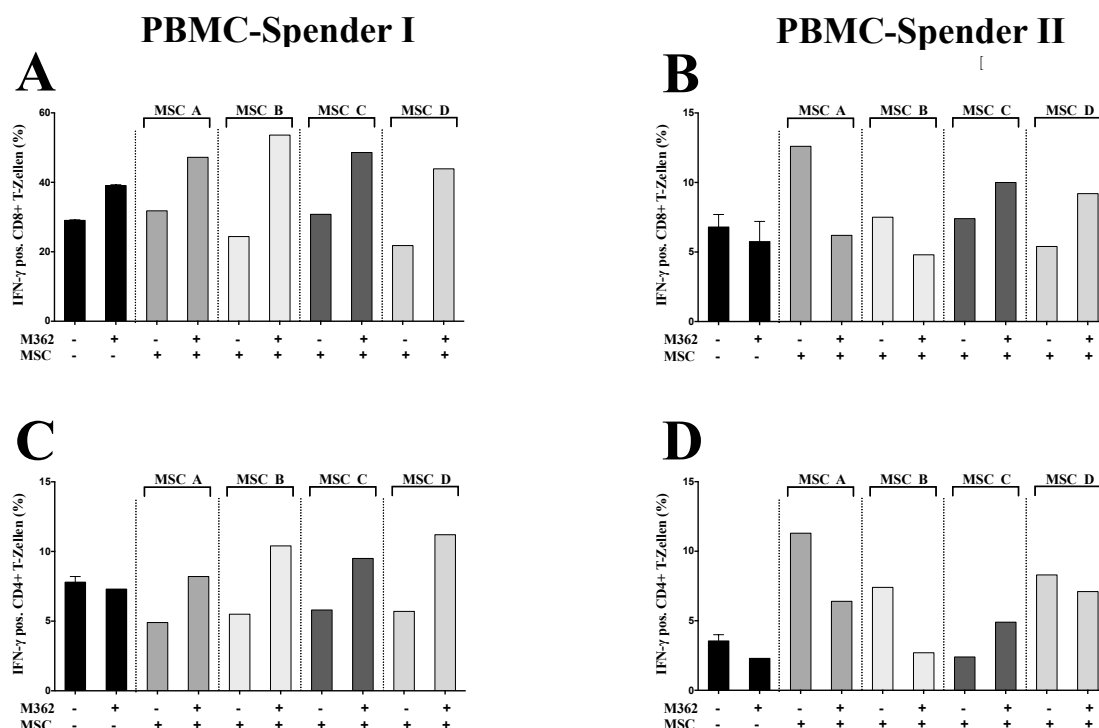


Abbildung 13 Die spenderindividuelle Modulation von MSC auf die CMV-spezifische T-Zellaktivierung in Anwesenheit von PBMC und CpG-ODN M362

Zeitgleiche Co-Kultur von PBMC (2 Spender) und MSC (4 Spender) über 10 Tage mit anschließender Restimulation. Zusätzliche Hinzugabe von CMV-Peptid sowie mit (+) und ohne (-) CpG-ODN M362. (A) und (C) zeigen die Effekte der Co-Kultur mit 4 verschiedenen MSC-Linien auf die Aktivierung von CD8+ (A) und CD4+ T-Zellen (C) von PBMC-Spender I. (B) bzw. (D) stellt den Einfluss der gleichen 4 MSC-Linien auf PBMC-Spender II dar. Darstellung der IFN- γ positiven T-Zellen. n=8 unabhängige Experimente. Dargestellt sind Mittelwert + SEM.

sämtlicher MSC-Linien. Werden die gleichen MSC-Linien unter CpG-ODN M362 Bedingungen mit PBMC-Spender II co-kultiviert, kann diese Aussage nur noch für die MSC-Linien C und D getroffen werden, während A und B eher hemmend auf die Aktivierung wirken. Die MSC-Linien verhalten sich also zum Teil konträr in Co-Kultur mit den beiden PBMC-Spendern. Bei den CD4+ T-Zellen ist bei PBMC-Spender II jedoch ebenfalls eine ubiquitäre Erhöhung des IFN- γ positiven Anteils zu verzeichnen, wenn MSC zu PBMC und CpG-ODN M362 hinzugegeben werden. Vergleicht man die Folge der Ergänzung mit CpG-ODN M362, zeigt sich, dass PBMC-Spender unterschiedlich darauf reagieren können, unabhängig davon, ob MSC mit kultiviert werden. Überwiegend ist aber ein stimulierender Effekt zu erkennen. Die alleinige

Addition von MSC ohne TLR-Ligand ergibt ein durchweg inhomogenes Bild bei CD4+ und CD8+ T-Zellen.

Übereinstimmend bleibt festzuhalten, dass in 7 von 8 Experimenten durch die Hinzugabe von MSC in Anwesenheit von CpG-ODN M362 eine fördernde Wirkung auf den Anteil der IFN- γ pos. CD8+ T-Zellen im Vergleich zu den Gruppen ohne CpG-ODN M362 festzustellen ist. In Bezug auf die CD4+ T-Zellen stellt sich dies in allen 8 Experimenten dar. MSC Linie scheinen nicht per se den gleichen Einfluss auszuüben, sondern sind abhängig von der Wechselwirkung mit den PBMC des Blutspenders sowie der Reaktion auf CpG-ODN M362 an sich.

3.7 Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung von MSC in Abwesenheit von DC bzw. CD14/19 pos. Zellen

Das Entfernen verschiedener Subpopulationen der PBMC soll einen detaillierteren Einblick in die Mechanismen der Beeinflussung der T-Zellaktivierung in einer PBMC- MSC Co-Kultur schaffen.

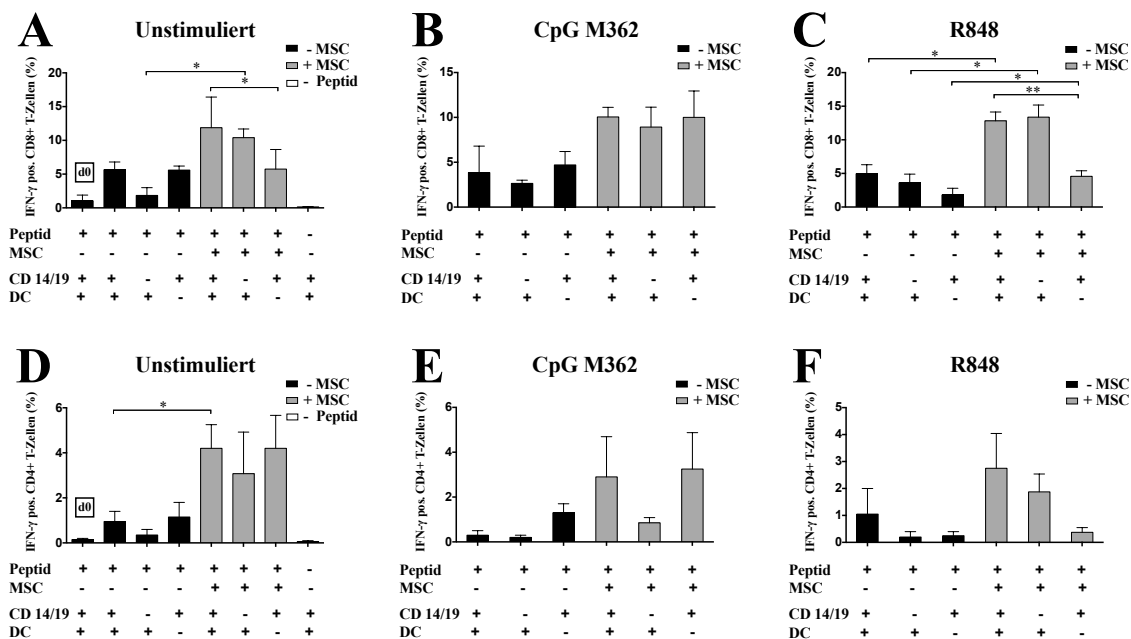


Abbildung 14 Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung von MSC in Abwesenheit von DC bzw. CD14/19 pos. Zellen

Aus PBMC wurden DC oder CD14 und 19 positive Zellen entfernt (-) und wurden mit (+) oder ohne (-) MSC und CMV-Peptid über 10 Tage mit anschließender Restimulation kultiviert. Zusätzlich wurde mit M362 (B & E) bzw. R848 (C & F) stimuliert. „Unstimuliert“ (A & D) erhielt keinen weiteren Zusatz. Darstellung des Anteils IFN- γ pos. CMV-spez. CD8+ (A-C) und CD4+ (D-F) T-Zellen. Messung bei (A & D) von Tag 0 (d0) als Aktivierungskontrolle, sowie Gruppe ohne CMV-Peptid als Negativkontrolle. Kontrollen für (B & E) und (C & F) nicht aufgeführt, jedoch in (A & D) repräsentativ. n=4 unabhängige Experimente. (Mittelwert + SEM). **p < 0,01, *p < 0,05

Ohne Stimulation mit einem TLR-Liganden (Abbildung 14 A) bewirkt die Anwesenheit von MSC eine Erhöhung der IFN- γ pos. CD8+ T-Zellen im Vergleich zu den Gruppen ohne MSC. Insbesondere stellt die Addition von MSC in den Gruppen ohne CD14/19 tragende Zellen eine signifikante Erhöhung des Anteils IFN- γ pos. CMV-spez. CD8+ T-Zellen dar. In Anwesenheit der MSC scheint durch das Entfernen der DC-Population eine signifikante und damit stärkste Abschwächung der Aktivierung stattzufinden. In den Gruppen ohne MSC ist diese Abschwächung am deutlichsten durch das Entfernen der CD14/19 pos. Zellen zu verzeichnen.

Letztere Erkenntnis lässt sich auch bei Stimulation mit CpG-ODN M362 gewinnen. In Anwesenheit von MSC und CpG-ODN M362 steigt der Anteil IFN- γ pos. CD8+ T-Zellen ubiquitär und wird durch das Entfernen einzelner Subpopulationen nicht einheitlich beeinflusst (Abbildung 14 B).

Bei Stimulation mit R848 ist in allen Gruppen ein fördernder MSC-Effekt zu sehen. Zudem demonstriert Abbildung 14 C eine Absenkung des Anteils IFN- γ pos. CMV-spezifischer CD8+ T-Zellen durch Entnahme der DC-Population unabhängig vom Vorhandensein von MSC, obwohl die Herabsetzung in Gegenwart von MSC zu einer deutlichen Signifikanz führt.

Das Entfernen der CD14/19 Zellgruppe repräsentiert bis auf eine Ausnahme den bedeutendsten Faktor für die Absenkung der Zunahme des Anteils IFN- γ pos. CMV-spezifischer CD4+ T-Zellen. Nur mit R848 Stimulation und in Anwesenheit von MSC bewirkt die Entnahme der DC-Population eine stärkere Hemmung. Allgemein zeigt sich eine deutlich geringere Erhöhung des Anteils IFN- γ pos. CMV-spezifischer CD4+ T-Zellen im Vergleich mit der CD8+ Population.

Es stellt sich heraus, dass ein Entfernen der DC-Population in Anwesenheit von MSC am ehesten einen negativen Effekt auf den Anteil IFN- γ pos. CMV-spezifischer CD8+ T-Zellen hat. Für die CD4+ T-Zellen lässt sich diese Aussage für das Entfernen von CD14/19+ Zellen treffen.

3.8 Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung von MSC in Abwesenheit von einzelnen DC-Subpopulationen

Da in 3.7 das Entfernen der DC-Population in Anwesenheit von MSC tendenziell am ehesten für ein deutliches Abfallen des Anteils der IFN- γ pos. CMV-spez. CD8+ T-Zellen verantwortlich zu sein scheint, soll nun durch Entfernen einzelner Subpopulationen der DC die Frage geklärt werden, welche dieser Zellgruppen den vergleichsweise bedeutendsten Anteil daran trägt.

Abbildung 15 zeigt durch Hinzugabe von MSC eine Absenkung des Anteils der IFN- γ pos. CMV-spez. CD8+ T-Zellen in fast allen Gruppen mit Ausnahme der Gruppe ohne pDC. Durch Entnahme der pDC-Subpopulation scheint der hier vorherrschende supprimierende MSC Einfluss aufgehoben zu werden.

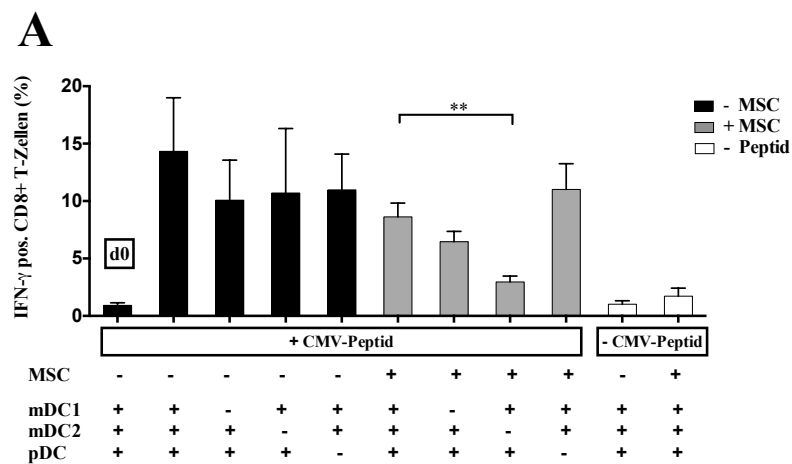


Abbildung 15 Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung von MSC in Abwesenheit von einzelnen DC-Subpopulationen

Es wurden aus PBMC die Populationen mDC1, mDC2 bzw. pDC entfernt und mit (+) oder ohne (-) MSC und CMV-Peptid über 10 Tage mit anschließender Restimulation kultiviert. Messung von Tag 0 (d0) als Aktivierungskontrolle, sowie Gruppen ohne CMV-Peptid als Negativkontrolle. Es wurden 8 unabhängige Experimente durchgeführt (Mittelwert + SEM). $p^{**} < 0,01$

Demgegenüber sorgt das Entfernen der mDC2 Subpopulation für eine signifikante Verstärkung der MSC Suppression. Dieser Effekt offenbart sich ebenfalls, wenn auch in geringerem Maße, durch das Fehlen der mDC1 Subpopulation. In der Population der CD4+ T-Zellen scheint sich bei niedrigen prozentualen Werten im Bereich der Isotyp-Negativkontrolle keine eindeutige Aktivierung vollzogen zu haben.

