



GEORG-AUGUST-UNIVERSITÄT  
GÖTTINGEN

***Ex vivo* und *in vivo* Modulation von Makrophagen  
und T-Zellen als therapeutisches Prinzip der aGvHD**

**Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades  
„Doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)“  
im Studienprogramm Molekulare Medizin der  
Georg-August-Universität Göttingen

vorgelegt von  
Katharina Jörß  
geboren in Berlin

**Göttingen 2015**

## **Mitglieder des Betreuungsausschusses (Thesis-Komitees):**

### **Prof. Dr. Holger Reichardt (Betreuer, 1. Gutachter)**

Institut für Zelluläre und Molekulare Immunologie  
Universitätsmedizin Göttingen

### **Prof. Dr. Matthias Dobbelsstein (2. Gutachter)**

Institut für Molekulare Onkologie  
Universitätsmedizin Göttingen

### **Prof. Dr. Tobias Pukrop**

Innere Medizin III (Hämatologie und internistische Onkologie)  
Universitätsklinikum Regensburg

## **Zusätzliche Mitglieder des Prüfungsausschusses:**

### **Prof. Dr. Lutz Walter**

Abteilung Primatengenetik  
Deutsches Primatenzentrum Göttingen

### **Prof. Dr. Dörthe Katschinski**

Institut für Herz- und Kreislaufphysiologie  
Universitätsmedizin Göttingen

### **Prof. Dr. Hubertus Jarry**

Abteilung Klinische und Experimentelle Endokrinologie  
Universitätsmedizin Göttingen

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>3</b>
<b>2.1.</b>	<b>Makrophagen.....</b>	<b>3</b>
2.1.1.	Entwicklung und Funktion.....	3
2.1.2.	Polarisation von Makrophagen .....	5
2.1.3.	Makrophagen und inflammatorische Erkrankungen .....	7
2.1.4.	Makrophagen als zelluläre Therapie.....	9
<b>2.2.</b>	<b>Graft-versus-Host Disease .....</b>	<b>10</b>
2.2.1.	Hämatopoetische Stammzelltransplantation .....	10
2.2.2.	Pathogenese und Klinik.....	11
2.2.3.	Rolle der Donor T-Zellen .....	15
2.2.4.	Rolle der professionellen Empfänger-APZs.....	17
2.2.5.	Therapie der aGvHD .....	18
<b>2.3.</b>	<b>Glukokortikoide.....</b>	<b>19</b>
2.3.1.	Wirkung von Glukokortikoiden.....	19
2.3.2.	Glukokortikoide in der Regulation des Immunsystems (T-Zellen, APZs). 22	
2.3.3.	Glukokortikoide in Immunerkrankungen .....	24
2.3.4.	Glukokortikoide: Nebenwirkungen und Resistenz .....	25
<b>2.4.</b>	<b>Glukokortikoide und aGvHD .....</b>	<b>27</b>
<b>2.5.</b>	<b>Zellbasierte Therapien.....</b>	<b>28</b>
2.5.1.	Regulatorische T-Zellen (Treg) als aGvHD-Therapie .....	28
2.5.2.	Myeloide Therapien der aGvHD .....	30
<b>2.6.</b>	<b>Fragestellung .....</b>	<b>32</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>34</b>
<b>3.1.</b>	<b>Materialien .....</b>	<b>34</b>
3.1.1.	Laborgeräte .....	34
3.1.2.	Verbrauchsmaterial .....	36
3.1.3.	Chemikalien und Reagenzien.....	38
3.1.4.	Puffer, Lösungen und Medien .....	40
3.1.4.1.	Puffer und Lösungen .....	40
3.1.4.2.	Medien.....	42
3.1.5.	Antikörper für FACS und Zellisolation.....	42
3.1.6.	Oligonukleotide.....	43

3.1.7. Kommerzielle Kits und Enzyme .....	44
3.1.8. Zelllinien .....	44
3.1.9. Software .....	45
<b>3.2. Methoden .....</b>	<b>45</b>
3.2.1. <i>in vitro</i> Versuche .....	45
3.2.1.1. Zellkultur .....	45
3.2.1.1.1. Bestimmung der Zellzahl .....	45
3.2.1.1.2. Gewinnung von BMDMs .....	46
3.2.1.1.2.1. Herstellung von <i>L cell conditioned medium</i> (LCCM) .....	46
3.2.1.1.2.2. Differenzierung zu Makrophagen .....	46
3.2.1.1.2.3. Polarisierung von Makrophagen .....	47
3.2.1.2. Funktionelle und immunologische Analysemethoden .....	47
3.2.1.2.1. T-Zell-Proliferation .....	47
3.2.1.2.1.1. Polyklonale Stimulation .....	47
3.2.1.2.2. Phagozytostest .....	48
3.2.1.2.3. Adhärenztest .....	48
3.2.1.2.4. <sup>51</sup> Cr-Test von <i>in vivo</i> generierten alloreaktiven ZTLs .....	48
3.2.1.2.4.1. Isolation von CD8 <sup>+</sup> -T-Zellen .....	49
3.2.1.3. <i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> (ELISA) .....	50
3.2.1.4. Messung von Stickoxiden (NO-Test) .....	50
3.2.1.5. Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> ) FACS) ..	51
3.2.1.6. Molekularbiologische Methoden .....	51
3.2.1.6.1. RNA-Isolation aus Zellen .....	51
3.2.1.6.2. Qualitative und quantitative Analyse von RNA .....	52
3.2.1.6.3. Agarosegelelektrophorese .....	52
3.2.1.6.4. c-DNA-Synthese (Reverse Transkription) .....	52
3.2.1.6.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	53
3.2.1.6.6. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR) .....	54
3.2.2. <i>in vivo</i> Versuche .....	56
3.2.2.1. Tierhaltung .....	56
3.2.2.2. Mäuse .....	56
3.2.2.3. aGvHD .....	57
3.2.2.3.1. Knochenmarksgewinnung .....	57
3.2.2.3.1.1. Herstellung von T-Zell-depletiertem Knochenmark .....	58

3.2.2.3.2.	Herstellung von Leukozyten-Einzelzellsuspension.....	58
3.2.2.3.2.1.	T-Zellisolation.....	58
3.2.2.3.3.	Bewertung des Krankheitsverlaufes .....	59
3.2.2.4.	Messung der Blut-Glukose .....	60
3.2.2.5.	Erfassung der Körpertemperatur .....	60
3.2.2.6.	Dex-Behandlung.....	60
3.2.2.7.	anti-IL-6-Gabe .....	60
3.2.2.8.	Gewinnung von Serum .....	60
3.2.2.9.	Probenentnahme.....	61
3.2.3.	Statistik.....	61
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1.</b>	<b>Charakterisierung verschieden polarisierter muriner Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) <i>in vitro</i> .....</b>	<b>62</b>
4.1.1.	Morphologie.....	62
4.1.2.	Genexpressionsanalyse .....	63
4.1.3.	Durchflusszytometrische Analyse (FACS).....	67
4.1.4.	Funktionelle Eigenschaften der BMDMs.....	70
4.1.4.1.	Phagozytose.....	70
4.1.4.2.	Adhärenz.....	71
4.1.4.3.	NO-Synthese.....	72
4.1.4.4.	Einfluss auf die T-Zellproliferation .....	73
4.1.4.5.	Stabilität: Stimulation mit TLR-Agonist (LPS, PolyI:C) und IL-17/IFN $\gamma$ .....	74
<b>4.2.</b>	<b>Einfluss einer präventiven Behandlung mit verschieden polarisierten BMDMs auf den Krankheitsverlauf im murinen Modell der aGvHD.....</b>	<b>79</b>
<b>4.3.</b>	<b>Glukokortikoide und ihre Rolle in der aGvHD .....</b>	<b>83</b>
4.3.1.	Wirkung von Glukokortikoiden auf die Zellen des Empfängers in der aGvHD.....	83
4.3.1.1.	Bedeutung der Neutralisation von IL-6 .....	84
4.3.1.2.	Bedeutung der myeloischen Zellen .....	87
4.3.2.	Wirkung von Glukokortikoiden auf transplantierte T-Zellen in der aGvHD.....	90
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>95</b>
<b>5.1.</b>	<b>Einfluss verschiedener Behandlungen auf den Phänotyp von murinen Makrophagen.....</b>	<b>95</b>

5.2.	Effekt von adoptivem Zelltransfer von M2-polarisierten Makrophagen auf die Schwere und den Ausgang der aGvHD .....	100
5.3.	Wirkung von IL-6-Neutralisierung auf den Verlauf der aGvHD in GR <sup>dim</sup> -Empfängermäusen .....	104
5.4.	Rolle des GR in myeloiden Empfängerzellen bei der Kontrolle der aGvHD .....	108
5.5.	CD8 <sup>+</sup> -Donor-T-Zellen als essentielles Target von Glukokortikoiden bei der aGvHD .....	110
5.6.	Ausblick .....	111
6.	Bibliographie .....	114
7.	Danksagung .....	139
A.	Anhang .....	141
A.1.	Abkürzungen .....	141
A.2.	Abbildungsverzeichnis .....	146
A.3.	Tabellenverzeichnis .....	147
A.4.	Curriculum Vitae .....	148

## **AFFIDAVIT:**

Hiermit erkläre ich, dass ich die hier vorliegende Dissertation mit dem Titel „*Ex vivo* und *in vivo* Modulation von Makrophagen und T-Zellen als therapeutisches Prinzip der aGvHD“ selbstständig angefertigt habe. Genutzte Hilfsmittel und Quellen wurden vollständig angegeben.

---

Katharina Jörß

Göttingen, August 2015

## 1. Zusammenfassung

Die akute Graft-versus-Host Erkrankung (*acute Graft-versus-Host disease*, aGvHD) ist eine pathogene Folgeerscheinung der hämatopoetischen Stammzelltransplantation. Zur Therapie werden zumeist Glukokortikoide eingesetzt, die sich durch ihre anti-inflammatorische und immunsuppressive Wirkung, insbesondere auf die an der aGvHD beteiligten alloreaktiven T-Zellen und Antigenpräsentierenden Zellen, auszeichnen. Die chronische Verabreichung hochdosierter Glukokortikoide ist jedoch mit zahlreichen Nebenwirkungen verbunden, und kann zum Auftreten Glukokortikoid-resistenter Verlaufsformen führen. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit zwei Ansätze verfolgt, die als Grundlage für die Entwicklung verbesserter Verfahren zur Therapie der aGvHD dienen könnten.

Zuerst wurde die Möglichkeit eines adoptiven Transfers *ex vivo* aus dem Knochenmark generierter und mittels Glukokortikoiden und IL-4 zum M2-Phänotyp polarisierter Makrophagen analysiert. Die Kombinationsbehandlung zeigte *in vitro* teils ausgeprägte synergistische Effekte in Hinblick auf die Polarisierung der Zellen, insbesondere auf Ebene der Genexpression. Nichtsdestotrotz konnte nach Transfer der anti-inflammatorischen Makrophagen kein therapeutischer Effekt im Mausmodell der aGvHD beobachtet werden. Als mögliche Erklärung hierfür kommt insbesondere der Verlust der M2-Polarisierung *in vivo* in Frage. Als alternative Strategie wurden daraufhin verschiedene zelltypische Wirkungen der Glukokortikoide in der aGvHD untersucht, um auf diesem Weg Angriffspunkte für eine zielgerichtetere Therapie zu identifizieren. Hierbei zeigte sich, dass eine überschießende Sekretion von IL-6 durch Zellen des Empfängers einen fulminanten Krankheitsverlauf zur Folge hat. Diese Wirkung konnte durch Applikation eines neutralisierenden Antikörpers verhindert werden, was durch einen geringeren Abfall der Körpertemperatur und Blutglukose begleitet war. Durch Verwendung konditionaler knock-out Mäuse konnten weiterhin die Makrophagen als einer der zentralen Zelltypen definiert werden, welche für die Glukokortikoid-Wirkung im Empfänger verantwortlich sind. Zuletzt ergaben Untersuchungen, dass Glukokortikoide auch wesentlich auf die transplantierten allo genen T-Zellen einwirken. Hier zeigte sich, dass sie vor allem die Zytotoxizität der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen vermindern und auf diese Weise einem fulminanten Verlauf der aGvHD entgegen wirken.

Zusammengefasst zeigen die Ergebnisse der Arbeit, dass eine Therapie der aGvHD mittels M2-Makrophagen nur dann möglich sein wird, wenn es gelingt, die Stabilität deren Phänotyps *in vivo* zu erhalten. Alternativ erscheinen jedoch auch Strategien vielversprechend, die auf einer gezielten Beeinflussung einzelner Zelltypen durch hoch-spezifische Glukokortikoide beruhen, da sich auf diese Weise möglicherweise Nebenwirkungen und Resistenzen umgehen lassen.

