

Sandra Ehser
Dr. sc. hum.

**Generierung tolerogener Dendritischer Zellen für die Therapie durch *ex vivo*
Behandlung mit Mitomycin C: Detektion immunsuppressiver Moleküle durch
Microarray-Analysen der Genexpression**

Geboren am 02.08.1977 in Heidelberg

Diplom der Fachrichtung Biologie im Juni 2004 an der Universität Bremen

Promotionsfach: Immunologie

Doktorvater: Prof. Dr. med. P. Terneß

Aktuelle Behandlungsstrategien in der Organtransplantation und bei Autoimmunerkrankungen blockieren unspezifisch die Immunantwort. Diese breite Immunsuppression prädisponiert die Patienten jedoch unter anderem zu verstärkt auftretenden Infektionen und Neoplasmen. Die relevanten Antigene sind bei Abstoßungsreaktionen nach Transplantationen immer und bei Autoimmunerkrankungen oft bekannt. Eine gezielte Antigen-spezifische Immunsuppression wäre wünschenswert, um die Aufrechterhaltung einer effektiven Immunantwort gegen schädigende Eindringlinge zu gewährleisten. Ideale Kandidaten für diese Aufgabe sind die professionellen Antigen-präsentierenden dendritischen Zellen (DCs). Sie vermitteln einerseits eine Immunantwort gegen Fremdkörper aber andererseits auch Toleranz gegen Autoantigene. *In vitro* generierte suppressive DCs könnten als therapeutisches Werkzeug eingesetzt werden, um eine spezifische Immuntoleranz zu induzieren. Eine Möglichkeit suppressive DCs zu generieren, ist die Behandlung mit Mitomycin C (MMC). Das zytostatische Chemotherapeutikum MMC ist ein alkylierendes Agens, das die DNA-Replikation beeinträchtigt und partiell die Proteinsynthese inhibiert.

Vor Beginn dieser Arbeit war bereits bekannt, dass MMC-behandelte DCs (MMC-DCs) die allogene und Antigen-spezifische autologe T-Zell-Antwort supprimieren können. Eine Restimulation der T-Zellen, die zuvor mit MMC-DCs kokultiert wurden, mit unbehandelten, stimulatorischen DCs war nicht möglich. Unklar ist, wie MMC-DCs die Suppression vermitteln. Deshalb wurde in der vorliegenden Arbeit eine Genexpressionsstudie der MMC-behandelten DCs durchgeführt. DCs von drei gesunden Spendern, jeweils unbehandelt und MMC-behandelt, wurden mit Hilfe eines Microarrays analysiert und miteinander verglichen.

Von insgesamt 47.000 untersuchten Genen konnten 116 identifiziert werden, deren Expression von MMC signifikant modifiziert wurden. Unter diesen Genen wurden 62 verstärkt und 54 vermindert exprimiert. Zwei Gruppen fielen dabei besonders auf: immunsuppressive und Apoptose-assoziierte Moleküle. Hierunter ist GILZ, ein durch MMC hochregulierter Transkriptionsfaktor, der eine bedeutende Rolle bei der Immunsuppression spielt. GILZ induziert die Expression von ILT3, ein Protein, welches sich in früheren Untersuchungen als wichtiger Marker von tolerogenen DCs darstellte. Adrenomedullin, dessen Expression um ein 10faches durch MMC-Behandlung gesteigert wurde, war ein weiterer Kandidat. Adrenomedullin kann die Anzahl von autoreaktiven Th1-Zellen vermindern und die inflammatorische Antwort in einem Collagen-induzierten Arthritis (CIA)-Modell reduzieren. Blockierungsversuche mit ILT3- und Adrenomedullin-spezifischen Antikörpern zeigten in unseren Studien, dass sie maßgeblich an der MMC-induzierten Immunsuppression beteiligt sind.

Weiterhin sind 11 der 116 veränderten Gene mit Apoptose assoziiert. Apoptotische Zellen verfügen über immun-modulatorische Eigenschaften. Dies gilt sowohl für apoptotische Zellen selbst als auch für Zellen, die apoptotische Zellen phagozytiert haben. Inflammatorische Vorgänge werden dabei inhibiert und Toleranz induziert. Studien belegten bereits, dass eine Infusion mit apoptotischen Zellen das Überleben eines Transplantates verlängern und eine oftmals beobachtete Reaktion von Spenderzellen gegen den Empfänger, die sogenannte „graft-versus-host disease“ (GVHD) verzögern kann. Mitentscheidend bei der Frage, ob Immunität oder Toleranz durch Immunisierung mit apoptotischen Zellen entsteht, ist wie und durch welchen Stoff Apoptose induziert wurde. Mitomycin C löst Zelltod durch Apoptose aus und verstärkt gleichzeitig die Expression immunsuppressiver Moleküle. Dadurch kann Toleranz induziert werden. In unseren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Apoptose ein wichtiger Bestandteil der MMC-DC vermittelten T-Zell-Inhibition ist. Durch eine Blockade des Zelltodes wurde die Suppressionskapazität der MMC-behandelten DCs teilweise aufgehoben.

Somit stellt die MMC-Behandlung eine einfache und praktikable Methode zur Generierung suppressiver DCs dar. MMC ist eine bereits in der Klinik verwendete Substanz, die in unserem Modell in einer nicht-toxischen Konzentration angewandt wurde. Apoptose ist ein irreversibler Prozess, der eine Umkehrung der DCs in eine stimulatorische Zelle verhindert. In Kombination mit der Expression von immunsuppressiven Molekülen inaktivieren die apoptotischen DCs T-Zellen *in vitro* und *in vivo* und liefern ein stabiles therapeutisches Werkzeug.