3.9 Einfluss von Poly I:C auf die Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung von MSC in Abwesenheit von einzelnen DC-Subpopulationen

Im Folgenden wurde untersucht, wie sich die Hinzugabe des TLR 3 Liganden Poly I:C auf eine PBMC-MSK Co-Kultur auswirkt, aus der einzelne DC-Subpopulationen entfernt wurden.

In Abbildung 16 wird zunächst eine Absenkung des prozentualen Anteils der CMV-spez. IFN- γ pos. CMV-spez. CD8+ T-Zellen durch Hinzugabe von MSC in den Gruppen der gesamten PBMC sowie in den Gruppen ohne mDC1 und mDC2 offenbar. Der hemmende Effekt der MSC lässt sich durch Hinzugabe von Poly I:C nahezu aufheben. Auf die

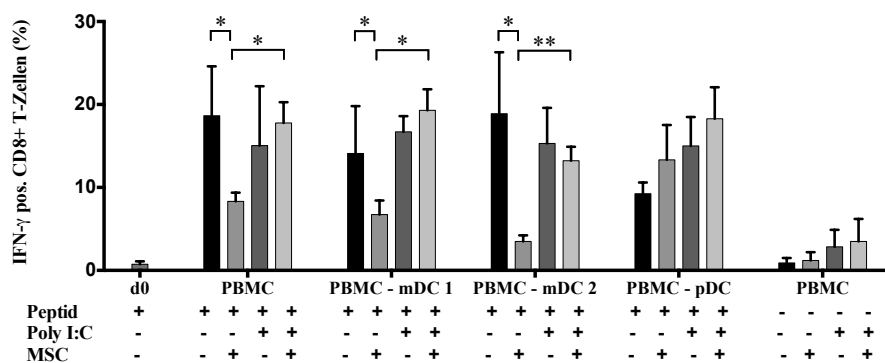


Abbildung 16 Der Einfluss von Poly I:C auf die Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung von MSC in Abwesenheit von einzelnen DC-Subpopulationen

Es wurden die DC-Subpopulationen mDC1, mDC2 bzw. pDC aus den PBMC entfernt und mit (+) bzw. ohne (-) MSC, CMV-Peptid und Poly I:C 10 Tage mit anschließender Restimulation co-kultiviert. Messung von Tag 0 (d0) als Aktivierungskontrolle, sowie Gruppen ohne CMV-Peptid als Negativkontrolle. Durchführung von 4 separaten Experimente. (Mittelwert + SEM). **p < 0,01, *p < 0,05

Gruppe ohne pDC lässt sich die MSC Wirkung nicht übertragen, die Ergänzung mit Poly I:C wirkt sich jedoch auch hier positiv auf die Aktivierung CMV-spez. CD8+ T-Zellen aus. Ohne MSC offenbart sich keine eindeutige Veränderung durch Hinzugabe von Poly I:C.

4 Diskussion

4.1 In Anwesenheit von CpG-ODN M362 sind MSC in der Lage stimulierend auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen zu wirken

T-Zell-pDC-MSK Co-Kultur

MSC sind bekannt für ihre Eigenschaften in der Modulation einer Immunantwort. Die Voraussetzungen, um diese Immunreaktion *in vitro* nachzustellen, wurde mit einer Co-Kultur sortierter CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen mit autologen pDC geschaffen. Die als professionelle antigenpräsentierende Zellen bezeichneten pDC präsentieren das ebenfalls hinzugegebene CMV-Peptid über ihre MHC-Moleküle und können über diesen Weg eine Aktivierung der CMV-spezifischen T-Zellen erzielen. Durch Hinzugabe von allogenen MSC wird diese Wechselbeziehung beeinflusst.

Es kann in Abbildung 7 gezeigt werden, dass es in Anwesenheit von CPG-ODN M362 - einem TLR 9 Liganden der Klasse C - zu einem signifikanten Anstieg des Anteils IFN- γ produzierender CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch Hinzugabe von MSC kommt. Die Ergebnisse stellen sich ohne CpG-ODN M362 nicht homogen dar, sodass dessen Vorhandensein einen bedeutsamen Faktor zu bilden scheint.

TLR 9 ist ein zytoplasmatisch gelegener Rezeptor, der CpG-Sequenzen von bakterieller oder viraler DNA aber auch synthetisch hergestellter CpG-Motive erkennt und u.a. auf pDC vorhanden ist. Als Folge der Bindung von PAMPs werden die pDC aktiviert und steigern ihre Fähigkeiten in der Pathogenabwehr durch pro-inflammatorische Zytokine IFN- α , TNF- α und IL-6 und verstärkte Antigenpräsentation an T-Zellen (Vollmer et al. 2004; Hemont et al. 2013; Krug et al. 2001). Ob MSC ebenfalls TLR 9 besitzen, ist strittig. Liotta et al. und Raicevic et al. postulierten, dass sie keine TLR 9 exprimieren, Tomchuk et al. hingegen demonstrierten ein Vorhandensein von TLR 9 mRNA, jedoch eine sehr geringe Expression auf Protein-Basis mit ausbleibender Signalkaskade nach passender CpG-Stimulation (Liotta et al. 2008; Raicevic et al. 2010; Tomchuck et al. 2008). Sangiorgi et al. hingegen belegten sowohl das Vorhandensein als auch konkrete

immunologische Einflüsse nach TLR 9 Aktivierung (Sangiorgi et al. 2016). Entgegen der in dieser Arbeit erhobenen Ergebnisse demonstrierten sie durch TLR 9 Aktivierung eine Verminderung der T-Zellproliferation nach Co-Kultur mit MSC und PBMC. Sie nutzten allerdings den TLR 9 Liganden DSP30 an PBMC-Spendern ohne Peptidhinzugabe. Neben dieser Diskrepanz der Kulturbedingungen sollte, obwohl in vorliegender Arbeit mit dem Klasse A Agonisten CpG-ODN 2216 ebenfalls ein fördernder Effekt nachgewiesen werden konnte, nicht von einer pauschalen Wirkung der TLR 9 Liganden aufgrund der verschiedenen CpG-Klassen gesprochen werden, da sich Stärke und Art der Aktivierung in Abhängigkeit der CpG-Klasse unterscheiden können (Vollmer et al. 2004; Sangiorgi et al. 2016).

Bei den in der Arbeit vorliegenden Bedingungen ist es also durchaus denkbar mit CPG-ODN M362 als TLR 9 Stimulation sowohl pDC als auch MSC zu aktivieren. Diese Hypothese wird dadurch gestärkt, dass MSC als kernhaltige Zellen MHC-Moleküle besitzen und insbesondere MHC-Klasse I aber auch MHC-Klasse II nach Aktivierung mit bestimmten Umgebungsfaktoren hochreguliert wird. Mehrere Arbeitsgruppen konnten zeigen, dass MSC auch in der Lage sind, als APC zu fungieren (Chan et al. 2006; Romieu-Mourez et al. 2007; Morandi et al. 2009; Blanc et al. 2003; Francois et al. 2009).

Da es in der Co-Kultur mit T-Zellen, pDC und MSC nur zu einer reproduzierbaren Aktivierung CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen kommt, könnte die Eigenschaft der MSC, Antigene vermehrt über MHC-Klasse I zu präsentieren, eine plausible Erklärung für diese Beobachtung liefern. Über MHC-Klasse I sind Zellen in der Lage, endogene Peptide aktivierten CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren. Für die vorherige Aktivierung der naiven T-Zellen sind allerdings APC mit Kostimulatormolekülen notwendig. APC sind außerdem in der Lage, exogene Antigene CD8⁺ T-Zellen zu präsentieren und diese somit zu aktivieren. Diese Fähigkeit wird als Kreuzpräsentation bezeichnet. Durch die Fähigkeit der MSC, nach Aktivierung APC-Eigenschaften erfüllen zu können, erscheint es möglich, dass sie ebenfalls in der Lage sind, Antigene kreuz-zu-präsentieren (Francois et al. 2009; Morandi et al. 2009). Einschränkend postulierten Morandi et al., dass MSC aufgrund des Fehlens von Kostimulatormolekülen nicht in der Lage sind, naive CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren, doch durchaus fähig sind, antigenspezifische CD8⁺ T-Gedächtniszellen zu aktivieren, wozu keine Kostimulation von Nöten ist (Morandi et al. 2009). Dies konnte bei Peptid gepulsten MSC nachgewiesen werden und scheint auf die Co-Kulturen des vorliegenden Projektes mit dauerhaft vorhandenem CMV-Peptid durchaus übertragbar zu

sein. Somit könnten MSC und pDC in der Lage sein, CMV-spezifische CD8⁺ T-Zellen zu aktivieren.

Da es zu keiner starken Aktivierung der CMV-spez. CD4⁺ T-Zellen gekommen ist, ist zu hinterfragen, aus welchem Grund dies nicht stattgefunden hat. Neben pDC sind MSC auch in der Lage über MHC-II Expression Antigen-spez. CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren. Ob die Expression konstitutiv ist und von beispielsweise IFN- γ hochreguliert wird oder MHC-Klasse II nur durch das Vorhandensein pro-inflammatorischer Zytokine exprimiert wird, ist allerdings umstritten (Blanc et al. 2003; Romieu-Mourez et al. 2007). Chan et al. sagten sogar aus, dass hohe Mengen IFN- γ zu einer Verminderung der MHC-Expression führen (Chan et al. 2006). Die generelle Fähigkeit der MSC, Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellen zu aktivieren, konnte allerdings übereinstimmend nachgewiesen werden.

Ein Faktor für die geringe CD4⁺ Aktivierung könnte ein vermindertes Überleben und eine mangelnde Funktion der pDC sein (Grouard et al. 1997). Da APC durch Antigenpräsentation lediglich den Anstoß für eine sich selbst verstärkende T-Zellaktivierung geben müssen, wurde auf eine Zugabe von IL-3 als Überlebensfaktor für pDC verzichtet. Aufgrund der Vorkenntnis des raschen Sterbens der pDC wurden nach Tag 0 ebenfalls an den Tagen 5 und 10 aufgetaute pDC hinzugefügt. Der Vorgang des Einfrierens und Auftauens könnte dabei veränderte Eigenschaften der pDC nach sich ziehen. Lewalle et al. stellten wiederum keine Unterschiede zwischen aufgetauten und frischen pDC bezüglich ihrer Fähigkeiten der Antigenpräsentation und Zytokinproduktion fest, sodass eine potente Aktivierung der CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen durch tiefgefrorene pDC nicht beeinträchtigt scheint (Lewalle et al. 2000). Auch die MSC scheinen trotz der vorhandenen Fähigkeit, nicht in der Lage zu sein, eine ausreichende Aktivierung zu gewährleisten.

PBMC-MSC Co-Kultur

Um zu untersuchen, ob MSC auch unter physiologischeren Bedingungen der Co-Kultur stimulierend auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen wirken können, wurden sie gemeinsam mit PBMC und CMV-Peptid co-kultiviert (Abbildung 8). Eine Erhöhung des Anteils aktivierter CMV-spezifischer T-Zellen in Anwesenheit von CpG-ODN M362 durch Hinzugabe von MSC zeigte sich bei CD8⁺ T-Zellen und CD4⁺ T-Zellen

gleichermaßen. Die Kultivierung mit PBMC scheint eine zuverlässigere Erhöhung des aktivierten CD4⁺ T-Zellen Anteils zu ermöglichen. Trotz einer nun vorhandenen Aktivierung der CMV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen ist weiterhin eine Diskrepanz in der Höhe des Anteils aktivierter T-Zellen wahrzunehmen. Im Mittel sind 20-30% der CD8⁺ T-Zellen aktiviert, CD4⁺ T-Zellen zeigen dagegen durchschnittlich einen Aktivierungsanteil von nur 4-6%.

Durch die Co-Kultur mit PBMC sind mit mDC, B-Zellen und Monozyten (Makrophagen sind vornehmlich im Gewebe anzutreffen) weitere Populationen von APC anwesend. Bachem et al. demonstrierten, dass pDC in Co-Kultur mit CMV-Peptid und CD8⁺ T-Zellen den mDC1 und mDC2 in der Aktivierung von T-Zellen unterlegen scheinen (Bachem et al. 2010). So ermöglicht die Anwesenheit der mDC eventuell eine stärkere Aktivierung. Das Vorhandensein verschiedener APC scheint außerdem der Grund für die nun stattfindende Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen zu sein. Durch die Zusammensetzung der PBMC wird eine physiologischere Kommunikation mit diversen Zellgruppen geschaffen. Dies könnte demzufolge für die CD4⁺ T-Zellaktivierung über einen langen Zeitraum nötig sein.

Ein Grund für den stimulierenden Effekt der MSC in Bedingungen von CpG-ODN M362 könnten die Zytokine in ihrer Umgebung darstellen. Mehrere Arbeitsgruppen berichteten über ein differentielles Ansprechen der MSC in Abhängigkeit des Zytokinmilieus (François et al. 2012; Cuerquis et al. 2014; Meisel et al. 2004). Sie postulierten, dass eine hohe Menge pro-inflammatorischer Zytokine, wie beispielsweise TNF- α oder IFN- γ , einen anti-inflammatorischen Einfluss der MSC fördert. Bei niedrigen Konzentrationen scheint eine pro-inflammatorische Wirkung einzusetzen. Sie scheinen somit als Regulatoren der Immunantwort wirksam zu sein. Bei Präsenz einer hohen IFN- γ Konzentration wirken MSC über Zell-Zell-Kontakte und Zytokine immunregulatorisch. PD-1 bzw. PD-L1/2 scheinen wichtige Faktoren zu sein, über deren Bindung MSC Kontakt zu T-Zellen aufnehmen und dadurch hemmen können (Augello et al. 2005). Als Zytokin scheint das von MSC produzierte TGF- β eine große Rolle darin einzunehmen, da es einen Arrest des Zell-Zyklus der T-Zellen induziert und die IL-2 induzierte Expansion inhibiert (Nicola et al. 2002; Bright et al. 1997). Ebenfalls belegen Studien, dass eine hohe Sekretion vonIDO entscheidend zu einer hemmenden Wirkweise der MSC auf das Immunsystem beiträgt (François et al. 2012; Meisel et al. 2004).