## 2. Einleitung

### 2.1. Makrophagen

#### 2.1.1. Entwicklung und Funktion

Makrophagen gehören zum mononukleären Phagozytensystem und sind ein wichtiger Teil des angeborenen Immunsystems. Sie stellen dabei eine heterogene Gruppe dar, die sich zum einen aus den residenten Gewebemakrophagen, zum anderen aus den inflammatorischen Makrophagen zusammensetzt und sind somit im gesamten Organismus anzutreffen (Gordon and Taylor, 2005). Außerdem zeichnen sie sich durch eine hohe funktionelle Diversität aus. So spielen Makrophagen eine wichtige Rolle bei der Entwicklung, der Homöostase, der Gewebereparatur und der Immunität. Sie sind an pro- als auch an anti-inflammatorischen Prozessen beteiligt, die streng reguliert sind (Wynn et al., 2013). Die wichtigsten Aufgaben von Makrophagen sind das Erkennen und Beseitigen von Pathogenen mittels Phagozytose, sowie die Antigenpräsentation, wodurch sie die adaptive Immunantwort aktivieren können (Gordon et al., 2014).

Die Herkunft der Gewebe- und der inflammatorischen Makrophagen ist hierbei durchaus unterschiedlich. In der Maus können Makrophagen von dreierlei Abstammung sein (Wynn et al., 2013). Die Gewebemakrophagen entstammen sowohl Vorläuferzellen, die bereits im Dottersack entstehen (Perdiguero et al., 2014) als auch aus Hämatopoese, also Monozytenentwicklung. Erstere werden an Tag 8,5 der embryonalen Entwicklung gebildet. Diese wandern in die Organe wie Leber, Gehirn oder Herz ein und entwickeln sich zu Mikroglia, Kupfer-Sternzellen oder Alveolarmakrophagen. Ein anderer Ursprung liegt in den Vorläuferzellen, die in der fötalen Leber gebildet werden. Dieser Vorgang entspricht der normalen Hämatopoese und wird durch Wachstumsfaktoren (z. B. myb) reguliert. Die entwickelten Monozyten wandern kurze Zeit nach den dem Dottersack entstammenden Makrophagen in das embryonale Gewebe, proliferieren und entwickeln sich zu Makrophagen. Sie verdrängen langsam, mit Ausnahme der Mikroglia, die dottersackstämmigen Makrophagen. Die Erneuerung der Gewebemakrophagen erfolgt zum einen durch Selbsterneuerung und zum anderen durch einen Monozytenpool im Knochenmark. (Ginhoux and Jung, 2014; Gordon et al., 2014).

Die inflammatorischen Makrophagen entstammen dem Knochenmark. Dort findet man eine hohe Anzahl an Stammzellen, aus denen sich Monozyten entwickeln, die dann bei Entzündungen, durch Chemotaxis in das Gewebe einwandern und sich dort zu Makrophagen weiterentwickeln. Die Entwicklung von der pluripotenten Stammzelle im Knochenmark zum fertig differenzierten Makrophagen unterliegt verschiedenen Zwischenstufen und ist abhängig von unterschiedlichen Faktoren, wie beispielsweise M-CSF (*Macrophage colony-stimulating factor*), GM-CSF (*Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*) und Interleukin-3 (IL-3). (Barreda et al., 2004; Pollard, 2009)

Makrophagen sind überall im Körper zu finden (Murray and Wynn, 2011b). Besonders verbreitet sind sie jedoch in Geweben bzw. Organen, die mit der umliegenden Umwelt interagieren, wie zum Beispiel der Haut oder der Lunge (Davies et al., 2013).

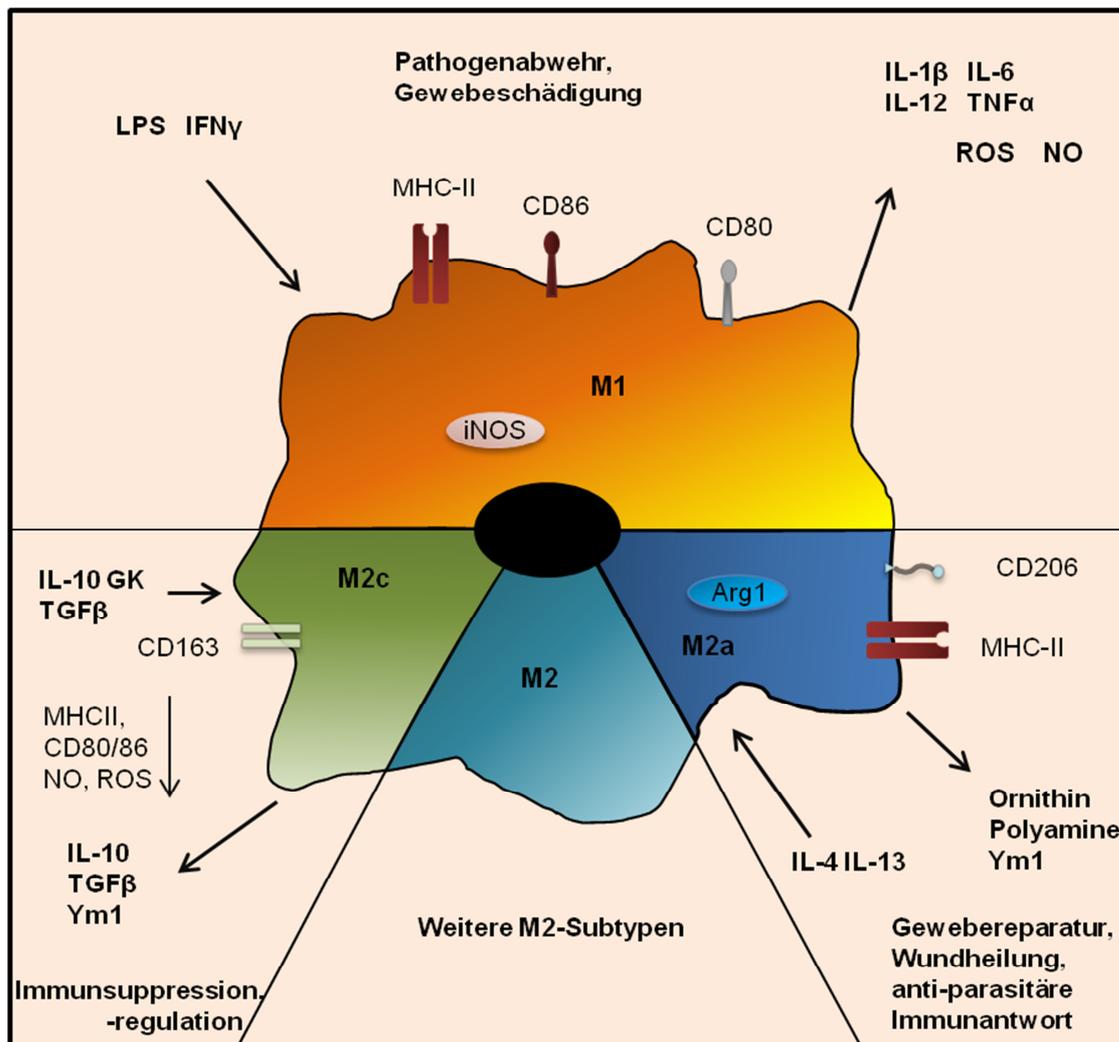
Makrophagen sind von großer Bedeutung sowohl bei der angeborenen als auch bei der adaptiven Immunantwort. Durch ihr breites Spektrum an Rezeptoren sind Makrophagen in der Lage ihre Umgebung wahrzunehmen und mit ihr in Kontakt zu treten. Neben *Pattern Recognition* Rezeptoren, wie Toll-like Rezeptoren (TLR) und Phagozytose-Rezeptoren (CD163, CD206) exprimieren sie auch Chemokin- und Zytokinrezeptoren (Taylor et al., 2004). Die wohl wichtigste Funktion ist die Erkennung und Beseitigung von Mikroorganismen sowie der Abbau toter oder nekrotischer Zellen (Hochreiter-Hufford and Ravichandran, 2013; Murray and Wynn, 2011b). Erstere werden an Hand der PAMPs (*Pathogen-associated molecular patterns*), wie zum Beispiel bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), erkannt und über Phagozytose aufgenommen und abgetötet (Aderem and Underhill, 1999). Zur Eliminierung von Pathogenen sind Makrophagen auch in der Lage reaktive Sauerstoffverbindungen (*reactive oxygen species*, ROS) und Stickstoffmonoxid (*nitric oxide*, NO) zu produzieren (Ding et al., 1988). Diese Substanzen sorgen neben dem Abtöten der Pathogene auch für die Gewebeerstörung (Halliwell, 2006; Splettstoesser and Schuff-Werner, 2002). Makrophagen sind ebenfalls in der Lage als Antigenpräsentierende Zelle zu agieren. Sie tragen durch die Expression von co-stimulatorischen Molekülen wie CD80/86 sowie MHC-II zur Aktivierung von T-Zellen (Duncan and Swain, 1994; Sharpe and Freeman, 2002; Unanue, 1984) sowie über die Sezernierung von Zytokinen zu deren spezifischer Entwicklung bei (Curtsinger et al., 1999; Paul and Seder, 1994). Auf der anderen Seite sind sie auch

für die Gewebereparatur zuständig (Brancato and Albina, 2011; Chazaud, 2014; Mantovani et al., 2013) und können auch anti-inflammatorische Substanzen bilden (Arango Duque and Descoteaux, 2014). Sie tragen ebenfalls zur Gewebemöostase bei indem sie nekrotische Zellen phagozytieren. So können die im Zentralnervensystem (ZNS) ansässigen Mikroglia apoptotische Neuronen und Gliazellen entfernen (Ferreira and Bernardino, 2015). Die in der Leber befindlichen Kupfer-Sternzellen übernehmen neben der Eliminierung von Pathogenen auch die Neutralisierung von Toxinen (Naito et al., 2004), die in der Milz vorhandenen Makrophagen sind verantwortlich für die Entfernung von Erythrozyten (Bennett and Kay, 1981). Makrophagen sorgen aber auch durch die Produktion von Zytokinen, Chemokinen und anderen löslichen Substanzen für die Einwanderung und Polarisierung von Immunzellen (Arango Duque and Descoteaux, 2014; Gordon et al., 2014).

### **2.1.2.      Polarisierung von Makrophagen**

Die Funktion der Makrophagen hängt maßgeblich von ihrem Phänotyp ab und damit von ihrer Aktivierung. Die Subpopulationen innerhalb der Makrophagen sind sehr zahlreich und die Unterscheidung ist oft nur schwer möglich. Die Nomenklatur der einzelnen Untergruppen ist bis heute nicht immer eindeutig (Murray et al., 2014; Murray and Wynn, 2011a; Sica and Mantovani, 2012). Daher unterteilt man derzeit die Makrophagen, analog zu den T-Zellen, in M1- (klassisch aktivierte Makrophagen) und M2- (alternativ aktivierte Makrophagen) Makrophagen (s. Abb. 1) (Martinez and Gordon, 2014). Die klassische Aktivierung von Makrophagen führt zu M1-Makrophagen und erfolgt über Lipopolysaccharide (LPS), wobei diese von Interferon  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) unterstützt wird. Dies hat die Induktion von Stat1 (*signal transducers and activators of transcription-1*) über den Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4) sowie über den IFN $\gamma$ -Rezeptor zur Folge. Dies führt zur Aktivierung von NF $\kappa$ B (*Nuclear factor kappa B*) sowie IRF5 (*Interferon regulatory factor 5*), was zur Expression zahlreicher pro-inflammatorischer Gene führt (Lawrence and Natoli, 2011a). Sie kennzeichnen sich durch die Sezernierung pro-inflammatorischer Mediatoren, wie Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  oder IL-12, und die vermehrte Expression von MHC-II, das wichtig für die Antigenpräsentation ist, sowie der co-stimulatorischen Moleküle CD80/86 (Martinez and Gordon, 2014; Sica and

Mantovani, 2012). Sie bilden vermehrt NO sowie ROS (Ding et al., 1988) und sind damit verantwortlich für Tumoreleminierung (Ushio et al., 1996) sowie die Pathogenabwehr (Martinez and Gordon, 2014; Mosser and Edwards, 2008; Murray and Wynn, 2011b).