Obwohl in vorliegender Arbeit ein fördernder Effekt insbesondere auf CD8⁺ T-Zellen unter bestimmten Bedingungen beobachtet wurde, könnte die IFN- γ Menge der Umgebung ein wichtiges Kriterium ausmachen. So scheinen niedrige bis moderate Mengen an IFN- γ eine Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen durch MSC zu fördern und könnte damit eine Erklärung für den beobachteten fördernden Effekt auf CD8⁺ T-Zellen liefern (Francois et al. 2009; Chan et al. 2006). Auch Chan et al. zeigten, dass bei geringen Mengen IFN- γ die Fähigkeit der Immunsuppression von MSC vermindert ist, ein derartiges Milieu jedoch auch zu einer Hochregulierung der Expression von MHC-Klasse II Molekülen führt (Chan et al. 2006). Letzterer Aspekt spräche für eine stärkere Aktivierung CD4⁺ T-Zellen bei niedrigen IFN- γ Konzentrationen. Le Blanc et al. und Götherström et al. hingegen demonstrierten bei wenig bis keiner IFN- γ Stimulation eine vernachlässigbar niedrige Expression von MHC-Klasse II, sodass auch hier in Abhängigkeit der MSC-Linie sowie der Kulturbedingungen eine Heterogenität anzunehmen ist (Blanc et al. 2003; Götherström et al. 2004).

Übereinstimmend ist in vorliegender Arbeit ein fördernder Effekt von MSC durch deren Hinzugabe unter Bedingungen mit CpG-ODN M362 zu beobachten. In einer Kultur mit PBMC kann dieser Stimulus neben pDC und MSC auch weitere Zellgruppen aktivieren, beispielsweise weitere Subpopulationen der APC. Tatsächlich exprimieren humane B-Zellen TLR 9, wohingegen Monozyten dies vergleichsweise nur in sehr geringem Maße tun (Simchoni et al. 2015; Jarrossay et al. 2001; Hornung et al. 2002). B-Zellen sind in der Lage, nach TLR 9 Aktivierung pro-inflammatorisch zu wirken, indem sie sich zu Plasma-Zellen differenzieren und Antikörper produzieren. Außerdem ist es ihnen als APC möglich, eine effektive Aktivierung von T-Zellen zu betreiben.

Werden zu diesen Bedingungen MSC hinzugegeben, könnten sie - sofern die IFN- γ Konzentration auf niedrigem Niveau verbleibt - pro-inflammatorisch und somit synergistisch mit den APC wirken. Dies würde eine potenzielle Erklärung für die in diesem Projekt beobachteten pro-inflammatorischen Einfluss der MSC liefern.

Als Klasse C Agonist des TLR 9 stellte sich CpG-ODN M362 als bedeutungsvoller Faktor in der Erhöhung des Anteils aktivierter CMV-spezifischer T-Zellen heraus.

Wird der TLR 4 Ligand LPS eingesetzt, konnte in Anwesenheit der genannten TLR-Liganden ebenfalls eine Erhöhung des Anteils CD4⁺ und CD8⁺ CMV-spezifischer T-

Zellen durch Addition von MSC gezeigt werden (Abbildung 10). Die Beobachtung geht einher mit Liotta et al., die demonstrierten, dass MSC größere Mengen TLR 4 exprimieren, über diese aktiviert werden und die T-Zellaktivierung unterstützen können (Liotta et al. 2008; Sangiorgi et al. 2016). Die erhöhte Produktion von beispielsweise IL-6 und IL-8 ermöglicht den MSC die Herstellung eines pro-inflammatorischen Milieus und insbesondere IL-6 inhibiert die Apoptose antigenstimulierter T-Zellen (Liotta et al. 2008; Tomchuck et al. 2008). Als einzige DC können mDC1 (pDC und mDC2 fehlt es an einer TLR 4 Expression) über TLR 4 aktiviert werden und zeigen eine Förderung der Expansion CD8⁺ T-Zellen durch LPS Stimulation in Co-Kultur mit CMV-Peptid und T-Zellen (Nizzoli et al. 2013).

Sind allerdings MSC vorhanden, demonstrieren die erhobenen Daten durch Hinzugabe von LPS eine Hemmung der Aktivierung CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Mehrere Arbeitsgruppen sahen hingegen durch Hinzugabe von LPS eine eher pro-inflammatorische Wirkung der MSC (Beyth et al. 2005; Liotta et al. 2008; Waterman et al. 2010). Gründe für diese widersprüchlichen Beobachtungen könnten eine längere Kultivierung, das dauerhafte Vorhandensein des Antigens und LPS sowie die Kombination von LPS mit CMV-Peptid liefern. So postulierten Jongbloed et al. eine enorme Zunahme der IFN- γ Menge in Co-Kulturen von mDC1, T-Zellen, CMV-Peptid und LPS im Vergleich zu Co-Kulturen ohne ein vorhandenes Virus-Peptid (Jongbloed et al. 2010).

Neben LPS wurden zudem die Auswirkungen einer anderen Klasse von TLR 9 Agonisten untersucht. Die Auswirkungen auf die T-Zellaktivierung durch eine Co-Kultur mit dem Klasse A Agonisten CpG-ODN 2216 ähneln denen der LPS Co-Kultur. CpG-ODN 2216 besitzt durch die Induktion hoher Mengen IFN- α in pDC-Populationen eine besondere Stellung unter den CpG-ODN während CpG-ODN M362 eine bedeutende Aufgabe in der Induktion der Reife zukommt (Hartmann et al. 2006). Des Weiteren gelingt eine sehr viel stärkere Aktivierung der B-Zellen durch CpG-ODN M362 als durch 2216 mit nachfolgender Erhöhung der Kostimulator-moleküle und Produktion von IL-6 und IFN- α (Hartmann et al. 2006). Unterschiede in der Wirkung verschiedener CpG-ODN Klassen wurden in der Literatur mehrfach beschrieben, sodass genannte Gründe für die Diskrepanz der vorliegenden Ergebnisse in Abhängigkeit der CpG-Klasse verantwortlich sein können (Vollmer et al. 2004; Sangiorgi et al. 2016; Hornung et al. 2002).

In den erwähnten Experimenten von Co-Kulturen mit LPS und CpG-ODN 2216 zeigt sich eine Verstärkung durch MSC Hinzugabe, unabhängig davon ob und mit welchem Liganden stimuliert wurde. Die verwendeten MSC-Linien scheinen in diesen 4 Co-Kulturen mit den PBMC-Spendern ubiquitär fördernd auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen zu wirken. Wie zuvor gezeigt, stellt sich bei Sicht auf eine große Anzahl von Experimenten die alleinige Hinzugabe von MSC in einer PBMC Co-Kultur ohne Stimulans als überaus heterogen dar (Abbildung 8), wohingegen in Anwesenheit von CpG-ODN M362 eine reproduzierbare Verstärkung der prozentualen Aktivierung zu verzeichnen ist. Demnach müssen weiterführende Experimente mit einer größeren Anzahl folgen, in denen gezeigt wird, ob die hier gezeigte Hinzugabe von MSC in Anwesenheit von LPS und CpG-ODN 2216 ebenfalls dauerhaft und unabhängig von der PBMC-MSC Konstellation zu einer Erhöhung des Anteils CMV-spezifischer aktivierter T-Zellen kommt.

4.2 Eine zweimalige MSC-Gabe bewirkt keine wesentliche Veränderung der Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen

Bei mikroskopischen Beobachtungen, die an den Tagen 5 und 10 der Co-Kulturen durchgeführt wurden, konnten MSC anhand ihrer typischen Fibroblasten-ähnlichen Form in bestimmten Gruppen der Co-Kultur nicht mehr auffindig gemacht werden. Während in den Gruppen ohne CMV-Peptid noch einzelne MSC anhand der markanten Kontur zu erkennen waren, war dies in den Co-Kulturen mit CMV-Peptid wenig bis überhaupt nicht der Fall. Dies lässt vermuten, dass sie entweder ihre ursprüngliche Form verloren haben, sich abgelöst haben oder in den Zelltod gegangen sind und somit ihre modulatorische Wirkung nicht oder nur für kurze Zeit ausüben konnten.

Aus diesem Grund wurden MSC auch an Tag 5 der Co-Kultur hinzugefügt. Abbildung 11 verdeutlicht, dass es durch eine zusätzliche MSC-Gabe zu keiner signifikanten Veränderung der prozentualen Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen kommt. Additive MSC scheinen weder die allgemein angenommene immunsuppressive Wirkung zu induzieren, noch scheint dadurch die bisher gezeigte verstärkende Wirkung in Anwesenheit von CpG-ODN M362 signifikant erhöht zu werden. Aus den Ergebnissen

lässt sich schließen, dass MSC in vorliegenden Kulturbedingungen entweder formverändert für längere Zeit vorhanden sind oder sie ihre modulatorischen Eigenschaften nur zu Beginn der Kultur ausüben.

Bei der Suche nach Gründen für das visuelle Verschwinden der MSC, scheint eine Lyse der MSC durch mehrere anwesende Zellenpopulationen denkbar. Wie Spaggiari et al. berichteten, sind aktivierte NK-Zellen in der Lage, eine Induktion des Zelltodes allogener und autologer MSC während einer Co-Kultur *in vitro* hervorzurufen (Spaggiari et al. 2006). Zu einer dafür notwendigen Aktivierung der NK-Zellen kann die Exposition mit IL-15 und IL-2 führen. Letzteres Interleukin wurde für eine optimale T-Zellaktivierung in einer Konzentration von 10 U/ml in sämtlichen Kulturen ergänzt. Sind NK-Zellen nicht aktiviert, werden sie jedoch von MSC über IDO und PGE2 inhibiert, sodass es letztlich auf die Umgebungsfaktoren ankommt, ob es zu einer Lyse der MSC kommt oder nicht (Spaggiari et al. 2006; Spaggiari et al. 2008).

Eine weitere Zellgruppe, die die Fähigkeit besitzt, eine Lyse insbesondere bei allogenen Zellpopulationen zu induzieren, sind CTL. Morandi et al. demonstrierten, dass sich Peptid gepulste MSC der Lyse durch CTL bei geringen CTL-MSK Verhältnissen noch entziehen können, bei einem Verhältnis von 10:1 jedoch lysiert werden (Morandi et al. 2009). Die PBMC-MSK Verhältnisse in den im Zuge dieses Projektes durchgeführten Co-Kulturen mit 1% MSC machen eine potenzielle Lyse durch CTL möglich.

Demgegenüber stellten Lombardo et al. dar, dass humane MSC aus Adipozyten in Kultur mit einem TLR-Liganden der Gruppen 2, 3 (Poly I:C), 4 (LPS) und 9 (CPG-ODN) ein besseres Überleben in Entzündungsbedingungen zeigen (Lombardo et al. 2009). Die TLR-Aktivierung induziert u.a. die Produktion von manganese superoxid dismutase, welches das Überleben der MSC verbessern soll (Lombardo et al. 2009).

Dass sie sich aufgrund des Mediumwechsels von DMEM, low Glucose + 10% HPL in der MSC-Kultur zu RPMI 1640 + 10 % inaktiviertem AB Serum während der Co-Kultur abgelöst oder ihre Eigenschaften verändern haben, ist möglich, erscheint aber nicht wahrscheinlich, da Bieback et al. außer einer langsameren Proliferationsrate keine wesentlichen Nachteile einer Co-Kultur mit AB-Serum im Vergleich mit einer HPL-Co-Kultur demonstrierten (Bieback et al. 2009).

Das Schicksal der MSC während einer Kultur über 10 Tage kann nicht eindeutig geklärt werden, scheint aber nach vorliegenden Ergebnissen keinen entscheidenden Faktor in der Modulation der T-Zell-Antwort auszumachen.

4.3 Die Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung ist abhängig von der MSC-Konzentration

Da MSC in der Lage sind ihren Einfluss über Zell-Zell-Kontakte und lösliche Faktoren auszuüben, könnte das Verhältnis von MSC zu den umgebenden Zellen von Bedeutung sein. Cuerquis et al. und Di Nicola et al. demonstrierten, dass eine Verschiebung des Verhältnisses zugunsten der MSC ihr immunsuppressives Potenzial verstärkt und die vorliegenden Ergebnisse können diese These festigen (Cuerquis et al. 2014; Nicola et al. 2002).

In Bedingungen, in denen CpG-ODN M362 anwesend ist, kommt es bei MSC-PBMC Verhältnissen von 1:1000 und 1:100 durch Hinzugabe von MSC noch zu einer Erhöhung des Anteils CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen (Abbildung 12). Sind bei Werten von 1:10 jedoch verhältnismäßig mehr MSC vorhanden, ist ein inhomogener bis hemmender Effekt ersichtlich, welcher sich laut einer Studie von Di Nicola et al. bei MSC-PBMC Verhältnissen von 1:1 oder 5:1 als deutlich hemmend darstellen würde (Nicola et al. 2002).

Es macht den Anschein, als wären für eine suffiziente Erniedrigung des Anteils CMV-spezifischer T-Zellen unter CpG-ODN M362 Bedingungen höhere MSC-PBMC Verhältnisse notwendig und damit einhergehend mehr Zell-Zell-Kontakte und lösliche, parakrine Faktoren.

Ein weiterer Grund könnte im längeren Überleben der MSC während der Co-Kulturen mit 10 % MSC zu sehen sein. Wie zuvor beschrieben, könnten größere Mengen MSC in der Lage sein, sich der Lyse durch CTL zu entziehen, ihnen bliebe somit eine längere Zeit der Modulation (Morandi et al. 2009).