**Abb. 1: Polarisation von Makrophagen**

Überblick über die verschiedene Polarisierungen von Makrophagen. Die Einteilung erfolgt in M1- und M2-Makrophagen. Klassisch aktivierte (M1) Makrophagen werden durch LPS mit Hilfe von IFN $\gamma$  induziert, spielen eine Rolle bei der Pathogenabwehr und sind für Gewebeschädigung zuständig. Sie charakterisieren sich durch die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine sowie ROS und NO. Zudem werden MHC-II und co-stimulatorische Moleküle vermehrt exprimiert. Die M2-Makrophagen sind eine heterogene Gruppe bestehend aus vielen unterschiedlichen M2-Subtypen. Sie werden durch alternative Aktivierung induziert. Dies geschieht zum einen über IL-4/IL-13, was zu einer Induktion von CD206, Ym1 und Arg1 führt, wodurch Wundheilungsmakrophagen (M2a) entstehen, die auch bei der Abwehr von Parasiten eine Rolle spielen. Zum anderen werden durch IL-10, TGF $\beta$  oder Glukokortikoide (GKs) supprimierende bzw. regulierende Makrophagen (M2c) erzeugt. Diese zeichnen sich, wie auch die Wundheilungsmakrophagen, durch die Sezernierung von anti-inflammatorischen Zytokinen und der vermehrten Expression von CD163 aus. Außerdem ist bei ihnen die Expression von MHC-II, den co-stimulatorischen Molekülen sowie NO reduziert. (Arg1 – Arginase1, iNOS – induzierbare NO-Synthase) (modifiziert nach: (Benoit et al., 2008).

Demgegenüber steht die große Gruppe der M2-Makrophagen oder auch alternativ aktivierte Makrophagen genannt. Die in der Literatur am häufigsten beschriebene alternative Aktivierung erfolgt über IL-4 und/oder IL-13 (Gordon, 2003). Diese hat zur Folge, dass z. B. der Mannose-Rezeptor (CD206) (Stein et al., 1992), das Enzym Arginase 1 (Arg1) (Munder et al., 1999; Pauleau et al., 2004), welches gegensätzlich zu induzierbaren Stickstoffmonoxid-Synthase (*Inducible nitric oxide synthase*, iNOS) agiert (Rath et al., 2014), vermehrt exprimiert wird. Diese Makrophagen findet man im Zusammenhang mit Parasiteninfektionen, wie z. B. Helminthen (Gordon, 2003; Mosser and Edwards, 2008). Die Funktion dieser Makrophagen ist gekennzeichnet aus einer Förderung der Th2-Antwort (Gordon and Martinez, 2010; Wang et al., 2014; Zanluqui et al., 2015) und der vermehrten Wundheilung (Gewebereparatur) (Ferrante and Leibovich, 2012). Induziert wird diese Polarisation über den IL-4-Rezeptor und STAT6 sowie PPAR $\gamma$  (*Peroxisome proliferator-activated receptor*) (Szanto et al., 2010) und IRF4 (Lawrence and Natoli, 2011a). Eine eigenständige Gruppe innerhalb der alternativ aktivierten Makrophagen bilden die supprimierenden bzw. regulierenden Makrophagen. Diese Gruppe wird durch Stimuli wie TGF $\beta$  (*Transforming growth factor*), IL-10 oder Glukokortikoide induziert (Gordon, 2003; Martinez et al., 2009). Dabei wird unter anderem die Expression von CD163 gefördert (Kowal et al., 2011; Schaer et al., 2001). Sie inhibieren durch die Bildung von IL-10 (Frankenberger et al., 2005), TGF $\beta$  oder anderer anti-inflammatorischer Zytokine die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und wirken somit regulierend auf die Immunantwort und Entzündungsreaktionen (Mosser and Edwards, 2008). Außerdem sind diese Makrophagen in der Lage regulatorische T-Zellen (Treg) zu induzieren (Cao et al., 2010). Weitere Kennzeichen sind die Reduzierung von MHC-II bzw. von co-stimulatorischen Molekülen und somit sowohl der Antigenpräsentation als auch der T-Zellaktivierung sowie iNOS (Ding et al., 1993; Gordon, 2003; Li et al., 2001; van de Garde et al., 2014). Die transkriptionelle Kontrolle erfolgt über STAT3, sowie den Glukokortikoidrezeptor (s. Kap. 2.3.) (Martinez and Gordon, 2014; Sica and Mantovani, 2012; Tugal et al., 2013).

### **2.1.3. Makrophagen und inflammatorische Erkrankungen**

Makrophagen spielen bei einer Vielzahl von inflammatorischen Erkrankungen eine Rolle (Liu et al., 2014). Das Spektrum umfasst dabei z. B. die Mitwirkung an neurodegenerativen Erkrankungen (Multiple Sklerose, MS), Tumorgesese,

kardiovaskulären Erkrankungen (Arteriosklerose) oder metabolischen Erkrankungen (Typ 2 Diabetes (T2D) sowie der Graft-versus-Host-Krankheit (*Graft-versus-Host disease*, GvHD). Meist beruht die Wirkung von Makrophagen auf sezernierten Entzündungsmediatoren wie Zytokinen, z. B. TNF $\alpha$ , Chemokinen und anderen Signalmolekülen, wie NO oder ROS, die dann Immunzellen rekrutieren bzw. polarisieren und das umliegende Gewebe schädigen (Fujiwara and Kobayashi, 2005). Des Weiteren erfolgt die Sezernierung von Faktoren, die die Gewebeneu- oder –umbildung induzieren (Fibrose) (Lech and Anders, 2013). Im weiteren Verlauf soll kurz die Wichtigkeit der Makrophagen bei der Pathogenese verschiedener Erkrankungen beschrieben werden.

Makrophagen sind wichtige Effektorzellen während der Pathogenese von MS, da sie unter anderem zur Demyelinisierung der Axone beitragen. Zum einen werden Monozyten angelockt ins ZNS und differenzieren zu M1-Makrophagen. Zum anderen finden sich aktivierte Mikroglia. Diese sezernieren Zytokine bzw. weitere Mediatoren, die dann T-Zellen rekrutieren und in Th1-Richtung polarisieren, was die Entzündung fördert und die Pathogenese vorantreibt (Bogie et al., 2014; Brück et al., 1996).

Beim T2D polarisieren ins Fettgewebe eingewanderte Monozyten sowie ausdifferenzierte Makrophagen durch von Adipozyten sezernierte Zytokine in M1-Richtung und beeinflussen auf diese Weise den Glukosestoffwechsel. Dabei ist TNF $\alpha$  entscheidend. Es ist in der Lage die Expression von Genen für die Glukoseregulation zu hemmen, beispielsweise den Glukosetransporter 4 (GLUT-4) (Lumeng et al., 2007), sodass es zu einer Insulinresistenz kommt. Die Sekretion von pro-inflammatorischen Mediatoren induziert zum Beispiel NF $\kappa$ B-Signalwege und fördert damit die Produktion weiterer pro-inflammatorischer Zytokine, Chemokine und weiterer Mediatoren, die die Entzündung fördern (Espinoza-Jiménez et al., 2012; Olefsky and Glass, 2010).

Daneben sind Makrophagen ebenfalls ein wesentlicher Bestandteil bei der Entstehung der Arteriosklerose. Dabei rekrutieren Apolipo-Protein B-haltige Aggregate in den Gefäßwänden Monozyten, die daraufhin einwandern und zu Makrophagen differenzieren. Diese tragen dann aktiv zur Entstehung der sogenannten Plaques bei und spielen auch bei der voranschreitenden Arteriosklerose eine Rolle, die letztendlich in der Thrombenbildung, Herzinfarkt oder Schlaganfall endet. Th1-T-Zellen sorgen durch IFN $\gamma$ -Sekretion für die Aktivierung von Makrophagen und die Bildung sogenannter Schaumzellen, die durch

Cholesterinaufnahme entstehen (Gui et al., 2012; Moore et al., 2013; Moore and Tabas, 2011).

Weiterhin spielen Makrophagen auch bei der GvHD (s. Kap. 2.2.4.), einer schweren Komplikation nach Stammzelltransplantation, eine wichtige Rolle. Sie sorgen durch Sezernierung pro-inflammatorischer Zytokine bzw. weiterer Mediatoren für die Aufrechterhaltung der Entzündung. Daneben sind sie selbst aktiv an der Gewebeerstörung beteiligt. Auf diese Erkrankung wird in Kapitel 2.2.4. noch einmal vertiefend eingegangen.

#### **2.1.4. Makrophagen als zelluläre Therapie**

Auf Grund ihres variablen Phänotyps und der Möglichkeit Makrophagen über alternative Aktivierung in immunmodulatorische Zellen umzuwandeln, rücken diese in den Fokus klinischer Forschung als zellbasierte Therapie. Durch den adoptiven Transfer polarisierter Makrophagen kann die Schwere inflammatorischer Erkrankungen beeinflusst werden. Derzeit gibt es schon Beispiele für die Anwendung derartiger M2-Makrophagen im murinen Modell (Cao et al., 2010; Hunter et al., 2010; Ma et al., 2015; Parsa et al., 2012; Zhang et al., 2014; Zheng et al., 2011).

So zeigten Parsa et al., dass mit IL-4, IL-10 und TGF $\beta$  behandelte Makrophagen einen anti-inflammatorischen Phänotyp aufwiesen, der T1D in *non obese diabetic* (NOD)-Mäusen verhindert. Dabei demonstrierten sie, dass die *ex vivo* generierten Makrophagen gezielt in das Pankreas einwanderten. Die positiven Eigenschaften beruhen dabei auf einer unterdrückten T-Zell-Proliferation *in vivo* sowie einer vermehrten Induktion von Treg-Zellen durch TGF $\beta$  (gezeigt *in vitro*) Produktion (Parsa et al., 2012). Dieser protektive Effekt wurden auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Zheng et al., 2011).

M2-Makrophagen besitzen auch positive Effekte bei Rückenmarksverletzungen bzw. neurodegenerativen Erkrankungen. Ma et al. zeigten, dass sich Bewegungseinschränkungen nach Rückenmarksverletzungen im Rattenmodell durch adoptiven Transfer von M2-Makrophagen zurückbildeten. Der beschriebene Effekt ist dabei auf einen Th1- zu Th2-Wechsel zurückzuführen. Außerdem wird durch die applizierten Zellen eine Umgebung geschaffen, die zur Erneuerung bzw. Heilung der verletzten Neuronen führt (Ma et al., 2015). Ein anderes Beispiel präsentierten Zhang et al., die durch adoptiven Transfer von *ex vivo* in M2-Richtung polarisierten Mikroglia positive

Wirkungen bei der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) erzielen. Auch hier wird beschrieben, dass die eingewanderten Mikroglia das Th-Milieu beeinflussen und diese direkt in die Immunantwort eingreifen, indem sie auf T-Zellen und Makrophagen Einfluss nehmen. So werden beispielsweise M1-Marker reduziert und die Bildung von Treg-Zellen induziert (Zhang et al., 2014).

Auch bei Nierenerkrankungen sind M2-Makrophagen als potentielle Therapie im Mausmodell beschrieben (Cao et al., 2010). Wang et al. demonstrierten, dass der Transfer von M2-polarisierten Milzmakrophagen die klinische Symptomatik der Adriamycin-Nephropathie, einem experimentellen Modell für chronische Nierenerkrankungen, verbesserte. Beschrieben wurde das zielgerichtete Einwandern der generierten Makrophagen in die Niere, Milz und Leber sowie eine verringerte Gewebeschädigung in der Niere. Dies erklärt sich mit der Induktion der Gewebereparatur zum Beispiel durch Förderung der Proliferation renaler Epithelzellen (Wang et al., 2007).

Zusammengefasst lassen sich die positiven Einflüsse bei einer Therapie mit M2-polarisierten Makrophagen, durch adoptiven Transfer, damit begründen, dass die transferierten Makrophagen regulierend einwirken, indem sie direkt Immunzellen beeinflussen, z. B. durch die Induktion von Treg-Zellen, bzw. die Produktion von Entzündungsmediatoren wie pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen hemmen sowie die Gewebereparatur fördern.