Für den klinischen Einsatz von MSC stellt dies eine wichtige Aussage dar, denn es demonstriert, dass eine ausreichend hohe Menge von MSC infundiert werden sollte, um den gewünschten Effekt der Immunsuppression zu erzielen. In klinischen Studien der

Behandlung der aGvHD wird keine einheitliche Menge der MSC verabreicht, sondern variiert, auch in Abhängigkeit des Schweregrades der Erkrankung, zwischen $0,5 \times 10^6$ und $7,7 \times 10^6$ Zellen/kg Körpergewicht (KG) pro Infusion (Kuçi et al. 2016; Introna et al. 2014).

4.4 MSC-PBMC Interaktion ist von Bedeutung für die MSC-modulierte Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen

Trotz des schon vorhandenen Einsatzes von MSC insbesondere bei der Therapie von aGVHD, deuten klinische Studien darauf hin, dass es immer wieder zu Spender-Empfänger-Konstellationen kommt, bei denen die Therapie nicht den gewünschten Erfolg erzielt (Martin et al. 2010; Galipeau 2013).

Diese vorhandene Heterogenität ist in Abbildung 13 dargestellt. Es zeigt sich, dass einzelne MSC-Linien verschiedene Auswirkungen der Immunmodulation innerhalb einer Co-Kultur mit PBMC erzielen können. Einige MSC-Linien wirken immunsuppressiv, andere pro-inflammatorisch. Diese Beobachtungen können zum Teil auf verschiedene Kulturbedingungen der MSC, wie Passagezahl, Kultivierungsdauer oder Zellkonfluenz zurückzuführen sein. So konnten Li et al. eine Abnahme immunsuppressiver Eigenschaften auf die T-Zellaktivierung von MSC höherer Passagen beobachten (Li et al. 2012). Weiterhin scheint das Erreichen einer Zellkonfluenz von mehr als 80-90 % zu einer Veränderung der Proteinexpression und Oberflächenmarker zu führen (Ren et al. 2015).

Meisel et al. demonstrierten, dass auch Infektionen des MSC-Spenders zu einer Änderung der MSC-Eigenschaften führen können, denn sie machten deutlich, dass CMV-Infektionen der MSC *in vitro* zu einer Verringerung derIDO-Expression und damit zu einem Verlust der immunsuppressiven Eigenschaften kommen kann (Meisel et al. 2014). Da die Seroprävalenz bei einer Erhebung von 24.260 freiwilligen Blutspendern in Gießen 1992-2002 bei 46 % lag (www.RKI.de vom 17.07.2017), ist die Möglichkeit von seropositiven MSC-Spendern durchaus gegeben. All diese Gründe könnten Erklärungen heterogener Einflüsse verschiedener MSC-Linien sein.

Es ist jedoch in Abbildung 13 zu erkennen, dass sogar dieselbe MSC-Linie, die mit derselben Passagezahl und unter identischen Bedingungen zeitgleich co-kultiviert wurde, verschiedenen Einfluss auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen in Abhängigkeit des PBMC-Spenders haben kann und geht somit einher mit den Beobachtungen von Cuerquis et al. (Cuerquis et al. 2014). Dementsprechend liegt es nahe, dass nicht eine MSC-Linie per se eine bestimmte Immunmodulation fördert, sondern vielmehr die Konstellation aus MSC- und PBMC-Spender sowie den daraus resultierenden individuellen Zell-Zell-Kontakten und Zytokinzusammensetzungen den Ausschlag über die Art der Modulation zu geben scheint. Wie vielfach publiziert, könnte dabei die Konzentration der pro-inflammatorischen Zytokine IFN- γ und TNF- α von Bedeutung sein, die wiederum in hoher Konzentration über PD-1 und IDO eine Hemmung der Proliferation von T-Zellen verstärken. Cuerquis et al. beobachteten in PBMC Co-Kulturen ohne MSC nach 5 Tagen ein unterschiedliches Zytokinmilieu in Bezug auf beispielweise IFN- γ und IL-2, sodass allein diese interindividuelle Diskrepanz der PBMC-Spender Einfluss auf die MSC Wirkung haben kann (Cuerquis et al. 2014). Das von MSC, PBMC und deren Interaktion erzeugte Zytokinmilieu scheint neben den Kulturbedingungen einen wichtigen Faktor in der Reproduzierbarkeit des Einflusses von allogenen MSC auszumachen.

4.5 Einfluss des Entfernens einzelner APC-Subpopulationen auf die MSC-modulierte Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen

Das Entfernen einzelner Populationen der antigenpräsentierenden Zellen führte in Abhängigkeit der Anwesenheit von MSC zu unterschiedlichen Ergebnissen. Die CD14/19⁺ APC (im peripheren Blut hauptsächlich Monozyten und B-Zellen) scheinen beim Fehlen von MSC die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen am ehesten zu fördern. In Anwesenheit von MSC scheint allerdings die Population der DC bei der Aktivierung CD8⁺ T-Zellen die bedeutendste Rolle zu spielen. Die Ergebnisse gehen mit der allgemeinen Literaturmeinung einher, wonach sowohl Monozyten und B-Zellen als auch DC in der Lage sind, Antigene zu präsentieren und kreuz-zu-präsentieren (Jongbloed et al. 2010; Haniffa et al. 2012; Jiang et al. 2017; Larson et al. 2016).

Abbildung 14 stellt als Folge der Entnahme von DC eine signifikante Hemmung bei MSC-Anwesenheit in Bedingungen ohne Stimulation oder mit R848-Stimulation dar. Diese Wirkung ist durch Zugabe von CpG-ODN M362 nicht erzielt worden. Folglich scheint CpG-ODN M362 entweder die CD14/19 pos. Zellen als verbleibende APC zu stimulieren oder die MSC in ihrer pro-inflammatorischen Wirkweise zu fördern.

Im Gegensatz zu Monozyten exprimieren B-Zellen ausreichende Mengen TLR 9 und können darüber auch aktiviert werden (Simchoni et al. 2015; Jarrossay et al. 2001; Hornung et al. 2002). So scheint sich die TLR 9 Aktivierung der B-Zellen dem hemmenden MSC-Einfluss entgegenzuwirken.

In der Population der DC besitzen zwar pDC die Eigenschaft einer hohen TLR 9 Expression, mDC1 oder mDC2 mangelt es jedoch an diesem Rezeptor (Hemont et al. 2013). Dies könnte ein Grund dafür sein, dass die Stimulation mit CpG-ODN M362 keine wesentliche Veränderung der Aktivierung CD8⁺ T-Zellen zeigt, wenn DC anwesend sind.

Unstimuliert und nach Ergänzung des TLR 7/8 Liganden R848 setzt eine Verminderung des Anteils IFN- γ pos. CMV-spez. CD8⁺ T-Zellen durch Entnahme der DC-Fraktion ein. Da es nach Hinzugabe von CpG-ODN M362 nicht dazu kommt, scheint die Art der Stimulation entscheidend für die nach DC-Entnahme verbleibenden APC, also Monozyten und B-Zellen, zu sein.

Obwohl eine TLR 7/8 Stimulation sowohl in Monozyten die Herstellung von Zytokinen als auch in B-Zellen die Differenzierung in Plasmazellen und Antikörperproduktion anregt, ist im Vergleich zur unstimulierten Gruppe kein wesentlicher Unterschied ersichtlich (Simchoni et al. 2015; Cros et al. 2010). MSC scheinen bei R848-Stimulation unerheblichen Einfluss zu haben. Ähnliche Verhältnisse im Vergleich der Gruppen mit und ohne Anwesenheit von MSC lassen dies vermuten und dies ist durch den Mangel an TLR 7/8 Rezeptoren bei MSC erklärlich (Tomchuck et al. 2008). Zudem konnten Liotta et al. bei MSC in Co-Kultur mit PBMC und CD4⁺ T-Zellen keinen Effekt durch die Stimulation mit R848 bei der Proliferation der T-Zellen darstellen (Liotta et al. 2008).

Die Gruppen in denen nur DC als APC anwesend sind, erfahren durch das Hinzufügen von R848 eine leichte Erhöhung der Werte. Die mDC-Subpopulationen, speziell die der mDC1, die über TLR 8 eine bedeutende Aktivierung erfahren, könnten einen Grund darstellen. Nach Kontakt mit R848 erhöhen sie die Menge von Kostimulator-molekülen

und verschiedensten pro-inflammatorischen Zytokinen (Hemont et al. 2013). IL-12p40, TNF- α und IL-1 β sind u.a. als Beispiele zu nennen (Hemont et al. 2013). mDC2 scheinen, obwohl sie TLR 8 exprimieren, durch TLR 8 Bindung im Vergleich zu den mDC1 nicht wesentlich in der Produktion von Zytokinen stimuliert zu werden (Hemont et al. 2013). Über die Aktivierung haben mDC1 die Möglichkeit einer besseren Antigenpräsentation und Steigerung der Aktivierung von T-Zellen. Dies trifft auch auf pDC zu, die über ihren in hohem Maße exprimierten TLR 7 in der Produktion von u.a. IFN- α und TNF- α stimuliert werden. Trotz allem ist der Effekt von R848 als Aktivierungsfaktor nicht von wesentlicher Bedeutung.

Eine definitive Aussage über die Aktivierung CMV-spezifischer CD4⁺-T-Zellen ist aufgrund geringer prozentualer Werte nur schwer zu treffen. Es deutet allerdings darauf hin, dass B-Zellen und Monozyten am ehesten für eine Aktivierung der CD4⁺ T-Zellen verantwortlich sind. Nur bei R848 Stimulation sind die B-Zellen und Monozyten den DC in der suffizienten Aktivierung unterlegen. Dabei scheint es im Vergleich der Verhältnisse in Abhängigkeit der MSC-Anwesenheit außer einer allgemeinen Erhöhung des Anteils aktivierter CMV-spezifischer T-Zellen keine weiteren Unterschiede durch Entnahme einzelner APC-Populationen zu geben. Dies lässt vermuten, dass MSC keine der APC-Subpopulationen bevorzugt beeinflusst.

4.6 Poly I:C vermindert den nennenswerten Einfluss von mDC2 auf die MSC-modulierte Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen

Um zu erörtern, welche Population der DC sich hauptverantwortlich für die Beeinflussung der MSC Modulation zeigt, wurden einzelne Subpopulationen entfernt (Abbildung 15).

In Abwesenheit von MSC führt die jeweilige Entnahme der mDC1, mDC2 oder pDC-Subpopulation zu einem vergleichsweise ähnlichen Abfall des Anteils IFN- γ positiver CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen. Dies geht überein mit den Ergebnissen mehrerer Arbeitsgruppen, die ähnlich potente Fähigkeiten der DC-Subpopulationen in der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen demonstrierten (Loré et al. 2003; Fonteneau et al. 2003).

In Anwesenheit von MSC zeigt sich in der vorliegenden Arbeit eine deutlich signifikante Verminderung des Anteils aktivierter CD8⁺ T-Zellen durch Entnahme der mDC2 Population. Auf die Populationen der pDC und mDC1 ist diese Erkenntnis nicht zu übertragen. mDC2 scheinen also einen Einfluss auf die Modulation von MSC zu haben, indem sie entweder die pro-inflammatorischen Effekte der MSC unterstützen oder ihre anti-inflammatorische Wirkung hemmen. Jongbloed et al. zeigten, dass mDC2 unter ähnlichen Bedingungen wie in der vorliegenden Arbeit eine Hauptrolle bei der Aktivierung CD8⁺ T-Zellen einnehmen (Jongbloed et al. 2010). Unterschiedliche Eigenschaften der mDC2 im Vergleich zu den anderen DC-Populationen könnten hier ausschlaggebend für den Einfluss auf die MSC Wirkung zu sein. Beispielsweise besitzen CD141⁺ Zellen als einzige DC eine hohe Expression des Rezeptors Clec9a (Caminschi et al. 2008). Durch Clec9a werden Antigene von nekrotischen Zellen kreuzpräsentiert, ohne dass mDC2 dadurch eine Aktivierung erfahren (Zelenay et al. 2012). Ein weiterer, nur von mDC2 exprimierter, Rezeptor ist XCR1, dessen Ligand XCR1L von aktivierten CD8⁺ T-Zellen, Th1-Zellen und NK-Zellen produziert wird (Bachem et al. 2010). Er unterstützt u.a. das Überleben und die Funktionen von CD8⁺ T-Zellen, wodurch sie speziell für mehrtägige Kulturen von Bedeutung sein könnten (Dorner et al. 2009). Sowohl CLEC9a als auch XCR1 begünstigen neben TLR 3 eine optimale Aktivierung von CTL und befähigt mDC2 zu einer starken Aktivierung CD8⁺ T-Zellen.

Weiterhin konnte in der Literatur beobachtet werden, dass aus humanem Blut gewonnene mDC vermehrt IFN- λ nach Kontakt mit verschiedenen Viren oder einem TLR 3-Liganden produzieren (Lauterbach et al. 2010; Yoshio et al. 2013). Yoshio et al. konnte dahingehend eine Überlegenheit der mDC2 Fraktion gegenüber pDC und mDC1 nach Kontakt mit dem Hepatitis-C-Virus (HCV) darstellen (Yoshio et al. 2013). Neben dem zur Gruppe der RNA-Viren gehörenden HCV scheinen auch DNA-Viren, der Gruppe gehören beispielsweise CMV und HSV an, eine IFN- λ Produktion in DC einleiten zu können, sodass der Rückgang dieses Zytokins nach Entnahme der mDC2 Fraktion ein Grund für die Veränderung der Aktivierung von CD8⁺ T-Zellen sein könnte (Lauterbach et al. 2010). IFN- α werden ähnliche Eigenschaften wie IFN- λ zugeschrieben, doch die Entnahme von pDC als Hauptproduzenten von IFN- α insbesondere nach Viruskontakt, scheint die Modulation der Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen durch MSC nicht eindeutig zu beeinflussen. Konträre Studien postulieren, dass pDC mindestens

gleichwertig in der Produktion von IFN- λ zu sein scheinen (Yin et al. 2012). Grund für die unterschiedlichen Daten könnten neben verschiedenen Kulturbedingungen auch die Nutzung unterschiedlicher Virus-Familien sein, durch welche die folgende Aktivierung und Zytokinproduktion variiert (Yoshio et al. 2013; Yin et al. 2012). Welchen immunmodulatorischen Effekt IFN- λ auf MSC ausübt, wurde in Studien bisher nicht gezeigt, sollte jedoch Gegenstand weiterer Forschung sein.

mDC2 scheinen somit in Anwesenheit von MSC deren Inhibition zu vermindern, sodass sie folglich stimulierend auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen wirken. Einen starken Einfluss der mDC2 auf immunologische Vorgänge wurde bisher meist nur durch TLR 3 Stimulation gezeigt. Vorliegende Ergebnisse könnten ein Hinweis für einen bedeutenden Einfluss selbst ohne diese Art der Aktivierung darstellen.