## **2.2. Graft-versus-Host Disease**

### **2.2.1. Hämatopoetische Stammzelltransplantation**

Unter hämatopoetischer Stammzelltransplantation (HSZT) versteht man den Transfer von hämatopoetischen Stammzellen von einem Spender (Donor) in einen Empfänger (Rezipienten). Handelt es sich bei Donor und Empfänger um ein und dieselbe Person so spricht man von autologem Transfer. Sind es dagegen verschiedene Personen so handelt es sich um eine allogene Transplantation. Möglich ist außerdem die syngene Transplantation, bei der Donor und Empfänger eineiige Zwillinge sind (Copelan, 2006; Passweg et al., 2012). Die Indikationen für eine HSZT sind vor allem hämatologische Erkrankungen, wie die akute bzw. chronische myeloische oder lymphatische Leukämie, Hodgkin bzw. Non-Hodgkin Lymphom, aber auch schwere

Immundefizienzen (Wiskott-Aldrich-Syndrom, SCID) und Störungen der Immunregulation (*X-linked* Lymphoproliferative Erkrankung) sowie vererbte oder erworbene Störungen der Blutbildung (Holowiecki, 2008; Lankester et al., 2005; Passweg et al., 2012; Roifman et al., 2010; Slatter and Cant, 2011). Die Entdeckung der MHCs in Mäusen (*Major Histocompatibility Complex*) in den 30er Jahren (Gorer, 1936; Gorer et al., 1948; Snell, 1948), beim Menschen unter humanen Leukozytenantigen (HLA) bekannt und 1958 entdeckt (Dausset, 1958), machte die Auswahl von histokompatiblen Spendern möglich (Jansen, 2005; Perry and Linch, 1996).

Die Gewinnung von Stammzellen kann auf verschiedene Arten erfolgen. Zum einen kann man Knochenmark aus dem Beckenkamm entnehmen und die Stammzellen aufreinigen. Eine andere Möglichkeit stellen periphere Blutstammzellen, so genannte PBSCs (*Peripheral blood stem cells*), dar. Dabei werden die Stammzellen mittels G-CSF Gabe aus dem Knochenmark des Spenders mobilisiert und im Anschluss die Stammzellen durch Leukopherese gewonnen. Eine dritte Möglichkeit bietet Nabelschnurblut, welches direkt bei der Geburt des Kindes entnommen wird. Da die Menge der gewonnenen Stammzellen hierbei jedoch relativ gering ist, können derzeit nur Kinder damit transplantiert werden (Amos and Gordon, 1995; Smith and Wagner, 2009).

### **2.2.2. Pathogenese und Klinik**

Die GvHD ist eine schwerwiegende Komplikation nach allogener Knochenmarks- bzw. Stammzelltransplantation. Die darin enthaltenen T-Zellen sind ein wichtiges Mittel zur Bekämpfung zum Beispiel der Leukämie. Dies ist bekannt als der *Graft-versus-Leukemia* (GvL) Effekt. Daneben beschreiben schon Barnes und Loutit 1957 das Auftreten von Graft-versus-Host Reaktionen bei Mäusen, die mit chronisch starkem Durchfall bis hin zum Tod einhergeht (Barnes et al., 1956). Die Inzidenz liegt abhängig von der MHC-Ähnlichkeit des Spender bei 35-50% und ist damit sowohl für die meisten transplantationsassoziierten Todesfälle verantwortlich als auch für die lebenslang auftretenden Symptome (Jacobsohn and Vogelsang, 2007). Unterteilen lässt sich die GvHD in eine akute (aGvHD) und eine chronische (cGvHD) Form. Die aGvHD tritt innerhalb der ersten 100 Tage nach der Transplantation auf wohingegen die cGvHD meist später ausgebildet wird. Da sich die cGvHD in ihrer Pathogenese

von der aGvHD unterscheidet und da es in dieser Arbeit nur um die aGvHD geht, soll auch nur diese im weiteren Verlauf genauer beschrieben werden.

Die aGvHD manifestiert sich besonders in der Haut, Leber und Darm. Dabei kommt es in der Haut zum Auftreten eines makulopapulösen Ausschlags. Die Wirkung der aGvHD äußert sich im Gastrointestinaltrakt durch Durchfall, Übelkeit, Abdominalschmerzen und Appetitlosigkeit. Die aGvHD findet sich besonders im Darm. Sie kennzeichnet sich durch Zerstörung des Darmepithels mit einhergehender Permeabilität und Wasserverlust sowie Unterernährung, da die Nährstoffe nicht mehr adäquat resorbiert werden können. Außerdem kommt es zu intestinalen Blutungen. In der Leber tritt eine Hepathopathie mit veränderten Leberwerten auf (Clayburgh et al., 2004; Ferrara et al., 2009; Jacobsohn and Vogelsang, 2007; van der Meij et al., 2013).

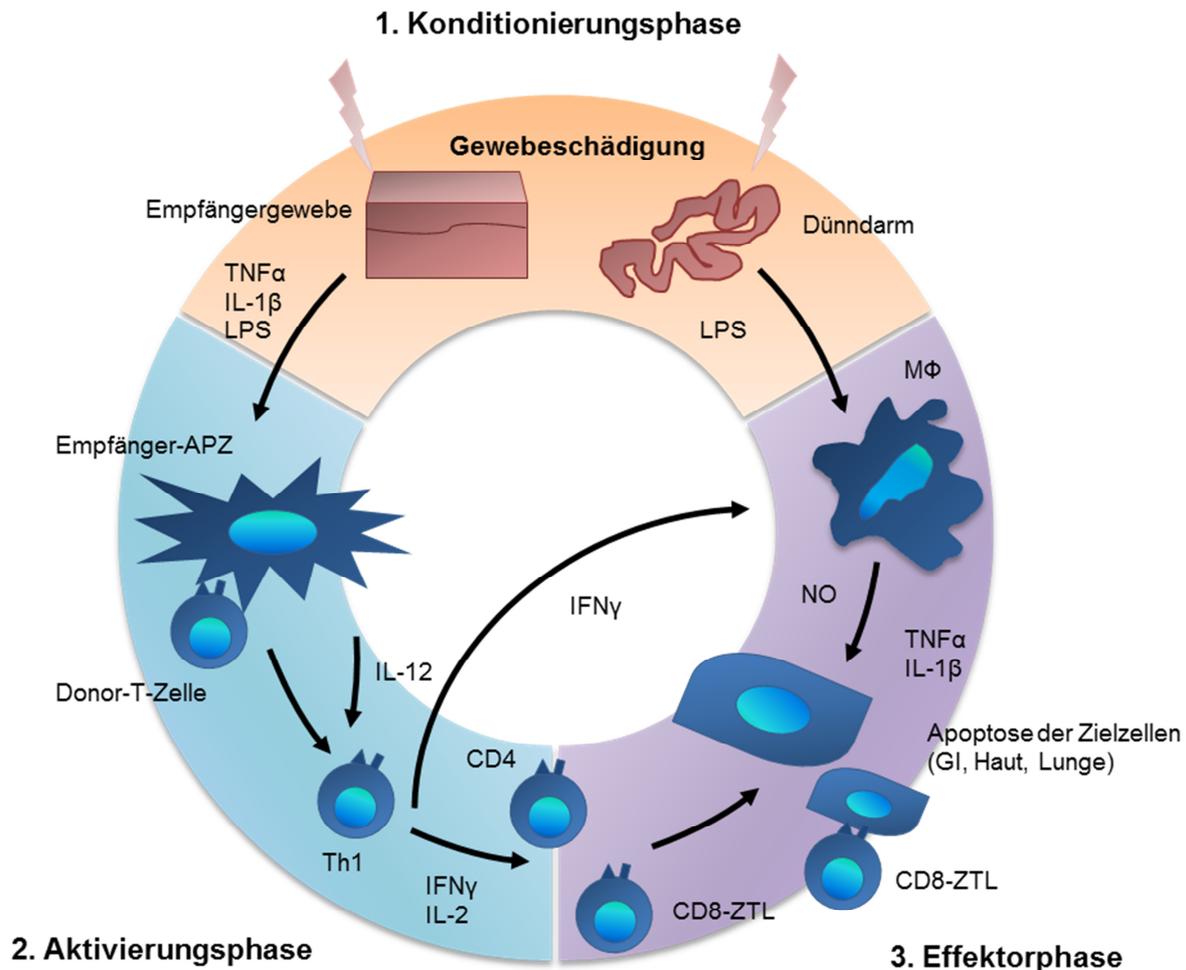
Billingham war der erste, der die Bedingungen für die Entstehung einer GvHD definierte. 1. Applikation immunkompetenter Spenderzellen, 2. der Empfänger ist immundefizient und nicht in der Lage das Transplantat abzustößen, 3. es müssen Histokompatibilitätsunterschiede zwischen Spender und Empfänger vorliegen (Billingham, 1966).

Für die Entstehung der aGvHD ist ein 3-Stufen-Modell etabliert (s. Abb. 2). Dabei spricht man in der ersten Phase von einer Konditionierungsphase. Durch Ganzkörperbestrahlung und Chemotherapie, welches die gängige Therapie bei Krebs und zur Vorbereitung auf die Transplantation darstellt, kommt es zur Gewebeschädigung im Empfänger (Ramadan and Paczesny, 2015). Dies geht einher mit der Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$  sowie IL-1 $\beta$  und IL-6. Durch die Beeinträchtigung der epithelialen Barriere kommt es, vornehmlich im Magen-Darm-Trakt, zum Übergang von Bakterien und ihren Produkten, wie beispielsweise LPS aus dem Darm ins Blut und in das umliegende Gewebe. Dadurch wird die Aktivierung der Antigenpräsentierenden Zellen (APZ) des Empfängers gefördert. Es kommt sowohl zur verstärkten Expression von MHC-II sowie co-stimulatorischer Moleküle, wie CD86, als auch von Adhäsionsmolekülen. Die MHC-Moleküle sind dabei von besonderer Bedeutung (Reddy, 2003).

Unterschiede im MHC-Haplotyp (Übereinstimmung der verschiedenen Loci) korrelieren mit dem Risiko einer aGvHD (Goulmy et al., 1996; Kanda, 2013; Park and Seo, 2012). Auch Unterschiede im Geschlecht zwischen Donor und Rezipient sowie der ethnischen Zugehörigkeit spielen eine Rolle. So ist das Risiko einer aGvHD erhöht

wenn ein männlicher Empfänger ein weibliches Transplantat erhält (Kunewick et al., 1993; Morishima et al., 2013). In der Klinik werden zumeist im MHC übereinstimmende Spenderzellen transplantiert. Trotz vorhandener MHC-Gleichheit kommt zur Ausprägung einer aGvHD. Ursache dafür sind die sogenannten miHAgs (*Minor Histocompatibility antigens*) oder auch minor MHCs (DeLuca et al., 2009; Dzierzak-Mietla et al., 2012; Goulmy et al., 1996; Shlomchik, 2007). Das sind Selbstpeptide, die aus intrazellulären Proteinen gebildet und über MHC-I oder -II präsentiert werden. Es handelt sich daher um polymorphe endogene Peptide. Sie entstehen durch Nukleotid-Polymorphismen (*Single Nucleotide polymorphism*, SNP), die zu einer veränderten Aminosäuresequenz innerhalb des Proteins führen. Diese sind dadurch funktionell nicht beeinträchtigt, können aber zu immunogenen Peptiden führen (DeLuca et al., 2009).

In der 2. Phase der aGvHD werden die infundierten Donor-T-Zellen durch die Erkennung von MHC- oder miHAg-*mismatch* aktiviert und proliferieren. Ebenso erfolgt die Ausschüttung verschiedener Zytokine wie IL-2 und IFN $\gamma$  (Ferrara, 1993; Ferrara, 2000; Reddy, 2003).



**Abb. 2: Pathogenese der aGvHD**

Durch Gewebeschädigung in der Konditionierungsphase wird das Immunsystem aktiviert, was die Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6) zur Folge hat, welche dann die Empfänger-Antigenpräsentierenden Zellen (APZs) aktivieren. Diese aktivieren und primen Donor-T-Zellen, die sich in Th1-Zellen entwickeln. Diese proliferieren und produzieren zum einen Zytokine, zum anderen wandern zytotoxische T-Lymphozyten (ZTLs) in die Zielorgane ein und sorgen dort durch verschiedene Mechanismen für eine Gewebeschädigung, was zur weiteren Aktivierung von weiteren Immunzellen führt. Lipopolysaccharid (LPS), das durch die gestörte Barriere im Darm austritt, aktiviert zusammen mit IFN $\gamma$  Makrophagen, die dann ihrerseits Zytokine und Effektormoleküle sezernieren. (adaptiert und modifiziert nach: (Ferrara et al., 2009))

Die 3. Phase wird auch als Effektorphase bezeichnet. Hierbei wandern zytotoxische T-Lymphozyten (ZTL) in das Zielgewebe ein und sorgen dort für Gewebe- und Organschädigungen durch Zytotoxizitätsreaktionen und die Bildung pro-inflammatorischer Zytokine (Ferrara, 2000; Reddy, 2003). Die Zytotoxizität kennzeichnet sich durch die Induktion der Apoptose mittels Perforin sowie Granzym und den Fas-FasL-Weg (Schmaltz et al., 2001; Tsukada et al., 1999). Beim Granzym-Perforin-Weg interagieren die ZTLs mit ihrem T-Zell-Rezeptor (TZR) mit dem MHC der Zielzelle und bilden sowohl Perforin als auch Granzym. Perforin bildet

dabei eine Pore durch die Zellmembran der Zielzelle, wodurch Granzym B in die Zelle eindringt. Dies führt zur Induktion der Apoptose (Murphy Kenneth M., 2009; Trapani and Smyth, 2002). Bei der Fas-vermittelten Apoptose wird nach einer Trimerisierung des Fas-Rezeptors Caspase 8 aktiviert, die zusammen mit dem DISC (*Death inducing signal complex*) und FADD (*Fas-Associated protein with Death Domain*) direkt über die Aktivierung weiterer Caspasen die Apoptose einleiten (extrinsischer Signalweg) (Murphy Kenneth M., 2009; Waring and Mullbacher, 1999).

Zusätzlich zur Gewebeschädigung werden pro-inflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 und IFN $\gamma$  ausgeschüttet (Ferrara, 2000). Das gebildete IFN $\gamma$  wiederum aktiviert Empfänger-Makrophagen, die daraufhin in M1-Richtung polarisiert werden. Dies geschieht mit IFN $\gamma$  allein oder unter Mitwirkung von LPS, was zur Folge hat, dass verstärkt pro-inflammatorische Zytokine (Cooke et al., 1998; Nestel et al., 1992), aber auch ROS und NO-Verbindungen sekretiert werden, was die Gewebeschädigung verstärkt (Ding et al., 1988; Fabriek et al., 2009). Das vorhandene pro-inflammatorische Milieu zieht weitere Immunzellen an, die dann ebenfalls aktiviert werden, was zu einer Verstärkung der Immunantwort führt (Jaksch et al., 2005; Mapara et al., 2006).

### **2.2.3. Rolle der Donor T-Zellen**

Die im Transplantat enthaltenen T-Zellen des Spenders sind für viele Reaktionen von Bedeutung. Sie spielen zum einen eine zentrale Rolle bei der Entstehung der aGvHD, zum anderen sind sie verantwortlich für den GvL-Effekt und damit für die Tumorbekämpfung (Bleakley and Riddell, 2004; Kolb, 2008; Marmont et al., 1991). Die Donor-T-Zellen wandern in die sekundär-lymphatischen Organe ein und interagieren dort mit den Empfänger-APZs (Beilhack et al., 2008; Silva et al., 2010; Wen et al., 2013). Sowohl CD4<sup>+</sup>- als auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen sind entscheidend in die Pathogenese der aGvHD involviert (Truitt and Atasoylu, 1991). Nach erfolgtem *Priming* durch die Empfänger-APZs wird die Immunantwort induziert (Wen et al., 2013).

Für die Produktion der Zytokine sind die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen zuständig (Yi et al., 2009). Th1-Zellen entwickeln sich unter Aktivierung in Gegenwart von IL-12 und IFN $\gamma$  sowie unter Aktivierung des Transkriptionsfaktors T-bet (Szabo et al., 2000). T-bet ist ein

wichtiger Faktor für die T-Zellentwicklung und spielt auch bei der Entstehung der aGvHD eine wesentliche Rolle (Fu et al., 2015). Die aGvHD wird nicht nur durch das Vorhandensein von Th1-Zellen bestimmt sondern auch andere Th-Zellen sind an der Entstehung der aGvHD beteiligt. Von Bedeutung sind hierbei IL-17 produzierende Th17-Zellen (Teshima, 2011). Diese entwickeln sich unter Einfluss von IL-6, welches in der aGvHD ebenfalls verstärkt produziert wird, und TGF $\beta$  mittels Aktivierung des Transkriptionsfaktors ROR $\gamma$ t (*RAR-related orphan receptor gamma t*) (Ivanov et al., 2006) und stellen damit eine eigene Subpopulation dar (Kimura and Kishimoto, 2010). Welche genaue Rolle die Th17-Zellen jedoch im Verlauf bzw. bei der Entstehung der aGvHD spielen ist umstritten. So ist gezeigt, dass die Transplantation von *ex vivo* generierten Th17-Zellen zu einer aGvHD führt, wobei sie zumeist in der Haut manifestiert ist, wohingegen die Th1 dominierte aGvHD Schäden in Darm und Leber hervorruft (Carlson et al., 2009). Auch Iclozan et al. zeigten, dass Th17-Zellen bei der Induktion der aGvHD eine wichtige Rolle spielen (Iclozan et al., 2010). Hingegen zeigte eine andere Studie, dass die Defizienz von IL-17 in transplantierten T-Zellen einer starken GvHD-Symptomatik führte, was durch eine Verschiebung zu Gunsten der Th1-Antwort zu erklären ist (Yi et al., 2008).

Von weiterer Bedeutung könnten auch die Th22 bzw. IL-22 produzierenden Zellen sein (Zhao et al., 2013). Beschrieben ist ein negativer Einfluss von IL-22 auf die aGvHD in Mäusen (Zhao et al., 2014). Bei Fehlen von IL-22 verbesserte sich der Ausgang der aGvHD wobei auch der GvL-Effekt erhalten blieb (Couturier et al., 2013).

Neben den CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die mit ihrer Zytokinproduktion zum Entstehen des pro-inflammatorischen Milieus beitragen, spielen CD8<sup>+</sup>-T-Zellen eine zentrale Rolle bei der aGvHD. Sie migrieren nach Aktivierung in die Zielorgane wie Leber, Haut und Darm und sind dort für die Gewebeerstörung verantwortlich (Reddy and Ferrara, 2003; Shlomchik, 2007). Neben naiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die erst im Empfänger aktiviert werden, sind auch Gedächtnis (*memory*) CD8<sup>+</sup>-T-Zellen an der Entstehung der aGvHD beteiligt (Dutt et al., 2011; Zheng et al., 2009). ZTLs, wie CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, nutzen wie beschrieben verschiedene Wege der Apoptoseinduktion, zum einen Granzym-Perforin und zum anderen Fas-FasL-Interaktion.

#### **2.2.4. Rolle der professionellen Empfänger-APZs**

Neben den Spender T-Zellen sind auch die professionellen APZs des Empfängers sowohl für die Entstehung der aGvHD als auch für deren Stärke verantwortlich. Alloantigenexpression auf den APZs ist dabei eine wichtige Voraussetzung für die Pathogenese der aGvHD. Unter den professionellen APZs versteht man Zellen, die in der Lage sind Antigene zu prozessieren, über MHC-I und MHC-II zu präsentieren und darüber hinaus durch Expression co-stimulatorischer Moleküle T-Zellen zu aktivieren um damit eine Immunantwort auszulösen. Zu den APZs gehören Dendritische Zellen (DZ), Makrophagen sowie B-Zellen (Mellman et al., 1998; Sprent, 1995). Die DZs gehören dabei zu den potentesten APZs. Sie erkennen Antigene in der Peripherie und präsentieren diese nach Wanderung in die sekundär-lymphatischen Organe naiven T-Zellen, die daraufhin aktiviert werden (Martin-Fontecha et al., 2009). Duffner et al. zeigten in ihrem Modell, dass Empfänger-DZs allein genügten um Donor-T-Zellen zu aktivieren und damit eine aGvHD auszulösen (Duffner et al., 2004). Wie beschrieben sind die Unterschiede im MHC oder miHAGs zwischen Spender und Empfänger maßgeblich für die Entstehung der aGvHD. So führen Unterschiede im MHC-II zu  $CD4^+$ -T-Zellstimulation, wohingegen MHC-I-Unterschiede zur Stimulation von  $CD8^+$ -T-Zellen führen. Die APZs spielen in allen genannten 3 Phasen der aGvHD eine Rolle. Shlomchik et al. zeigten, dass es möglich war, durch Inaktivierung der Empfänger-APZs den Ausgang der aGvHD zu beeinflussen (Shlomchik et al., 1999).

Die Empfänger-APZs können auch nach der Bestrahlung oder erfolgter Chemotherapie über mehrere Wochen im Organismus erhalten bleiben (Chan et al., 2003; Haniffa et al., 2009; Merad et al., 2004). Dabei persistieren organständige Makrophagen und Langerhans-Zellen am längsten. Dies hat zur Folge, dass diese weiterhin Antigene präsentieren und damit Spender-T-Zellen stimulieren (Merad et al., 2004; Zhang et al., 2002a). Wie im Kapitel 2.2.2. erwähnt führen Bestrahlung und Chemotherapie in der Konditionierungsphase zur Schädigung des Gewebes und Zerstörung der Barrierefunktion im Darm oder der Haut (Hill et al., 1997; Hill and Ferrara, 2000; van der Velden et al., 2010). Damit einhergehend dringen Mikroorganismen in das umliegende Gewebe ein und stimulieren durch ihre Produkte, wie LPS oder andere PAMPs die APZs. Damit hat die mikrobielle Flora auch einen wichtigen Einfluss auf die Entstehung und die Pathogenese der aGvHD (Penack et al., 2010).

Besonders hervorzuheben sind die Makrophagen. Diese werden durch das LPS klassisch aktiviert, was die Expression von MHCs, co-stimulatorischer Moleküle und die Antigenpräsentation in den Makrophagen induziert (Ferrara et al., 2004; Ferrara et al., 2009; Nestel et al., 1992). Die Schädigung des Gewebes führt zur Sekretion von Zytokinen wie TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  sowie IL-6, was zu einem pro-inflammatorischen Milieu beiträgt (Ju et al., 2005). Auch die aktivierten Makrophagen zeichnen sich durch vermehrte Zytokinproduktion aus, vor allem TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 und IL-12, und sind damit für die Schaffung des Th1-Milieus mitverantwortlich (Martinez and Gordon, 2014; Murray et al., 2014; Sica and Mantovani, 2012) (Cooke et al., 1998; Nestel et al., 1992). Außerdem bilden sie ROS und NO (Ding et al., 1988), die das Gewebe schädigen (Abramson et al., 2001). Die Zytokine sorgen für die Rekrutierung von Effektor-T-Zellen und Effektorzellen wie Monozyten oder Makrophagen. In den anderen Phasen der aGvHD, wie Aktivierungs- und Effektor-Phase aktivieren die APZs die alloreaktiven T-Zellen, die daraufhin proliferieren. Sie sorgen für die Aufrechterhaltung des pro-inflammatorischen Milieus und die weitere Rekrutierung von Immunzellen (Castor et al., 2012; Ferrara, 2000; Mapara et al., 2006; Zhang et al., 2002b).

Damit stellen die APZs einen wesentlichen Bestandteil der aGvHD-Induktion und Pathogenese dar.

### **2.2.5. Therapie der aGvHD**

Das bessere Verständnis der Entstehung der aGvHD führt zu verschiedenen Ansatzpunkten für deren Therapie. Es kann systemisch behandelt oder gezielt Zellen und Signalwege beeinflusst werden (Blazar et al., 2012). Außerdem gibt es mehrere Verfahren zur präventiven Behandlung der aGvHD. Zum einen ermöglicht die Depletion von T-Zellen die Entstehung der aGvHD zu verhindern. Dies hat jedoch den Nachteil, dass der GvL-Effekt minimiert ist und somit das Risiko eines Rückfalles der Tumorerkrankung erhöht ist. Außerdem steigt das Infektionsrisiko und das Einwachsen des Transplantates (*Engraftment*) verschlechtert sich (Ho and Soiffer, 2001). Zum anderen gibt es die immunsuppressive Behandlung zur Vorbeugung der aGvHD, die aus der Gabe von Ciclosporin A (CsA), einem Calcineurininhibitor, sowie Methotrexat, einem Folsäureantagonisten mit anti-inflammatorischer Wirkung, (Choi and Reddy, 2014) (Messina et al., 2008). Die *First-line*-Therapie besteht aus der

Gabe von Glukokortikoiden (GK), wie Prednisolon, zusammen mit CsA. Auch die Kombination mit Tacrolimus, einem immunsuppressiven Wirkstoff aus der Gruppe der Calcineurininhibitoren, zeigt positive Effekte (Garnett et al., 2013; Messina et al., 2008).

Das Nichtansprechen auf eine GK-Therapie macht eine *Second-line*-Therapie erforderlich. Zum Einsatz kommen dabei spezifische Antikörper (AK), wie z. B. Daclizumab, einem anti-CD25-AK, Infliximab, einem anti-TNF $\alpha$ -AK oder Visilizumab, einem anti-CD3-AK (Bruner and Farag, 2003), sowie die Gabe von Pentostatinen, Sirolimus (Rapamycin) oder Mycophenolat. Genutzt werden auch alternative Therapien wie die extrakorporale Photophorese oder die Transplantation von mesenchymalen Stammzellen (Garnett et al., 2013). Viele der genannten Therapien befinden sich derzeit in klinischen Studien. Jedoch hat keine der genannten Therapien einen positiven Langzeiteffekt gezeigt, so dass ein Nichtansprechen auf GKs mit einer erhöhten Mortalität verbunden ist (Deeg, 2007; Messina et al., 2008).