Fügt man nun noch den TLR 3 Liganden Poly I:C hinzu, konnte die hemmende MSC Wirkung weitestgehend aufgehoben werden, unabhängig davon, ob einzelne DC-Subpopulationen entnommen wurden (Abbildung 16). Verantwortlich für diese Veränderung ist die TLR 3 Stimulation mit Poly I:C, sodass sämtliche TLR 3 tragenden Zellen für diese Veränderung in Frage kommen. Als die DC-Population mit der höchsten TLR 3 Expression stellen sich laut Studien die mDC2 dar. Folglich zeigt sich bei Entnahme von mDC2 die geringste Erholung des Anteils IFN- γ positiver CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen durch Zugabe von Poly I:C in Anwesenheit von MSC im Vergleich zur Entnahme anderer DC-Subpopulationen (Hemont et al. 2013). Durch Stimulation mit Poly I:C kommt es nach Hemont et al. zu einer starken Erhöhung der Expression der Kostimulator-moleküle CD80 und CD86 auf mDC2 sowie zu einer erhöhten Freisetzung von u.a. IFN- β , TNF- α , IL-12 und IFN- λ sind (Lauterbach et al. 2010; Hemont et al. 2013). Diese Faktoren begünstigen die Aktivierung von T-Zellen. Obgleich mDC2 die stärkste Reaktion auf TLR 3 Stimulation zeigen, führt die Bindung von Poly I:C über TLR 3 bei mDC1 zu ähnlichen Erhöhungen von Molekülen, nur in geringerem Maße (Hemont et al. 2013). Dies könnte ein Grund für den Poly I:C Effekt auch in Abwesenheit von mDC2 darstellen. pDC besitzen kein TLR 3 (Hemont et al. 2013).

MSC sind ebenfalls in der Lage, durch TLR 3 aktiviert zu werden (Raicevic et al. 2010). Neben den Beobachtungen, dass Poly I:C das Überleben der MSC verlängert und bei Kulturen über 10 Tage von Bedeutung ist, bestehen in der Literatur über die immunmodulatorischen Konsequenzen aus dieser Aktivierung kontroverse Meinungen (Liotta et al. 2008; Raicevic et al. 2010; Waterman et al. 2010). Waterman et al. beispielsweise stellten Daten vor, in denen eine TLR 3 Aktivierung zu einem anti-inflammatorischen MSC Typ führt, während der TLR 4 Kontakt eine Aktivierung mit pro-inflammatorischen Eigenschaften zur Folge hat (Waterman et al. 2010). Diese Schlüsse konnte er ebenfalls aus Co-Kulturen über 72h mit allogenen PBMC-Spendern ziehen, bei denen es durch Poly I:C Hinzugabe zu einer deutlichen Verminderung der T-Zell-Proliferation kommt (Waterman et al. 2010). Die vorliegende Arbeit offenbart demgegenüber eine eher pro-inflammatorische Wirkung durch Ergänzung von Poly I:C mit Erhöhung des Anteils aktivierter CMV-spez. CD8+ T-Zellen. Eine längere Gesamtkultivierungsdauer, sowie das Vorhandensein von CMV-Peptid mit PBMC eines CMV-positiven Spenders sind Faktoren, die die unterschiedlichen Ergebnisse erklären könnten. Übereinstimmend mit den hier beschriebenen Beobachtungen, stellten Liotta et al. fest, dass der hemmende Effekt auf die Proliferation von T-Zellen in Co-Kultur mit allogenen MSC durch die Hinzugabe von Poly I:C vermindert bzw. aufgehoben wird (Liotta et al. 2008).

Dabei ist es nicht zwingend notwendig, dass MSC selbst durch die Aktivierung mit TLR 3 pro-inflammatorische Einflüsse ausüben. Es ist außerdem denkbar, dass u.a. die starke Aktivierung der myeloiden dendritischen Zellen oder weiterer APC die Wirkung der in relativ geringer Konzentration vorhandenen MSC (MSC-PBMC 1:100) übersteigt und der Einfluss der MSC somit marginal wird. Auch in diesem Fall zeigten Liotta et. Al (Liotta et al. 2008), dass die Anwesenheit von Poly I:C bei MSC-PBMC Verhältnissen von 1:10 und 1:5 ebenfalls zu einer Verminderung des hemmenden MSC-Einflusses führt.

4.7 Ausblick

Durch die Beobachtungen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass es unter bestimmten Umständen zu einer Erhöhung des Anteils aktivierter CMV-spezifischer T-Zellen kommen kann. Insbesondere CpG-ODN M362 scheint dabei eine entscheidende Rolle zu spielen. Eine durchgehend immunsuppressive Wirkung von MSC konnte nicht beobachtet werden. Die bisher äußerst heterogene Literaturmeinung in Bezug auf ihre immunregulatorische Wirkung lässt sich auch in der vorliegenden Arbeit nachvollziehen und demonstriert ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Faktoren von MSC und den weiteren anwesenden Zellen. Da die Kulturbedingungen der MSC einen häufig diskutierten Einflussfaktor darstellen, müssen diese zunächst standardisiert werden, um nachfolgende Co-Kulturen vergleichend betrachten zu können.

Ein wichtiger Faktor in der Immunmodulation der MSC stellt sicherlich die Frage der Aktivierung der MSC in Abhängigkeit der anwesenden PAMP dar, die den Einfluss auf die T-Zellantwort zu regulieren scheint. Die auf diese Aktivierung produzierten Zytokine sollten unter verschiedenen Bedingungen analysiert werden, da vieles von der Art der PAMP und den Kulturbedingungen abzuhängen scheint. Auch die Bedingungen, unter denen MSC selbst als APC wirken können, scheinen von essentieller Bedeutung.

Die Arbeit konnte der kleinen Population der mDC2 eine wichtige Aufgabe in der Regulation der MSC nachweisen. Es bedarf somit eines genaueren Blickes, welche Funktion mDC2 in dem Zusammenspiel zwischen MSC und Effektorzellen zukommt.

Es sollte als besonderes Anliegen verstanden werden, eine Kompatibilität von Spender-MSK in Interaktion mit einem potenziellen Empfänger zu erreichen, sodass erwünschte Therapiewirkung sich tatsächlich einstellt. Dazu ist es insbesondere notwendig, mehr über die MSC an sich sowie die Gründe ihrer Heterogenität zu erforschen.

5 Zusammenfassung

Mesenchymale Stromazellen (MSC) werden aufgrund ihrer Immunmodulations- und Differenzierungsfähigkeit in einer Vielzahl von Studien erforscht und bieten klinisch eine Therapieoption der steroidrefraktären akuten Transplantatabstoßung (aGVHD) (Wolff et al. 2013).

Derweil wurden vermehrt heterogene Ergebnisse in der Art der Beeinflussung des Immunsystems durch MSC *in vitro* sowie *in vivo* publiziert. Hierzu diskutierte Gründe stützen sich auf die Varianz von Kulturbedingungen, Zytokinmilieus und Aktivierungszuständen anwesender Zellen.

Die vorliegende Arbeit liefert neue Erkenntnisse über die Modulation der Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen durch MSC in Anwesenheit professioneller antigenpräsentierender Zellen und Toll-Like Rezeptor-Liganden. So war es möglich, eine Erhöhung des Anteils aktivierter CMV-spezifischer T-Zellen in Anwesenheit des TLR 9 Liganden CpG-ODN M362 durch MSC nachzuweisen. Dabei gelang eine nennenswerte Aktivierung der CD8⁺ T-Zell-Subpopulation, insbesondere in Co-Kultur mit allogenen PBMC. CpG-ODN M362 zeigte sich dabei als ausschlaggebender Faktor, ohne den selbst keine überwiegend pro-inflammatorische Modulation demonstriert werden konnte.

Durch Erhöhung des MSC Anteils in PBMC-MSC Co-Kulturen von 100:1 auf 10:1 stellte sich trotz des Vorhandenseins von CpG-ODN M362 ein hemmender Effekt auf die Aktivierung CMV-spezifischer T-Zellen ein. MSC scheinen somit in größeren Mengen eher anti-inflammatorisch zu wirken.

Als bedeutend für den Einfluss der MSC zeigte sich eine kleine Population der DC, die mDC2. Sie scheinen einer möglichen Hemmung der Aktivierung CMV-spezifischer CD8⁺ T-Zellen entgegenzuwirken, insofern als diese MSC-Fähigkeit durch die Abwesenheit der mDC2 gestärkt wird. Einen vergleichbaren Effekt wie die Entnahme der mDC2 wurde durch die Zugabe des TLR 3 Liganden Poly I:C hervorgerufen, dessen Hinzugabe eine hemmende MSC-Wirkung nahezu aufhebt.

Des Weiteren wurde in der vorliegenden Arbeit abgebildet, dass eine MSC-Linie das Immunsystem nicht per se in eine bestimmte Richtung beeinflusst, die Richtung vielmehr abhängt von der Konstellation mit weiteren anwesenden Zellpopulationen.

Zusammenfassend demonstriert diese Arbeit einen pro-inflammatorischen Einfluss von MSC auf die Aktivierung CMV-spez. T-Zellen in Anwesenheit von CpG-ODN M362. Die Interaktion mit TLR-Liganden sowie weiteren Zellpopulationen erscheint für die Richtung als auch Stärke der MSC-Modulation von ausschlaggebender Bedeutung (Collin & McGovern 2013).

6 Summary

Because of their abilities in tissue renewal and immunomodulation mesenchymal stromal cells are an important subject of research in a wide range of studies. Their immunomodulatory properties enable them to act as a therapeutic option in the treatment of steroid-refractory acute Graft versus host disease (Wolff et al. 2013).

However, there are conflicting results regarding the way of affecting the immune system in vitro and in vivo. Differences in culture conditions, cytokine milieu and the state of activation of surrounding cells are discussed as possible reasons.

This research provides new insights in the modulation of the activation of CMV-specific T cells by MSC in the presence of professional antigen-presenting cells and Toll-like receptors.

It is shown that the addition of MSC in conditions with the TLR 9 agonist CpG-ODN M362 leads to an increased proportion of activated CMV-specific T cells.

A strong activation of CD8⁺ T cell can be observed especially in co-cultures with PBMC. CpG-ODN M362 can be considered to make the difference because without TLR 9 stimulation, no predominant pro-inflammatory response is found.

By increasing the amount of MSC in PBMC-MSc co-cultures from a ratio of 100:1 to 10:1, it can be observed that although CpG-ODN M362 is present, MSC inhibit the activation of CMV-specific T cells. It appears that MSC in higher amounts act rather anti-inflammatory.

A small subpopulation of dendritic cells, mDC2, is shown to play a major role in the inflammatory response of MSC. The results demonstrate the counteraction of a possible inhibition by MSC on the activation of CMV-specific T cells. Similar effects in nearly neutralizing the anti-inflammatory influence of MSC are achieved by adding TLR 3 agonist Poly I:C to the co-culture.

Furthermore the results indicate that the effect of a MSC line on the immune system differs depending on the interaction with the present cells.

In conclusion this research demonstrates the possibility of pro-inflammatory effects by MSC on the activation of CMV-specific T cells in the presence of CpG-ODN M362. The interaction with other cell populations and TLR agonists is revealed to play an essential role and should be noticed in the immunomodulation of MSC (Collin & McGovern 2013).