Die weitere Erforschung neuer Therapien umfasst dabei den Einsatz von Antikörpern (anti-CD147, anti-CD20 oder anti-IL-6-Rezeptor-AK), Inhibitoren, wie CCR5- oder mTor-Inhibitoren, Zytokinen, wie die Gabe von niedrigdosiertem IL-2, oder Chemotherapeutika, wie Pentostatin oder Cyclophosphamid, als auch die Beeinflussung des Mikrobioms und zelluläre Therapien, wie regulatorische T-Zellen oder mesenchymale Stammzellen (Blazar et al., 2012). Jedoch bleibt die Anwendung von Glukokortikoiden in hohen Dosen über einen sehr langen Zeitraum indiziert und bleibt damit der Standard bei der aGvHD-Therapie.

## **2.3. Glukokortikoide**

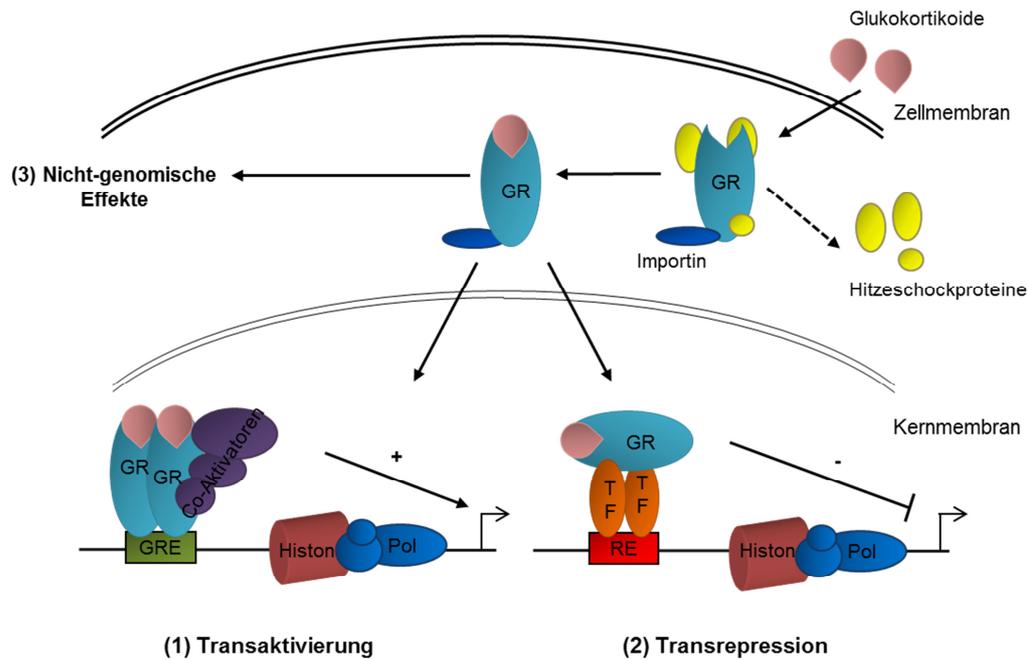
### **2.3.1. Wirkung von Glukokortikoiden**

Glukokortikoide gehören zu den Steroidhormonen, die in der Nebennierenrinde produziert werden. Im Menschen kommen dabei Cortisol und in der Maus Corticosteron vor. Die Synthese erfolgt von Cholesterin in den Mitochondrien und dem endoplasmatischen Retikulum der Nebennierenzellen. GKs wirken auf viele Organe und Zellen des Organismus. Die Wirkung erfolgt dabei über den Glukokortikoidrezeptor (GR), der ubiquitär exprimiert wird (Chrousos and Kino, 2005), im Besonderen jedoch in Leber, Fettgewebe, Muskulatur und lymphatischem

Gewebe (Pujols et al., 2002). Sie können aber auch an den Mineralokortikoidrezeptor (MR) binden und Effekte auslösen (Brem, 2012; Funder, 2005). Die Produktion der GKs wird über die Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenachse (*Hypothalamic-pituitary-adrenal axis*, HPA) reguliert. Dabei bildet der Hypothalamus CRH (*Corticotropin releasing hormon*) und stimuliert damit die Bildung von adrenocorticotropem Hormon (ACTH) in der Hypophyse, was zur Cortisolbildung in den Nebennieren führt (Turnbull and Rivier, 1999). Die Bildung der GKs unterliegt einem zirkadianen Rhythmus, wobei der Höhepunkt beim Menschen in den Morgenstunden liegt. Außerdem beeinflussen Stress, körperliche Arbeit und Entzündungen die Ausschüttung von GKs. GKs spielen eine wesentliche Rolle bei vielen physiologischen Prozessen, wie dem Stoffwechsel (Förderung der Glukoneogenese), Wasser-Elektrolyt-Haushalt, Wachstum und Entwicklung, der Immunregulation, da sie entzündungshemmende Eigenschaften besitzen, aber sie besitzen auch eine zentralnervöse Wirkung (Verhalten und andere kognitive Funktionen) (McKay LI, 2003; Sapolsky et al., 2000).

Man kann bei den GKs verschiedene Wirkungsmechanismen unterscheiden. Zum einen gibt es genomische Effekte, die sich in Transaktivierung und –repression unterteilen und die nicht-genomischen Effekte (Coutinho and Chapman, 2011). GKs wirken über die Bindung an den Glukokortikoidrezeptor (GR), der zytoplasmatisch vorliegt. Der GR besteht aus drei funktionellen Domänen, der Transaktivierungsdomäne am N-Terminus, der DNA-Bindedomäne (DBD) und der C-terminalen Liganden-Bindungsdomäne (LBD). Dabei beinhaltet die DBD zwei Zinkfinger motive und hochkonservierte Bereiche, die die Konformation und die Aktivität des GR beeinflussen. Die LBD umfasst eine Bindestelle für das Steroidhormon sowie Sequenzen für die Kerntranslokation als Domänen für die Interaktion mit Chaperonen und Transkriptionsfaktoren (Bledsoe et al., 2002). Wenn kein GK gebunden ist, liegt der GR inaktiviert und gebunden an einen Multi-Protein-Komplex aus Chaperonen, vor allem *Heatshock*-Proteine (HSP), im Zytoplasma vor. Der Komplex verhindert dabei die Translokation in den Kern. Gelangen GKs über Diffusion in die Zelle binden sie an den GR und der Komplex dissoziiert vom GR. Der Transport in den Kern ist Chaperon-abhängig (Importin und Dynein) und erfolgt entlang der Mikrotubuli. Im Kern kann der GR die Genexpression auf unterschiedliche Arten beeinflussen (s. Abb. 3) (Vandevyver et al., 2012a; Vandevyver et al., 2014). Zum einen durch Transaktivierung, die zur Aktivierung

GK-abhängiger Gene führt. Für die Transaktivierung ist die Dimerisierung des GR erforderlich. Das gebildete Homodimer bindet an Glukokortikoid-responsive Elemente (GRE) und interagiert dabei mit dem N-terminalen Zinkfingermotiv, auch P-Box genannt. Dies führt zur Rekrutierung von Co-Aktivatoren, mit denen der aktivierte GR interagiert. Gleichzeitig finden Wechselwirkungen mit dem Transkriptionsapparat statt, was zur Induktion der Transkription von Genen führt (Bledsoe et al., 2002; Rhen and Cidlowski, 2005; Vandevyver et al., 2013). Auch der Phosphorylierungsgrad bzw. die Phosphorylierung des GR spielen eine große Rolle für seine Struktur und Funktion (Kumar and Calhoun, 2008). Der GR kann jedoch die Genregulation auch in negativer Weise beeinflussen. Dies geschieht über Transrepression. Diese erfolgt über die Bindung des monomeren GR an DNA-gebundene Transkriptionsfaktoren, wobei eine direkt Bindung des GR an die DNA nicht notwendig ist (Reichardt et al., 2001). Ein Beispiel ist die Interaktion mit den aktivierenden Protein-1 (AP-1) (Tuckermann et al., 1999) und NFκB (Adcock and Caramori, 2001; De Bosscher et al., 2003; Glass and Saijo, 2010; Refojo et al., 2001). Damit erfolgt die Regulation von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNFα, IL-1β, IL-6 und IL-2, oder auch iNOS (Barnes, 2011; Coutinho and Chapman, 2011). Zur genaueren Charakterisierung des Mechanismus des GR macht man sich die GR<sup>dim</sup>-Maus zu Nutze. Diese Maus hat eine Punktmutation in der D-Schleife des zweiten Zinkfingers des GR, was einen Aminosäureaustausch zur Folge hat und damit ist der GR nicht mehr in der Lage zu dimerisieren (Reichardt et al., 1998).



**Abb. 3: Wirkungsmechanismen von GKs über den Glukokortikoidrezeptor**

Die Glukokortikoide binden an den GR und können dann, nach erfolgter Translokation in den Kern, über verschiedenen Mechanismen wirken. (1) Durch Dimerisierung des GR und durch direkte Bindung an die DNA (GREs) erfolgen unter Mithilfe von Co-Aktivatoren die Transaktivierung und damit die Förderung der Genexpression. (2) Die Bindung des monomeren GRs an DNA-gebundene Transkriptionsfaktoren ermöglicht die Transrepression von Genen. Zudem gibt es noch die kernunabhängige nicht-genomische Wirkung (3), durch direkte Interaktion der GKs mit dem membranständigen oder zytosolischen GR, Membranen oder *second Messengern*.

GR - Glukokortikoidrezeptor; GRE – Glukokortikoid-responsives Element; RE – responsives Element; TF – Transkriptionsfaktor (adaptiert und modifiziert nach: (Tuckermann et al., 2005))

Beschrieben sind zudem nicht-genomische Effekte, die innerhalb kurzer Zeit, Sekunden bis Minuten, erfolgen können. Dabei unterscheidet man verschiedene Effekte beruhend auf der Interaktion der GKs mit biologischen Membranen, Interaktion mit einem membranständigen GR und Interaktion mit dem zytosolischen GR. Den Einfluss, den nicht-genomische Effekte haben, ist jedoch umstritten (Jiang et al., 2014; Stellato, 2004). Dennoch nimmt die Bedeutung dieser Effekte zu (Alangari, 2010; Lösel et al., 2003; Stahn et al., 2007).

### 2.3.2. Glukokortikoide in der Regulation des Immunsystems (T-Zellen, APZs)

Die GKs regulieren das Immunsystem auf vielfältige Weise. Der GR ist in allen Immunzellen exprimiert (Miller et al., 1998) und reguliert so ihre Eigenschaften (Zen et al., 2011). Beschrieben werden sollen an dieser Stelle die Wirkung von GKs auf

T-Zellen sowie APZs, da diese für die Entstehung einer aGvHD bzw. für ihren weiteren Verlauf von entscheidender Bedeutung sind (Ferrara et al., 2004; Reddy and Ferrara, 2003).

T-Zellen und ihre Funktion bzw. Aktivität werden durch GKs auf mehrere Arten beeinflusst. Beschrieben ist u. a., dass durch GKs die Proliferation gehemmt wird (Gillis et al., 1979). Außerdem induzieren GKs Apoptose in T-Zellen und Thymozyten. Dies geschieht über die Induktion von pro-apoptotischen Molekülen wie den BH3-only Proteinen (Herold et al., 2006; Strasser, 2005). GKs beeinflussen ebenfalls die T-Zellentwicklung, wie die Selektion im Thymus (Ashwell et al., 2000; Vacchio and Ashwell, 2000). Beschrieben ist das Zusammenspiel von TZR- und GR-induzierter Apoptose (Herold et al., 2006; Vacchio and Ashwell, 2000).

Zusätzlich wird bei T-Zellen die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine, wie IL-2 (Northrop et al., 1992; Redondo et al., 1988) und IFN $\gamma$ , sowie bestimmter Chemokine durch GKs unterdrückt (Liu et al., 2009; Rook and Lightman, 1997). Funktionell werden T-Zellen ebenfalls beeinflusst. Zum einen ist die Migationsrate erniedrigt, da die Morphologie der T-Effektorzelle verändert wird (Muller et al., 2013). Außerdem ist auch die Zytotoxizität herabgesetzt (Schleimer et al., 1984). Zum anderen ist auch eine Veränderung des Th-Milieus hin zu Th2 zu beobachten (Elenkov, 2004).