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
α	Alpha
β	Beta
γ	Gamma
λ	Lambda
μ	Mikro (10^{-6})
aGVHD	Acute graft-versus-host disease
APC	Antigenpräsentierende Zelle (engl. antigen presenting cell)
APC	Allophycocyanin
APC-Cy7	Allophycocyanin konjugiert mit Cyanin 7
c	Centi (10^{-2})
CCR	C-C-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CCL	C-C-Motiv-Chemokin-Ligand
CD	Cluster of Differentiation
cDC	Klassische dendritische Zelle (engl. classical dendritic cell)
CDP	Common DC progenitor cell
CLEC9a	C-type lectin 9A
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG-ODN	Cytosin-Phosphat-Guanin-Oligodesoxynukleotid
COPD	Chronisch obstruktive Lungenerkrankung (engl. chronic obstructive pulmonary disease)
CTL	Zytotoxische T-Zelle (engl. cytotoxic t-lymphocyte)
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DC	Dendritische Zelle (engl. dendritic cell)
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
FACS	Fluorescence-activated cell sorting
FITC	Fluorescein isothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FoxP3	Forkhead box protein 3

Abkürzungsverzeichnis

FSC	Forwardscatter
g	Gravitationskonstante
g	Gramm
h	Stunde
HCV	Hepatitis-C-Virus
HLA	Humanes Leukozytenantigen
HPL	Humanes Plättchenlysate
HSV	Herpes-Simplex-Virus
IFN	Interferon
IL	Interleukin
l	Liter
Lin	Lineage
k	Kilo (10^3)
LPS	Lipopolysaccharid
m	Milli (10^{-3})
m	Meter
M	Mol
mDC	Myeloide dendritische Zelle (engl. myeloid dendritic cell)
MDP	Macrophage/DC progenitor cell
MHC	Major histocompatibility complex
min	Minute
MSC	Mesenchymale Stromazelle (engl. mesenchymal stromal cell)
NEAA	Nicht essentielle Aminosäuren
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern
PBMC	Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes (peripheral blood mononuclear cell)
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung (engl. phosphate buffered saline)
PGE2	Prostaglandin E2
PD	Programmed cell death protein
PD-L	Programmed cell death protein ligand
pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle (engl. plasmacytoid dendritic cell)
PE	R-phycoerythrin
PerCP/Cy5.5	Peridinin-chlorophyll proteins konjugiert mit Cyanin 5.5

Abkürzungsverzeichnis

Poly I:C	Polyinosinic-polycytidylic acid
PRR	Pattern recognition receptors
P/S	Penicillin/Streptomycin
R848	Resiquimod
RPM	Umdrehungen pro Minute (engl. revolutions per minute)
RS-Virus	Respiratory-Syncytial-Virus
SSC	Sidescatter
SEM	Standardfehler des Mittelwertes (engl. standard error of the mean)
TCR	T-Zell-Rezeptor (engl. T cell receptor)
TGF	Transforming growth factor
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TLR	Toll-Like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{Reg}	T-Regulatorzelle

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Labormaterialien.....	21
Tabelle 2	Chemikalien.....	22
Tabelle 3	Antikörper.....	23
Tabelle 4	Stimulationsreagenzien.....	24
Tabelle 5	Kits.....	24
Tabelle 6	Zellkulturmedien und Pufferlösungen.....	24
Tabelle 7	Geräte.....	25
Tabelle 8	Software.....	26

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Mesenchymale Stromazellen.....	2
Abbildung 2	Aktivierung der DC-Subpopulationen über TLR.....	8
Abbildung 3	Aktivierung CD8 ⁺ T-Zellen mittels Interaktion mit DC und T _H Zell Unterstützung.....	12
Abbildung 4	Immunsuppressiver Einfluss von MSC auf das adaptive Immunsystem.....	16
Abbildung 5	Kultur mesenchymaler Stromazellen.....	27
Abbildung 6	Durchflusszytometrische Reinheitskontrolle der negativ selektierten pDC im Dot-Plot.....	31
Abbildung 7	Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Anwesenheit von MSC, pDC und CpG-ODN M362.....	41
Abbildung 8	Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Anwesenheit von MSC, PBMC und CpG-ODN M362.....	42
Abbildung 9	Durchflusszytometrische Darstellung der CMV-spezifischen T- Zellaktivierung in Anwesenheit von MSC, PBMC und CpG-ODN M362.....	43
Abbildung 10	Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Anwesenheit von MSC, PBMC und LPS bzw. CpG-ODN 2216.....	44
Abbildung 11	Beeinflussung der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung durch zweimalige MSC Gabe in Anwesenheit von PBMC und verschiedenen TLR Agonisten.....	45

Abbildung 12	Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung in Abhängigkeit der MSC-Konzentration in Anwesenheit von PBMC und CpG-ODN M362	46
Abbildung 13	Die spenderindividuelle Modulation von MSC auf die CMV-spezifische T-Zellaktivierung in Anwesenheit von PBMC und CpG-ODN M362	48
Abbildung 14	Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung von MSC in Abwesenheit von DC bzw. CD14/19 pos. Zellen	49
Abbildung 15	Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung von MSC in Abwesenheit von einzelnen DC-Subpopulationen	51
Abbildung 16	Der Einfluss von Poly I:C auf die Modulation der CMV-spezifischen T-Zellaktivierung von MSC in Abwesenheit von einzelnen DC-Subpopulationen	52

Literaturverzeichnis

- Abbas, A.K., Murphy, K.M. & Sher, A., 1996. Functional diversity of helper T lymphocytes. *Nature*, 383, pp.787–793.
- Aggarwal, S. & Pittenger, M.F., 2005. Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*, 105(4), pp.1815–1823.
- Auffray, C. et al., 2009. CX₃CR1⁺CD115⁺CD135⁺ common macrophage/DC precursors and the role of CX₃CR1 in their response to inflammation. *The Journal of Experimental Medicine*, 206(3), pp.595–606. Available at: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20081385>.
- Augello, A. et al., 2005. Immunomodulation Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *European Journal of Immunology*, 35, pp.1482–1490.
- Bachem, A. et al., 2010. Superior antigen cross-presentation and XCR1 expression define human CD11c⁺CD141⁺ cells as homologues of mouse CD8⁺ dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(6), pp.1273–1281. Available at: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20100348>.
- Bartholomew, A. et al., 2002. Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental Hematology*, 30, pp.42–48.
- Bassi, Ê.J. et al., 2012. Immune regulatory properties of allogeneic adipose-derived mesenchymal stem cells in the treatment of experimental autoimmune diabetes. *Diabetes*, 61(10), pp.2534–2545.
- Bennett, S.R.M. et al., 1998. Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling. *Nature*, 393, pp.478–480.
- Beyth, S. et al., 2005. and induce T-cell unresponsiveness Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*, 105(5), pp.2214–2219.
- Bieback, K. et al., 2009. Human Alternatives to Fetal Bovine Serum for the Expansion of Mesenchymal Stromal Cells from Bone Marrow. *Stem Cells*, 27, pp.2331–2341.
- Biron, C.A., 1997. Activation and function of natural killer cell responses during viral infections. *Current Opinion in Immunology*, 9, pp.24–34.
- Blanc, K. Le et al., 2003. HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Experimental Hematology*, 31, pp.890–896.
- Blanc, K. Le, 2003. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. *Cytotherapy*, 5(6), pp.485–489. Available at: <http://dx.doi.org/10.1080/14653240310003611>.
- 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 (London, England)*, 371(9624), pp.1579–86. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18468541> [Accessed April 13, 2017].
- Le Blanc, K. & Davies, L.C., 2015. Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunology Letters*, 168, pp.140–146.
- Bouffi, C. et al., 2009. Multipotent mesenchymal stromal cells and rheumatoid arthritis: risk or benefit? *Rheumatology (Oxford, England)*, 48(June), pp.1185–1189.
- Böyum, A., 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand J Lab Invest Suppl*, 97,

- pp.77–89.
- Bright, J.J., Kerr, L.D. & Siriam, S., 1997. TGF-beta inhibits IL-2-induced tyrosine phosphorylation and activation of Jak-1 and Stat 5 in T lymphocytes. *The Journal of Immunology*, 159, pp.175–183.
- Brown, J.M. et al., 2011. Bone Marrow Stromal Cells Inhibit Mast Cell Function Via a COX2 Dependent Mechanism. *CLin Exp Allergy*, 41(4), pp.526–534.
- Caminschi, I. et al., 2008. The dendritic cell subtype-restricted C-type lectin Clec9A is a target for vaccine enhancement. *Blood*, 112(8), pp.3264–3274.
- Cao, W. et al., 2015. Mesenchymal stem cells and adaptive immune responses. *Immunology and cell biology*, 168, pp.147–153.
- Cao, W. et al., 2006. Plasmacytoid dendritic cell-specific receptor ILT7-FcεRIγ inhibits Toll-like receptor-induced interferon production. *The Journal of Experimental Medicine*, 203(6), pp.1399–1405. Available at: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20052454>.
- Caplan, A.I., 1991. Mesenchymal Stem Cells *. *Journal of Orthopaedic Research*, 9(5).
- Carrión, F. et al., 2011. Opposing effect of mesenchymal stem cells on Th1 and Th17 cell polarization according to the state of CD4 + T cell activation. *Immunology Letters*, 135, pp.10–16.
- 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. Available at: <http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=10426316&retmode=ref&cmd=prlinks%0Apapers2://publication/doi/10.1038/11360>.
- Chan, J.L. et al., 2006. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon- γ . *Blood*, 107(12), pp.4817–4825.
- Chehimi, J. et al., 1989. Dendritic cells and IFN-alpha-producing cells are two functionally distinct non-B, non-monocytic HLA-DR+ cell subsets in human peripheral blood. *Immunology*, 68(4), pp.486–90. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1385535&tool=pmcentrez&rendertype=abstract%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1385535/>.
- Chiesa, S. et al., 2011. Mesenchymal stem cells impair in vivo T-cell priming by dendritic cells. *PNAS*, 108(42), pp.17384–17389.
- Choi, J.S. et al., 2015. Effects of Donor Age , Long-Term Passage Culture , and Cryopreservation on Tonsil- Derived Mesenchymal Stem Cells. *Cellular Physiology and Biochemistry*, 739, pp.85–99.
- Choudhery, M.S. et al., 2013. Comparison of human mesenchymal stem cells derived from adipose and cord tissue. *Journal of Cytotherapy*, 15(3), pp.330–343. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.11.010>.
- Choudhery, M.S. et al., 2014. Donor age negatively impacts adipose tissue-derived mesenchymal stem cell expansion and differentiation. *Journal of Translational Medicine*, 12(8), pp.1–14.
- Christensen, J.R. et al., 2013. Systemic Inflammation in Progressive Multiple Sclerosis Involves Follicular T-Helper, Th17- and Activated B-Cells and Correlates with Progression. *PLoS ONE*, 8(3), pp.1–11.
- Collin, M. & McGovern, N., 2013. Human dendritic cell subsets. *Immunology*, 140, pp.22–30.
- Corcione, A. et al., 2006. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*, 107(1), pp.367–373.

- Cros, J. et al., 2010. Human CD14^{dim} Monocytes Patrol and Sense Nucleic Acids and Viruses via TLR7 and TLR8 Receptors. *Immunity*, 33(3), pp.375–386.
- Crozat, K. et al., 2010. Comparative genomics as a tool to reveal functional equivalences between human and mouse dendritic cell subsets. *Immunological Reviews*, 234(1), pp.177–198.
- Cuerquis, J., Romieu-mourez, R. & François, M., 2014. production by activated T cells before suppressing T-cell proliferation : effect of interferon- γ and tumor necrosis factor- α stimulation. *Journal of Cytotherapy*, 16(2), pp.191–202. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2013.11.008>.
- Das, G., Sheridan, S. & Janeway, C.A., 2001. The Source of Early IFN- γ That Plays a Role in Th1 Priming. *The Journal of Immunology*, 167, pp.2004–2010.
- Dasgupta, S. et al., 2014. Plasmacytoid dendritic cells mediate anti-inflammatory responses to a gut commensal molecule via both innate and adaptive mechanisms Suryasarathi. *Cell Host Microbe*, 15(4), pp.413–423.
- Diana, J. et al., 2009. NKT Cell-Plasmacytoid Dendritic Cell Cooperation via OX40 Controls Viral Infection in a Tissue-Specific Manner. *Immunity*, 30(2), pp.289–299.
- Diebold, S.S., Kaisho, T. & Hemmi, H., 2004. Innate Antiviral Responses by Means of TLR7-Mediated Recognition of Single-Stranded RNA. *Science*, 303(5663), pp.1529–1531. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.1093616>.
- Djouad, F. et al., 2003. Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood*, 102(10), pp.3837–3844.
- 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.
- Dominici, M. et al., 2005. Clarification of the nomenclature for MSC : The International Society for Cellular Therapy position statement Clarification of the nomenclature for MSC : The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 7(5), pp.393–395.
- 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.
- Dorner, B.G. et al., 2009. Article Selective Expression of the Chemokine Receptor XCR1 on Cross-presenting Dendritic Cells Determines Cooperation with CD8 + T Cells. *Immunity*, 31, pp.823–833.
- Dzionek, A. et al., 2001. BDCA-2, a Novel Plasmacytoid Dendritic Cell-specific Type II C-type Lectin, Mediates Antigen Capture and Is a Potent Inhibitor of Interferon α/β Induction. *The Journal of Experimental Medicine*, 194(12), pp.1823–1834. Available at: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.194.12.1823>.
- Dzionek, A. et al., 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three Markers for Distinct Subsets of Dendritic Cells in Human Peripheral Blood. *The Journal of Immunology*, 165(11), pp.6037–6046. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.165.11.6037>.
- English, K. et al., 2009. Cell contact , prostaglandin E 2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD 4 + CD 25 High forkhead box P 3 + regulatory T cells. *Clinical and Experimental Immunology*, 156, pp.149–160.
- English, K., Barry, F.P. & Mahon, B.P., 2008. Murine mesenchymal stem cells suppress dendritic cell migration, maturation and antigen presentation. *Immunology Letters*,

- 115(1), pp.50–58.
- Facchetti, F. et al., 2003. The plasmacytoid monocyte/interferon producing cells. *Virchows Archiv*, 443(6), pp.703–717.
- Fischer, U.M. et al., 2009. Pulmonary passage is a major obstacle for intravenous stem cell delivery: the pulmonary first-pass effect. *Stem cells and development*, 18(5), pp.683–692.
- Fogg, D. et al., 2006. A Clonogenic Bone Marrow Progenitor Specific for Macrophages and Dendritic Cells. *Science*, 311(March), pp.83–88.
- Fonteneau, J.-F. et al., 2003. Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ Tcells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood*, 101(9), pp.3520–3526.
- Francois, M. et al., 2009. Mesenchymal stromal cells cross-present soluble exogenous antigens as part of their antigen-presenting cell properties. *Blood*, 114(13), pp.2632–2639.
- François, M. et al., 2012. Human MSC Suppression Correlates With Cytokine Induction of Indoleamine 2,3-Dioxygenase and Bystander M2 Macrophage Differentiation. *Molecular Therapy*, 20(1), pp.187–195. Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1525001616304646>.
- Friedenstein, A.J. et al., 1974. Stromal Cells responsible for transferring the microenvironment of the hemopoietic tissues. *Transplantation*, 17(4), pp.331–340.
- Galibert, L. et al., 2005. Nectin-like protein 2 defines a subset of T-cell zone dendritic cells and is a ligand for Class-I-restricted T-cell-associated molecule. *Journal of Biological Chemistry*, 280(23), pp.21955–21964.
- Galipeau, J., 2013. The mesenchymal stromal cells dilemma — does a negative phase III trial of random donor mesenchymal stromal cells in steroid-resistant graft-versus-host disease represent a death knell or a bump in the road? *Journal of Cytotherapy*, 15(1), pp.2–8. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2012.10.002>.
- Gao, S. et al., 2014. Mouse bone marrow-derived mesenchymal stem cells induce macrophage M2 polarization through the nuclear factor- κ B and signal transducer and activator of transcription 3 pathways. *Experimental Biology and Medicine*, 239, pp.366–375.
- Gao, X. et al., 2014. Bone marrow mesenchymal stem cells promote the repair of islets from diabetic mice through paracrine actions. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 388(1–2), pp.41–50. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mce.2014.03.004>.
- Gerosa, F. et al., 2008. Differential regulation of interleukin 12 and interleukin 23 production in human dendritic cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 205(6), pp.1447–1461.
- Gerosa, F. et al., 2005. The Reciprocal Interaction of NK Cells with Plasmacytoid or Myeloid Dendritic Cells Profoundly Affects Innate Resistance Functions. *Journal of Immunology*, 174(2), pp.727–734. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/174/2/727.full>.
- Ghosh, H.S. et al., 2010. Continuous Expression of the Transcription Factor E2-2 Maintains the Cell Fate of Mature Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity*, 33(6), pp.905–916. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.11.023>.
- Gilliet, M. & Liu, Y.-J., 2002. Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of experimental medicine*, 195(6), pp.695–704. Available at: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2193733&tool=pmcent>