APZs werden durch GKs ebenfalls unterschiedlich beeinflusst. Wie in Kapitel 2.1.2. bereits erwähnt polarisieren GKs Makrophagen in M2-Richtung mit suppressiven Charakteristika, was mit einer veränderten Gen- und Proteinexpression einhergeht. So werden Adhäsionsmoleküle, co-stimulatorische Moleküle und MHC-II reduziert (Heasman et al., 2004; van de Garde et al., 2014). Damit wird die Prozessierung und Präsentation von Antigenen sowie die Interaktion mit T-Zellen gehemmt (Mosser and Edwards, 2008). Die Expression von CD163, einem *Scavenger*-Rezeptor, wird induziert (Buechler et al., 2000; Schaer et al., 2002). Ebenso erhöht sich die Phagozytose (Giles et al., 2001; McColl et al., 2009; McColl et al., 2007; van der Goes et al., 2000). Zudem ist die Zytotoxizität der Makrophagen betroffen, da die Produktion von ROS und NO reduziert wird (Di Rosa et al., 1990; Schaffner and Schaffner, 1987). Es wird durch die GKs auch die Synthese von pro-inflammatorischen Zytokinen negativ beeinflusst (Li et al., 2001).

Neben den Makrophagen wirken GKs auch auf DZs. Auch ihre Fähigkeit Antigene zu präsentieren und T-Zellen zu stimulieren wird inhibiert. Betroffen ist auch die Reifung und Differenzierung der DZs (Rozkova et al., 2006). Moser et al. zeigten

GK-vermittelte Effekte in DZs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Moser et al., 1995). Die Zytokinexpression ist auch verändert, wobei anti-inflammatorische Zytokine sezerniert werden. (de Jong et al., 1999; Rea et al., 2000).

### 2.3.3. Glukokortikoide in Immunerkrankungen

Synthetisch hergestellte GKs werden bei vielen inflammatorischen Erkrankungen eingesetzt. Dazu gehören beispielsweise MS (Reichardt et al., 2006), Asthma (van der Velden, 1998), rheumatoide Arthritis (Saag, 2002), entzündlichen Darmerkrankungen (Pithadia and Jain, 2011; Sidoroff and Kolho, 2012) und aGvHD. Dabei beeinflussen GKs diverse Zelltypen (Zen et al., 2011). Die hochdosierte und langfristige Verabreichung von GKs ist zudem mit starken Nebenwirkungen verbunden (s. Kap. 2.3.4). Daher gilt es zu untersuchen welche Zellen und welche Wirkmechanismen bei der jeweiligen Erkrankung von Bedeutung sind. Wie in Kapitel 2.3.1. beschrieben erfolgt die Wirkung der GKs zumeist über den GR, der entweder direkt (über Transaktivierung) oder indirekt (über Transrepression) die Genexpression beeinflusst und u. a. eine Funktionsänderung der Zelle bewirkt. Jedoch sind die diversen Wirkmechanismen sowie der Einfluss auf die an der Erkrankung beteiligten Zellen in den verschiedenen Krankheitsmodellen von unterschiedlicher Relevanz. Zur Erforschung dieser Thematik bedient man sich spezieller Tiermodelle, wie der beschriebenen GR<sup>dim</sup>-Maus (Hübner and Tuckermann, 2012; Kleiman and Tuckermann, 2007; Reichardt et al., 1998) oder auch zellspezifischer GR-Mutanten wie der T-Zellspezifischen GR-Knockout-Maus (GR<sup>Lck</sup>, (Gu et al., 1994)) oder der myeloid-spezifischen GR-Knockout-Maus (GR<sup>LysM</sup>, (Clausen et al., 1999)) (Hübner and Tuckermann, 2012; Kleiman and Tuckermann, 2007), deren Knockout durch LoxP-Technologie erzeugt werden. Brewer et al. zeigten, dass die Wirkung des GR auf T-Zellen essentiell für die Kontrolle der T-Zellaktivierung in der gastrointestinalen Mukosa war (Brewer et al., 2003). Bei der EAE, einem experimentellen Mausmodell für MS, ist die erfolgreiche Therapie von der Wirkung der GKs auf periphere T-Zellen abhängig (Wüst et al., 2008). Baschant et al. beobachteten in ihren Experimenten mit Antigen induzierter Arthritis (AIA) ebenfalls die Wichtigkeit der Glukokortikoidwirkung auf T-Zellen (Baschant et al., 2011).

Die Wirkung von GKs auf myeloide Zellen ist bei der Behandlung der Sepsis

essentiell. Es ist beschrieben, dass ein myeloider GR-Knockout bei der Sepsis mit einer erhöhten Mortalität verbunden war (Bhattacharyya et al., 2007; Kleiman et al., 2012). Für die GK-Behandlung der Kontaktallergie (*contact hypersensitivity*, CHS) ist ebenfalls die Wirkung auf die myeloiden Zellen entscheidend (Tuckermann et al., 2007). Der Einsatz von GR<sup>dim</sup>-Mäusen macht zudem klar, dass für einige Krankheiten die durch Transrepression erzielte reduzierte Genexpression nicht auszureichen scheint um den Krankheitsverlauf positiv zu regulieren. Das ist für die Sepsis (Kleiman et al., 2012), AIA (Baschant et al., 2011) sowie CHS (Tuckermann et al., 2007) beschrieben und zeigt damit, dass die Dimerisierung des GR erforderlich ist um die Inflammation zu unterdrücken. Dagegen ist für die Suppression des durch Phorbol ester induzierten Ödems (einer irritativen Hautentzündung) eine Dimerisierung nicht notwendig (Reichardt et al., 2001).

Es bleibt zu untersuchen welcher GK-Mechanismus bei welchen Zelltypen in weiteren Erkrankungen von Bedeutung ist.

#### **2.3.4. Glukokortikoide: Nebenwirkungen und Resistenz**

Neben den vielen positiven Eigenschaften die eine GK-Therapie mit sich bringt, gibt es, vor allem bei langanhaltender Hochdosistherapie, diverse Nebenwirkungen. Dazu gehören v. a. Auswirkungen auf den Metabolismus, Gastro-Intestinale Störungen, Osteoporose oder auch Immunsuppression, die zu einer erhöhten Anfälligkeit für Infektionen führt (Schäcke et al., 2002). GKs werden zur Behandlung vieler inflammatorischer Erkrankungen eingesetzt. Die Effizienz einer Behandlung mit GKs hängt dabei maßgeblich von ihren immunsuppressiven und anti-inflammatorischen Eigenschaften ab. Die auftretenden Nebenwirkungen betreffen eine Vielzahl von Organen und beeinflussen viele physiologische Prozesse. So sind eine durch vermehrt induzierten Knochenabbau entstehende Osteoporose, Störungen der HPA-Achse oder Wundheilungsstörungen bekannt. Außerdem führen Einflüsse auf den Glukose-Stoffwechsel und andere metabolische Prozesse zu Insulinresistenz und damit zum T2D. Die auftretende Immunsuppression erhöht das Risiko an opportunistischen Infektionen zu erkranken. Einflüsse auf den Magen-Darm-Trakt, wie Geschwüre, sind ebenfalls beschrieben (Schäcke et al., 2002). Dabei hängt die Intensität der Nebenwirkungen von der Dauer der Therapie und der Konzentration der GKs ab. So sind sie bei topischer Anwendung weniger schwerwiegend als bei

systemischer Applikation, also oraler oder parenteraler Aufnahme (Schäcke et al., 2002). Wie beschrieben wirken GKs überwiegend über GR bzw. MR und regulieren über verschiedene Arten die Transkription. Die anti-inflammatorischen und immunsuppressiven Effekte werden zum einen über Transaktivierung (Mitogen-aktivierte-Proteinkinase-1 (MAPK-1), IL-10, IL-1-Rezeptor-Antagonist, GILZ, I $\kappa$ B $\alpha$ ) (Clark, 2007; Kassel et al., 2001) und zum anderen über Transrepression (Zytokine, Chemokine, Adhäsionsmoleküle) (Barnes, 2011; Refojo et al., 2001) vermittelt. Dagegen ist beschrieben, dass die Nebenwirkungen überwiegend auf der Transaktivierung beruhen (Schäcke et al., 2004). Versuche mit GR<sup>dim</sup>-Mäusen zeigten, dass diese abhängig von Krankheitsbild unterschiedlich gut auf eine GK-Therapie ansprechen und dass die Symptomatik trotz fehlender Transaktivierung verbessert werden konnte (Baschant et al., 2011; Kleiman et al., 2012; Reichardt et al., 2001; Tuckermann et al., 2007). Jedoch sind die genauen Mechanismen auf denen die GK-induzierte Nebenwirkungen beruhen noch nicht vollständig geklärt. So ist der steroidabhängige Diabetes auf transaktivierende Mechanismen der GKs zurückzuführen (Schäcke et al., 2002). Dagegen beruht die Beeinflussung der HPA-Achse (Reichardt et al., 1998), wie auch der Einfluss auf Knochen (Rauch et al., 2010) auf Transrepression. Durch die genaue Kenntnis über die Mechanismen, die zu den erwartenden Nebenwirkungen führen, gelang es selektive GR-Agonisten (SEGRA) zu entwickeln. Dabei handelt es sich um Steroide, die gezielt über Transrepression wirken, unabhängig von der Transaktivierung (Catley, 2007; Schäcke et al., 2003). Ein weiteres unerwünschtes Phänomen bei der Behandlung mit GKs ist das Auftreten von GK-Resistenzen, bei der der Patient nur ungenügend oder überhaupt nicht auf GKs anspricht. Dabei unterscheidet man sowohl eine generalisierte sowie eine lokale Resistenz gegenüber GKs als auch eine angeborene und erworbene GK-Resistenz (De Kloet et al., 1997; Werner and Brönnegård, 1996). Die Ursachen für eine GK-Resistenz sind dabei vielfältig.

Zum einen werden genetische Ursachen benannt. Mutationen im GR führen zur fehlerhaften Expression des GR (Charmandari et al., 2004). Außerdem stehen verschiedene SNPs in Verbindung mit einer GK-Resistenz (Chen and Li, 2012; Manenschijn et al., 2009; van Rossum and Lamberts, 2004). Auch eine ungenügende Expression des GR beeinflusst die Sensitivität für GKs (Wüst et al., 2008). Andere Ursachen liegen in einer beeinträchtigten Funktion des GR. Phosphorylierungen des GR sind für seine Funktion essentiell (Schaaf and Cidlowski,

2002). Die Aktivierung bestimmter Kinasen und die daraus folgenden Phosphorylierungen des GR beeinflussen seine Stabilität sowie die Interaktion mit GKs und anderen Proteinen. Die Aktivierung solcher Kinasen wie p38-MAPK oder die c-Jun N-terminale-Kinase (JNK) ist dabei zytokinabhängig (Irusen et al., 2002; Ismaili and Garabedian, 2004; Szatmáry et al., 2004). Weitere Modifikationen werden durch Nitrosylierung durch iNOS erreicht, die bei Entzündungen ebenfalls erhöht ist (Barnes and Adcock, 2009; Galigniana et al., 1999).

Als weitere Ursache für eine GR-Resistenz kommt die vermehrte Expression der GR-Isoform GR- $\beta$ , eine Spleiß-Variante des GR (Hinds et al., 2010), in Betracht (Bamberger et al., 1995; Lewis-Tuffin and Cidlowski, 2006). Pro-inflammatorische Zytokine können die vermehrte Expression von GR- $\beta$  induzieren, der dann als negativer Inhibitor fungiert (Schaaf and Cidlowski, 2002). Im Gegenzug führt beispielsweise IL-2 sowie IL-4 zur Reduktion der GR- $\alpha$  Expression (Goleva et al., 2004; Kam et al., 1993). NF $\kappa$ B kann ebenfalls die Transaktivierung des GR beeinträchtigen. Dabei wird NF $\kappa$ B durch viele pro-inflammatorische Zytokine induziert und interagiert mit dem GR (Nelson et al., 2003). Des Weiteren werden die Aktivierung von AP-1, eine veränderte Histonacetylierung sowie weitere Faktoren genannt, die an der Entstehung einer GK-Resistenz beteiligt sind (Barnes and Adcock, 2009). Bestimmte Zytokine beeinflussen die GR-Signalkaskade auf negative Weise (Pace et al., 2007). GKs ihrerseits können auch eine Reduzierung der GR-Expression einleiten (Rosewicz et al., 1988).