- rez&rendertype=abstract.
- Glenn, J.D. et al., 2014. Mesenchymal stem cells : Emerging mechanisms of immunomodulation and therapy. *World Journal of Stem Cells*, 6(5), pp.526–539.
- Götherström, C. et al., 2004. Immunologic properties of human fetal mesenchymal stem cells. *American Journal of Obstetrics and Gynecology*, 190, pp.239–245.
- Grouard, G. et al., 1997. The Enigmatic Plasmacytoid T Cells Develop into Dendritic. *Journal of Experimental Medicine*, 185(6), pp.1101–1111.
- Guan, X.J. et al., 2013. Mesenchymal stem cells protect cigarette smoke-damaged lung and pulmonary function partly via VEGF-VEGF receptors. *Journal of Cellular Biochemistry*, 114(2), pp.323–335.
- Hadeiba, H. et al., 2008. CCR9 expression defines tolerogenic plasmacytoid dendritic cells capable of suppressing acute graft-versus-host disease. *Nature Immunology*, 9(11), pp.1253–1260.
- Hambleton, S. et al., 2011. IRF8 Mutations and Human Dendritic-Cell Immunodeficiency Sophie. *N Engl J Med*, 365, pp.127–138.
- Han, X. et al., 2014. Interleukin-17 enhances immunosuppression by mesenchymal stem cells. *Cell Death and Differentiation*, 21, pp.1758–1768.
- Haniffa, M. et al., 2012. Human Tissues Contain CD141 hi Cross-Presenting Dendritic Cells with Functional Homology to Mouse CD103 + Nonlymphoid Dendritic Cells. *Immunity*, 37(1), pp.60–73.
- Hartmann, G. et al., 2006. Rational design of new CpG oligonucleotides that combine B cell activation with high IFN- alpha induction in plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 33, pp.1633–1641.
- Hass, R. et al., 2011. Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. , pp.1–14.
- Hemont, C. et al., 2013. Human blood mDC subsets exhibit distinct TLR repertoire and responsiveness. *J Leukoc Biol*, 93(4), pp.599–609. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23341538><http://www.jleukbio.org/content/93/4/599.full.pdf>.
- Herold, G., Rau, S. & Richter, B., 2016. *Innere Medizin*,
- Hoeffel, G. et al., 2007. Antigen Crosspresentation by Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *Immunity*, 27(3), pp.481–492.
- Hornung, V. et al., 2002. Quantitative Expression of Toll-Like Receptor 1-10 mRNA in Cellular Subsets of Human Peripheral Blood Mononuclear Cells and Sensitivity to CpG Oligodeoxynucleotides. *The Journal of Immunology*, 168(9), pp.4531–4537. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.168.9.4531>.
- Hosseiniakia, R. et al., 2017. Molecular and Cellular Interactions of Allogenic and Autologous Mesenchymal Stem Cells with Innate and Acquired Immunity and Their Role in Regenerative. *International Journal of Hematology-Oncology and Stem Cell Research*, 11(1).
- Huysamen, C. et al., 2008. CLEC9A is a novel activation C-type lectin-like receptor expressed on BDCA3+ dendritic cells and a subset of monocytes. *Journal of Biological Chemistry*, 283(24), pp.16693–16701.
- Introna, M. et al., 2014. Treatment of Graft versus Host Disease with Mesenchymal Stromal Cells : A Phase I Study on 40 Adult and Pediatric Patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 20(3), pp.375–381. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2013.11.033>.
- Jahrsdörfer, B. et al., 2010. Granzyme B produced by human plasmacytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion. *Blood*, 115(6), pp.1156–1165.
- Jarrossay, D. et al., 2001. Specialization and complementarity in microbial molecule

- recognition by human myeloid and ... Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 31, pp.3388–3393.
- Jego, G. et al., 2003. Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*, 19(2), pp.225–234. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12932356>.
- Jiang, W. et al., 2017. Presentation of Soluble Antigens to CD8 + T Cells by CpG Oligodeoxynucleotide-Primed Human Naive B Cells. *The Journal of Immunology*, 186, pp.2080–2086.
- Jiang, X. et al., 2005. Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*, 105(10), pp.4120–4127.
- Jongbloed, S.L. et al., 2010. Human CD141⁺ (BDCA-3)⁺ dendritic cells (DCs) represent a unique myeloid DC subset that cross-presents necrotic cell antigens. *The Journal of Experimental Medicine*, 207(6), pp.1247–1260. Available at: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20092140>.
- Jurk, M. et al., 2002. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nature Immunology*, 3(6), p.499.
- Kopen, C., Prockop, D.J. & Phinney, D.G., 1999. Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after. *Cell Biology*, 96(September), pp.10711–10716.
- Korn, T. et al., 2007. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH 17 cells. *Nature*, 448(7152), pp.484–487.
- Krampera, M. et al., 2003. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood*, 101(9), pp.3722–3729.
- Krug, A. et al., 2004. Herpes Simplex Virus type 1 (HSV-1) activates murine natural interferon-producing cells (IPC) through toll-like receptor 9. *Blood Journal*, 103(4), pp.1433–1438.
- Krug, A. et al., 2001. Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α/β in plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 31, pp.2154–2163.
- Kuçi, Z. et al., 2016. Mesenchymal Stromal Cells From Pooled Mononuclear Cells Of Multiple Bone Marrow Donors As Rescue Therapy In Pediatric Severe Steroid-Refractory Graft- Versus -Host Disease : A Multicenter Survey. *Haematologica*, 101, pp.985–994.
- Kurtzberg, J. et al., 2014. Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (Remestemcel-L, Prochymal) as a rescue agent for severe refractory acute graft-versus-host disease in pediatric patients. *Biology of Blood and Marrow Transplantation*, 20(2), pp.229–235. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2013.11.001>.
- Lalu, M.M. et al., 2012. Safety of Cell Therapy with Mesenchymal Stromal Cells (SafeCell): A Systematic Review and Meta-Analysis of Clinical Trials. *PLoS ONE*, 7(10).
- Langlet, C. et al., 2012. CD64 Expression Distinguishes Monocyte-Derived and Conventional Dendritic Cells and Reveals Their Distinct Role during Intramuscular Immunization. *J Immunol*, 188, pp.1751–1760.
- Larson, S.R. et al., 2016. Ly6C⁺ monocyte efferocytosis and cross-presentation of cell-associated antigens. *Cell Death and Differentiation*, 23(6), pp.997–1003. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cdd.2016.24>.
- Lauterbach, H. et al., 2010. DCs are major producers of IFN- γ in response to poly IC.

- The Journal of Experimental Medicine*, 207(12), pp.2703–2717.
- Lazarus, H.M. et al., 1995. Ex vivo expansion and subsequent infusion of human bone marrow-derived stromal progenitor cells (mesenchymal progenitor cells): implications for therapeutic use. *Bone marrow transplantation*, 16(4), pp.557–64. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8528172> [Accessed April 13, 2017].
- Lewalle, P. et al., 2000. Freezing of dendritic cells , generated from cryopreserved leukaphereses , does not influence their ability to induce antigen-specific immune responses or functionally react to maturation stimuli. *Journal of Immunological Methods*, 240, pp.69–78.
- Li, X. et al., 2012. Long-term culture in vitro impairs the immunosuppressive activity of mesenchymal stem cells on T cells. *Molecular medicine reports*, 6, pp.1183–1189.
- Liotta, F. et al., 2008. Toll-Like Receptors 3 and 4 Are Expressed by Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells and Can Inhibit Their T-Cell Modulatory Activity by Impairing Notch Signaling. *Stem Cells*, 26, pp.279–289.
- Liu, K. et al., 2007. Origin of dendritic cells in peripheral lymphoid organs of mice. *Nature Immunology*, 8(6), pp.578–583. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni1462>.
- Lombardo, E. et al., 2009. Toll-like Receptor–Mediated Signaling in Human Adipose-Derived Stem Cells: Implications for Immunogenicity and Immunosuppressive Potential. *Tissue Engineering*, 15(7), pp.1579–1589.
- Loré, K. et al., 2003. Toll-Like Receptor Ligands Modulate Dendritic Cells to Augment Cytomegalovirus- and HIV-1-Specific T Cell Responses. *The Journal of Immunology*, 171, pp.4320–4328.
- Lund, J. et al., 2003. Toll-like Receptor 9–mediated Recognition of Herpes Simplex Virus-2 by Plasmacytoid Dendritic Cells. *The Journal of Experimental Medicine*, 198(3), pp.513–520. Available at: <http://www.jem.org/lookup/doi/10.1084/jem.20030162>.
- Lund, J.M. et al., 2004. Recognition of single-stranded RNA viruses by Toll-like receptor 7. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(15), pp.5598–5603. Available at: <http://www.pnas.org/content/101/15/5598.full.pdf>.
- Luttmann, W. et al., 2006. *Der Experimentator: Immunologie*,
- Martin, P.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. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbmt.2009.12.057>.
- Matsui, T. et al., 2009. CD2 Distinguishes Two Subsets of Human Plasmacytoid Dendritic Cells with Distinct Phenotype and Functions. *The Journal of Immunology*, 182(11), pp.6815–6823. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.0802008>.
- Matsumoto, M. et al., 2003. Subcellular Localization of Toll-Like Receptor 3 in Human Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 171(6), pp.3154–3162. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.171.6.3154>.
- Meisel, R. et al., 2004. Brief report Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2 , 3-dioxygenase – mediated tryptophan degradation. *Blood*, 103(12), pp.4619–4622.
- Meisel, R. et al., 2014. Cytomegalovirus Infection Impairs Immunosuppressive and Antimicrobial Effector Functions of Human Multipotent Mesenchymal Stromal Cells. *Mediators of Inflammation*, pp.1–7.

- Merad, M. et al., 2013. The Dendritic Cell Lineage: Ontogeny and Function of Dendritic Cells and Their Subsets in the Steady State and the Inflamed Setting. *Annual Review of Immunology*, 31(9), pp.15–25.
- Mittag, D. et al., 2011. Human Dendritic Cell Subsets from Spleen and Blood Are Similar in Phenotype and Function but Modified by Donor Health Status. *The Journal of Immunology*, 186(11), pp.6207–6217. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1002632>.
- Molendijk, I. et al., 2015. Allogeneic Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Promote Healing of Refractory Perianal Fistulas in Patients With Crohn's Disease. *Gastroenterology*, 149(4), p.918–27.e6. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26116801>.
- Moll, G. et al., 2011. Mesenchymal Stromal Cells Engage Complement and Complement Receptor Bearing Innate Effector Cells to Modulate Immune Responses. *PLoS ONE*, 6(7), pp.1–9.
- Morandi, F. et al., 2009. Immunogenicity of human mesenchymal stem cells in HLA-class I restricted T cell responses against viral- or tumor-associated antigens. *Stem Cells*, 26(5), pp.1275–1287.
- Mosmann, T.R. et al., 1986. Two types of murine helper T cell clone . I . Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *The Journal of Immunology*, 136(7), pp.2348–2357.
- Murphy, K.M., Reiner, S.L. & Medical, H.H., 2002. The Lineage Decisions of Helper T Cells. *Nature Reviews Immunology*, 2(December), pp.933–944.
- Nagasawa, M. et al., 2008. Development of human plasmacytoid dendritic cells depends on the combined action of the basic helix-loop-helix factor E2-2 and the Ets factor Spi-B. *European Journal of Immunology*, 38(9), pp.2389–2400.
- Napolitani, G. et al., 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1 – polarizing program in dendritic cells. *Nature Immunology*, 6(8), pp.769–776.
- 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. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16887966>.
- Nemeth, K. et al., 2009. Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E 2 – dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature medicine*, 15(1), pp.42–50.
- Nicola, M. Di et al., 2002. Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*, 99(10), pp.3838–3844.
- Nizzoli, G. et al., 2013. Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses. *Blood*, 122(6), pp.932–942.
- 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.325–330. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.11.001>.
- Nold, P. et al., 2015. Immunosuppressive capabilities of mesenchymal stromal cells are maintained under hypoxic growth conditions and after gamma irradiation. *Journal of Cytotherapy*, 17(2), pp.152–162. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2014.10.004>.
- Onai, N. et al., 2007. Identification of clonogenic common Flt3+M-CSFR+ plasmacytoid and conventional dendritic cell progenitors in mouse bone marrow. *Nature Immunology*, 8(11), pp.1207–1216. Available at:

- <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni1518>.
- Ou-Yang, H.F. et al., 2011. Suppression of allergic airway inflammation in a mouse model of asthma by exogenous mesenchymal stem cells. *Exp Biol Med (Maywood)*, 236(12), pp.1461–1467. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22114062>.
- Pallotta, M.T. et al., 2011. Indoleamine 2,3-dioxygenase is a signaling protein in long-term tolerance by dendritic cells. *Nature Immunology*, 12(9), pp.870–878. Available at: <http://www.nature.com/doifinder/10.1038/ni.2077>.
- Petersdorf, E.W. et al., 2001. Major-histocompatibility-complex class I alleles and antigens in hematopoietic-cell transplantation. *The New England journal of medicine*, 345(25), pp.1794–1800.
- Petersen, B.W. et al., 1999. Bone Marrow as a Potential Source of Hepatic Oval Cells. *Science*, 284(MAY), pp.1168–1171.
- Phinney, D.G., 2007. Biochemical Heterogeneity of Mesenchymal Stem Cell Populations ND ES SC RIB. *Cell Cycle*, 6(23), pp.2884–2889.
- Pittenger, M.F. et al., 1999. Multilineage Potential of Adult Human Mesenchymal Stem. *Science*, 284, pp.143–148.
- Poltorak, A. et al., 1998. Defective LPS Signaling in C3H / HeJ and C57BL / 10ScCr Mice : Mutations in Tlr4 Gene. *Science.*, 282(5396), pp.2085–2088.
- Proietto, A.I. et al., 2012. The equivalents of human blood and spleen dendritic cell subtypes can be generated in vitro from human CD34(+) stem cells in the presence of fms-like tyrosine kinase 3 ligand and thrombopoietin. *Cellular & molecular immunology*, 9(6), pp.446–54. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/cmi.2012.48>.
- Quarto, R., Mastrogiacomo, M. & Cancedda, R., 2001. Repair of Large Bone Defects with the Use of Autologous Bone Marrow Stromal Cells. *N Engl J Med*, 344(5), pp.385–386.
- Rafei, M. et al., 2008. Mesenchymal stromal cell – derived CCL2 suppresses plasma cell immunoglobulin production via STAT3 inactivation and PAX5 induction. *Blood*, 112(13), pp.4991–4999.
- Raffaghello, L., Bianchi, G. & Bertolotto, M., 2007. Human Mesenchymal Stem Cells Inhibit Neutrophil Apoptosis : A Model for Neutrophil Preservation in the Bone Marrow Niche. *Stem Cells*, pp.151–162.
- 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. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2009.12.005>.
- Rasmusson, I., Uhlin, M., et al., 2007. Mesenchymal stem cells fail to trigger effector functions of cytotoxic T lymphocytes clone as compared with HLA-matched lymphoblasts- factor CTLs , which does not involve activation of. *Journal of Leukocyte Biology*, 82(4), pp.887–893.
- Rasmusson, I., Blanc, K. Le, et al., 2007. Mesenchymal Stem Cells Stimulate Antibody Secretion in Human B Cells. *Scandinavian Journal of Immunology*, 65, pp.336–343.
- Rastegar, F. et al., 2010. Mesenchymal stem cells : Molecular characteristics and clinical applications. *World Journal of Stem Cells*, 2(4), pp.67–80.
- Remmele, C.W. & Lennert, K., 1958. Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes. *Acta heamatologica*, 19(2), pp.99–113.
- Ren, G. et al., 2008. Article Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression Occurs via Concerted Action of Chemokines and Nitric Oxide. *Cell Stem Cell*, 2,

- pp.141–150.
- Ren, G. et al., 2010. Inflammatory Cytokine-Induced Intercellular Adhesion Molecule-1 and Vascular Cell Adhesion Molecule-1 in Mesenchymal Stem Cells Are Critical for This. *J Immunol*, 184, pp.2321–2328.
- Ren, G. et al., 2009. Species Variation in the Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression. *Stem Cells*, 27, pp.1954–1962.
- Ren, J. et al., 2015. Human bone marrow stromal cell confluence : effects on cell characteristics and methods of assessment. *Journal of Cytotherapy*, 17(7), pp.897–911. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2015.03.607>.
- Renner, P. et al., 2009. Mesenchymal Stem Cells Require a Sufficient , Ongoing Immune Response to Exert Their Immunosuppressive Function. *TPS*, 41(6), pp.2607–2611. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.transproceed.2009.06.119>.
- Van Rhijn, I., Ly, D. & Moody, D.B., 2013. CD1a, CD1b, and CD1c in Immunity Against Mycobacteria. In M. Divangahi, ed. *The New Paradigm of Immunity to Tuberculosis*. New York, NY: Springer New York, pp. 181–197. Available at: http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-6111-1_10.
- Rodriguez, A. et al., 2005. The human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Biochimie*, 87, pp.125–128.
- Romieu-Mourez, R. et al., 2007. Regulation of MHC Class II Expression and Antigen Processing in Murine and Human Mesenchymal Stromal Cells by IFN- γ , TGF- β , and Cell Density. *J Immunol*, 169, pp.1549–1558.
- Sangiorgi, B. et al., 2016. DSP30 enhances the immunosuppressive properties of mesenchymal stromal cells and protects their suppressive potential from lipopolysaccharide effects : A potential role of adenosine. *Cytotherapy*, 18(7), pp.846–859. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcyt.2016.04.004>.
- Sathaliyawala, T. et al., 2010. Mammalian target of rapamycin controls dendritic cell development downstream of Flt3 ligand signaling. *Immunity*, 33(4), pp.597–606. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2010.09.012>.
- Schlecht, G. et al., 2004. Murine plasmacytoid dendritic cells induce effector/memory CD8⁺ T-cell responses in vivo after viral stimulation. *Immunobiology*, 104(6), pp.1808–1815. Available at: <http://bloodjournal.hematologylibrary.org/content/104/6/1808.short>.
- Schlitzer, A. et al., 2012. Tissue-specific differentiation of a circulating CCR9 pDC-like common dendritic cell precursor. *Blood*, 119(25), pp.6063–6072.
- Schmid, M.A. et al., 2010. Instructive cytokine signals in dendritic cell lineage commitment. *Immunological Reviews*, 234(1), pp.32–44.
- Siddappa, R. et al., 2007. Donor Variation and Loss of Multipotency during In Vitro Expansion of Human Mesenchymal Stem Cells for Bone Tissue Engineering. *Journal of Orthopaedic Research*, pp.1029–1041.
- Siegel, F.P., Kadowaki, N. & Shodell, M., 1999. The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science*, 284(5421), pp.1835–1837. Available at: <http://www.sciencemag.org/cgi/doi/10.1126/science.284.5421.1835>.
- Simchoni, N., Cunningham-rundles, C. & Alerts, E., 2015. TLR7- and TLR9-Responsive Human B Cells Share Phenotypic and Genetic Characteristics. *The Journal of Immunology*, 194, pp.3035–3044.
- Simon, V. et al., 1997. Detection of stromal cells in peripheral blood progenitor cell collections from breast cancer patients. *Bone Marrow Transplantation*, 20, pp.265–271.
- Sotiropoulou, P. et al., 2006. Characterization of the Optimal Culture Conditions for Clinical Scale Production of Human Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*, 24,

- pp.462–471.
- Sozzani, S. et al., 2010. Trafficking properties of plasmacytoid dendritic cells in health and disease. *Trends in Immunology*, 31(7), pp.270–277. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2010.05.004>.
- 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-2 – induced NK-cell proliferation. *Blood*, 107(4), pp.1484–1491.
- Spaggiari, G.M. et al., 2008. Mesenchymal stem cells inhibit natural killer – cell proliferation , cytotoxicity , and cytokine production : role of indoleamine 2 , 3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*, 111(3), pp.1327–1334.
- Steinman, R., 1983. Dendritic cells are the principal stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Journal of Experimental Medicine*, 157(2), pp.613–627. Available at: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.157.2.613>.
- Steinman, R.M., 1973. Identification of a Novel Cell Type in Peripheral Lymphoid Organs of Mice: I. Morphology, Quantitation, Tissue Distribution. *Journal of Experimental Medicine*, 137(5), pp.1142–1162. Available at: <http://www.jem.org/cgi/doi/10.1084/jem.137.5.1142>.
- Strobl, H. et al., 1998. Identification of CD68+lin- peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 161(2), pp.740–8. Available at: <http://www.jimmunol.org/content/161/2/740.full>.
- Takaoka, A. et al., 2005. Integral role of IRF-5 in the gene induction programme activated by Toll-like receptors. *Nature*, 434(7030), pp.243–249.
- Thaiss, C.A. et al., 2011. Chemokines : a new dendritic cell signal for T cell activation. *Frontiers in Immunology*, 2(31), pp.1–9.
- Tomchuck, S.L. et al., 2008. Toll-Like Receptors on Human Mesenchymal Stem Cells Drive their Migration and Immunomodulating Responses. *Stem Cells*, 26(1), pp.99–107.
- Tschopp, J. & Jongeneel, C. V, 1988. Cytotoxic T Lymphocyte Mediated Cytolysis. *Perspectives in Biochemistry*, 27(8), pp.2641–2646.
- Uccelli, A., Moretta, L. & Pistoia, V., 2008. Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, 8(9), pp.726–736.
- Vega, A. et al., 2015. Treatment of Knee Osteoarthritis With Allogeneic Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells: A Randomized Controlled Trial. *Transplantation*, 99(8), pp.1681–90. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25822648>.
- Vollmer, J. et al., 2004. Characterization of three CpG oligodeoxynucleotide classes with distinct immunostimulatory activities. *European Journal of Immunology*, 34(1), pp.251–262.
- Van Voorhis, W. et al., 1982. HUMAN DENDRITIC CELLS Enrichment and Characterization from Peripheral Blood. *Journal of Experimental Medicine*, 155(April), pp.1172–1187.
- Wakitani, S. et al., 2007. Repair of articular cartilage defects in the patello-femoral joint with autologous bone marrow mesenchymal cell transplantation: three case reports involving nine defects in five knees. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*, 1, pp.74–79.
- Wang, L.-T. et al., 2016. Human mesenchymal stem cells (MSCs) for treatment towards immune- and inflammation-mediated diseases: review of current clinical trials. *Journal of Biomedical Science*, 23(1), p.76. Available at: <http://jbiomedsci.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12929-016-0289-5>.
- Watchmaker, P.B. et al., 2013. Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice.

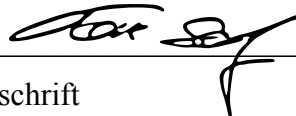
- Nature Immunology*, 15(1), pp.98–108. Available at: <http://www.nature.com/doi/10.1038/ni.2768>.
- Waterman, R.S. et al., 2010. A New Mesenchymal Stem Cell (MSC) Paradigm : Polarization into a Pro-Inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 Phenotype. *PLoS ONE*, 5(4), pp.1–14.
- Wolff, D. et al., 2013. Current practice in diagnosis and treatment of acute graft-versus-host disease: results from a survey among German-Austrian-Swiss hematopoietic stem cell transplant centers. *Biology of blood and marrow transplantation : journal of the American Society for Blood and Marrow Transplantation*, 19(5), pp.767–76. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23376495>.
- Yin, Z. et al., 2012. Type III IFNs Are Produced by and Stimulate Human Plasmacytoid Dendritic Cells. *The Journal of Immunology*, 189(6), pp.2735–2745. Available at: <http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1102038>.
- Yoshio, S. et al., 2013. Human Blood Dendritic Cell Antigen 3 (BDCA3) 1 Dendritic Cells Are a Potent Producer of Interferon- γ in Response to Hepatitis C Virus. *Hepatology*, 3, pp.1705–1715.
- Yu, C.I. et al., 2014. Human CD141⁺ Dendritic Cells Induce CD4⁺ T Cells To Produce Type 2 Cytokines. *The Journal of Immunology*, 193(9), pp.4335–4343. Available at: <http://www.jimmunol.org/lookup/doi/10.4049/jimmunol.1401159>.
- Zappia, E. et al., 2008. Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*, 106(5), pp.1755–1761.
- Zelenay, S. et al., 2012. The dendritic cell receptor DNGR-1 controls endocytic handling of necrotic cell antigens to favor cross-priming of CTLs in virus-infected mice. *The Journal of Clinical Investigation*, 122(5), pp.1615–1627.
- Zhang, J. et al., 2011. Article The Dendritic Cell Receptor Clec9A Binds Damaged Cells via Exposed Actin Filaments. *Immunity*, 36(4), pp.646–657. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.immuni.2012.03.009>.
- Ziegler-Heitbrock, L. et al., 2010. Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood Nomenclature of monocytes and dendritic cells in blood. *Blood*, 116(16), pp.5–7.

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 wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, 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.“

Kd'n, 14.05.2019

Ort, Datum



Unterschrift

Danksagung

Ich möchte mich hiermit bei allen Personen bedanken, die mich auf diesem Weg unterstützt und diese Arbeit überhaupt erst möglich gemacht haben.

An erster Stelle bedanke ich mich bei Herrn Prof. Dr. Holger Hackstein, der mir als Doktorvater auch in schwierigen Zeiten stets mit Rat und Tat zur Seite stand und mir das Vertrauen geschenkt hat, an diesem Thema arbeiten zu dürfen.

Ein großer Dank gilt der gesamten Arbeitsgruppe Hackstein um Gabriela Michel, Nelli Baal, Yuri Chukovetskyi und Anne Lippitsch sowie den ehemaligen Mitgliedern Andreas Wachtendorf, Bettina Gill und Philipp Ensel für das freundschaftliche Arbeitsklima und die großzügige Hilfestellung. Ohne sie wäre die Umsetzung dieses Projektes nicht möglich gewesen. Besonders hervorheben möchte ich die medizinisch-technische Assistentin Gabriele Michel, die mich sowohl fachlich als auch menschlich in allen Lagen und Situationen unterstützt hat und immer ein offenes Ohr für mich hatte. Vielen Dank an das gesamte Institut der Transfusionsmedizin und klinischen Immunologie um den Leiter Prof. Dr. Gregor Bein. Speziell bedanke ich mich bei den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Blutbank für das problemlose Zurverfügungstellen der Blutprodukte.

Weiterhin möchte ich mich bei der AG Neubauer, Burchert und Brendel des Universitätsklinikums Marburg für die unkomplizierte Bereitstellung der MSC bedanken. Insbesondere ist dort Philipp Nold für eine nette und vertrauensvolle Zusammenarbeit zu danken.

Ein großer Dank gilt meiner Familie und meinen Freunden für den Rückhalt und das Vertrauen während der Arbeit an diesem Projekt. Besonders und von ganzem Herzen möchte ich mich abschließend bei meinen Eltern für ihre bedingungslose Unterstützung bedanken.