#### **2.4. Glukokortikoide und aGvHD**

Wie in Kapitel 2.2.5. bzw. 2.3.3. bereits erwähnt, ist in der aGvHD-Therapie die Gabe von GKs, auf Grund ihrer suppressiven Eigenschaften, indiziert. Sie wirken dabei systemisch auf das Immunsystem, darunter vor allem T-Zellen und APZs (Zen et al., 2011). Es ist jedoch noch nicht vollständig geklärt, welche Zielzellen genau durch GKs beeinflusst werden müssen, damit es zu einer verringerten aGvHD-Symptomatik kommt und welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen. Dabei steht die Frage nach der Rolle der endogenen GKs im Vergleich zu den therapeutischen GKs, wie Dexamethason (Dex) im besonderen Interesse. In früheren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe wurde die GK-Wirkung während der aGvHD in verschiedenen GR-Mutanten analysiert. Experimente mit GR<sup>dim</sup>-Mäusen als Empfänger von Wildttyp (WT)-T-Zellen in einem vollständigen *mismatch*-Modell zeigten, dass die aGvHD stärker ausgeprägt war als bei Wildtyp-Empfängermäusen. Begleitet wurde dieses

Phänomen von einem starken Anstieg von IL-6 sowie Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1 (MCP-1) im Serum der GR<sup>dim</sup>-Mäuse während der ersten Phase der Erkrankung. Es wurde ebenfalls eine signifikante Erniedrigung der Körpertemperatur und der Blutzuckerglukose in der ersten Phase der aGvHD festgestellt. Diese Ergebnisse zeigten nicht nur, dass die modulierende Wirkung der endogenen GKs über Transrepression nicht ausreichend war, um die aGvHD zu beeinflussen sondern auch, dass GKs scheinbar über die Regulation des Metabolismus Einfluss auf die aGvHD nehmen. Dieser Phänotyp der GR<sup>dim</sup>-Empfänger trat bei therapeutischer GK-Gabe, z. B. mittels Dex, nicht auf, was bedeutet, dass transaktivatorische Effekte bei einer GK-Behandlung vernachlässigbar sind (Theiss-Suennemann, 2012).

T-Zellen sind in höchstem Maße relevant für die aGvHD und es ist gezeigt, dass die Modulation von Effektor-T-Zellen den Ausgang der aGvHD essentiell beeinflusst (Shlomchik, 2007). Die Daten von Theiss-Suennemann et al. belegen die Wichtigkeit der Regulation allogener T-Zellen mittels endogener GKs. Wildtyp-Empfänger Mäuse zeigten eine erhöhte Mortalität, wenn sie mit GR-defizienten T-Zellen (GR<sup>Lck</sup>) transplantiert wurden. Zu beobachten war in diesem Zusammenhang eine erhöhte Expression von Zytokinen wie IL-2, IFN $\gamma$  und IL-17 in der Milz und im Serum sowie der für die Zytotoxizität verantwortlichen Gene Granzym B (*GrzmB*) und Perforin (*Perf*) in der Milz. Histologische Untersuchungen zeigten eine starke Schädigung des Darms mit infiltrierenden T-Zellen. Eine therapeutische Gabe von GKs in Form von Dexamethason zeigte hinsichtlich der Mortalität keine Veränderung, trotz reprimierter Expression der Zytokine. Die für die Zytotoxizität verantwortlichen Gene konnten ebenfalls nicht reprimiert werden, was den Schluss zulässt, dass der Erfolg einer GK-Therapie bei der aGvHD von dessen Wirkung auf das Infiltrationsverhalten in die Zielorgane sowie die Zytotoxizität der T-Zellen abhängt (Theiss-Suennemann, 2012; Theiss-Suennemann et al., 2015).

## **2.5. Zellbasierte Therapien**

### **2.5.1. Regulatorische T-Zellen (Treg) als aGvHD-Therapie**

Trotz des Einsatzes von Medikamenten wie z. B. GKs werden weitere Therapieformen bei der aGvHD untersucht. Ursächlich dafür ist, dass eine

Behandlung der aGvHD mittels GKs oder anderer Medikamente meist in hohen Dosen über einen langen Zeitraum erforderlich ist und eine Behandlung mit erheblichen Nebenwirkungen verbunden ist (s. Kap. 2.3.4.). Ein neuer Fokus liegt auf der Erforschung zellbasierter Therapien. Hierbei wird versucht durch adoptiven Transfer von isolierten bzw. *ex vivo* generierten und modifizierten Zellen, einen positiven Einfluss auf das Krankheitsbild zu erreichen (Wood et al., 2012). Im besonderen Interesse stehen dabei die regulatorischen T-Zellen.

1995 beschrieb S. Sakaguchi CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T-Zellen mit regulatorischer Funktion (Sakaguchi et al., 1995). Der Transkriptionsfaktor FoxP3 (*Forkhead-Box-Protein 3*) ist dabei essentiell zur Etablierung der suppressiven Charakteristika (Hori et al., 2003). Unterscheiden lassen sich natürliche Treg-Zellen (nTreg), die etwas 5-10% der CD4<sup>+</sup>-T-zellen ausmachen und bereits im Thymus entstehen, sowie die induzierbaren Treg-Zellen (iTreg) (Mills, 2004). Diese entstehen unter Mitwirkung von TGFβ und IL-2, was zur Induktion von FoxP3 führt. Treg-Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der Ausbildung der Toleranz. Sie kontrollieren u.a. die T-Zellfunktion und sorgen so für die Erhaltung des immunologischen Gleichgewichtes (Vignali et al., 2008). Dazu nutzen sie mehrere Wege. Zum einen beeinflussen sie APZs, wie DZs, durch die Expression von CTLA-4 (*cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4*), was zur Reduktion an CD80/86 in den DZs führt und damit die Interaktion mit den T-Zellen inhibiert (Wing et al., 2008). Ebenso ist beschrieben, dass eine direkte Bindung von CTLA-4 mit der Reduktion an IL-6 einhergeht (Wing and Sakaguchi, 2010). Zum anderen sezernieren sie suppressive Zytokine wie IL-10, TGFβ oder IL-35 (Vignali et al., 2008). Beschrieben ist auch ein Einfluss auf IL-2, was dazu führt, dass dieses für T-, B- und NK-Zellen nicht mehr zur Verfügung steht (Vignali et al., 2008). Treg-Zellen sind auch in der Lage mittels Zytolyse von Zielzellen mittels Granzym/Perforin Einfluss zu nehmen (Vignali et al., 2008; Wing and Sakaguchi, 2010). Diese Eigenschaften machen Treg-Zellen für eine Therapie bei der aGvHD interessant.

In mehreren Studien im murinen Modell ist beschrieben, dass der adoptive Transfer von nTreg-Zellen Zellen einen positiven Einfluss auf die aGvHD hat (Di Ianni et al., 2011; Edinger and Hoffmann, 2011; Haase et al., 2012). Dabei macht es keinen Unterschied ob die nTreg-Zellen vor der Transplantation nur isoliert oder noch *ex vivo* expandiert wurden (Edinger et al., 2003; Hoffmann et al., 2002; Taylor et al., 2002). Die Effizienz einer solchen Therapie ist jedoch abhängig vom Zeitpunkt der

Applikation. Sie ist weitaus effizienter wenn sie vor oder gleichzeitig zur Knochenmarkstransplantation erfolgt, da die transferierten Treg-Zellen die Expansion der aktivierten Effektor-T-Zellen zu einem späteren Zeitpunkt nicht mehr inhibieren können (Edinger et al., 2003; Hoffmann et al., 2002; Taylor et al., 2002). Versuche im Mausmodell mit iTreg-Zellen zur aGvHD-Therapie zeigten, dass diese kaum oder gar nicht protektiv wirksam waren, was ihrem instabilen Phänotyp geschuldet war (Beres et al., 2011; Beres and Drobyski, 2013; Koenecke et al., 2009).

Auch im Menschen ist ein Zusammenhang von Treg-Zellen und der Ausprägung der aGvHD zu erkennen. So korreliert die Schwere der aGvHD mit dem Anteil der Treg-Zellen im Transplantat (Wolf et al., 2007). Dies belegen Untersuchungen des Transplantats und im Patienten nach erfolgter Transplantation (Beres and Drobyski, 2013). Vor allem CD62L (L-Selektin) sowie bestimmte Chemokinrezeptoren sind essentiell für die positiven Effekte der Treg-Zellen (Ermann et al., 2005) (Lu et al., 2011). Die Gewinnung von Treg-Zellen ist insofern schwierig, da es wenig geeignete Marker gibt (Beres and Drobyski, 2013). Ukena et al. beschreiben  $CD4^+ CD25^+ CD127^-$  T-Zellen als geeignete Treg-Zellen für den adoptiven Transfer (Ukena et al., 2011). Derzeit zeigen erst wenige klinische Studien im Menschen, dass der Transfer von Treg-Zellen auf transplantierte Patienten positive Effekte hat, wenn die Applikation der Treg-Zellen gleichzeitig mit der Knochenmarkstransplantation oder kurz davor erfolgt (Beres and Drobyski, 2013). Besonders erfolgversprechend zeigten sich isolierte und expandierte Treg-Zellen aus Nabelschnurblut, da diese ähnliche Eigenschaften wie periphere Treg-Zellen aufweisen (Brunstein et al., 2011; Chang et al., 2005). Aber auch durch Apherese gewonnene und expandierte Treg-Zellen zeigen positive Effekte bei der aGvHD-Prävention (Di Ianni et al., 2011). Dagegen beschreibt eine erste Studie bei manifester aGvHD, dass der Einsatz von Treg-Zellen kritisch zu sehen ist, da ein positiver Effekt nicht bei allen Patienten auftrat (Trzonkowski et al., 2009).

### **2.5.2. Myeloide Therapien der aGvHD**

Neben genannten Treg-Zellen richtet sich der Fokus bei der Erforschung zellulärer Therapien bei der aGvHD auf die sogenannten regulatorischen myeloiden Suppressorzellen (RMZ). Die RMZs lassen sich in 3 Gruppen unterteilen; die myeloiden Suppressorzellen (*Myeloid-derived suppressor cells*, MDSC), die

regulatorischen (suppressiven) dendritischen Zellen und die suppressiven Makrophagen (Riquelme et al., 2012; Rosborough et al., 2014). Die MDSCs sind eine heterogene Gruppe suppressiver Zellen myeloischen Ursprungs. Sie sind in der Lage Effektor-T-Zellfunktionen zu unterdrücken und stehen im Zusammenhang mit der Tumorgenese. Sie entstehen aus granulozytären oder monozytären Vorläuferzellen unter Einfluss eines Traumas, von Infektionen oder durch Tumorzellen-assoziierte Zytokine oder Faktoren. In der Maus unterscheidet man zwei Gruppen.  $CD11b^+ Ly6c^+ Ly6G^-$ -Zellen kennzeichnen die monozytären MDSCs während granulozytäre MDSCs  $CD11b^+ Ly6c^- Ly6G^+$  sind (Gabrilovich and Nagaraj, 2009). MDSCs supprimieren viele Effektorfunktionen. So beeinflussen sie die T-Zellaktivierung und induzieren Treg-Zellen. Die Produktion von IL-10 reduziert die Expression von IL-12 in Makrophagen und auch NK-Zellen werden beeinflusst (Hoechst et al., 2009; Ostrand-Rosenberg and Sinha, 2009; Sinha et al., 2007). Durch diesen Phänotyp kann auch die aGvHD moduliert werden. Es ist gezeigt, dass eine erhöhte Anzahl an MDSCs mit der Stärke der aGvHD korreliert (Vendramin et al., 2014; Wang et al., 2013b). Derzeit gibt es nur murine Studien zum Transfer von MDSCs zur Therapie der aGvHD, wobei der Transfer zeitgleich mit der Knochenmarkstransplantation erfolgte. Erstmals beschreiben Zhou et al. den Gebrauch von MDSCs aus murinen embryonalen Stammzellen zur Therapie der aGvHD (Zhou et al., 2010). Highfill et al. zeigten, dass sich auch aus hämatopoetischen Stammzellen erfolgreich MDSCs generieren ließen, die sich zur aGvHD-Therapie eigneten. Sie nutzten dafür IL-13, einen starken Induktor für die MDSC-Entwicklung (Highfill et al., 2010). Wang et al. berichten, dass der Transfer von Milz-MDSCs, aus mit Granulozyten-Kolonie stimulierende Faktor (G-CSF) behandelten Mäusen, einen positiven Effekt auf die aGvHD hatte (Wang et al., 2013b). Ähnliche Beobachtungen wurden auch von Joo et al. gemacht (Joo et al., 2009). Der humane Phänotyp der MDSCs ist leider nicht so gut definiert. Auch im Menschen sind MDSCs monozytärer Herkunft bekannt, die sich durch suppressive Charakteristika auszeichnen. Sie exprimieren CD33, CD11b, CD14 und sind HLA-DR<sup>-</sup>. Dagegen sind die granulozytären MDSCs CD33<sup>+</sup>, CD11b<sup>+</sup>, CD15<sup>+</sup> sowie HLA-DR<sup>-</sup> (Wood et al., 2012). Ihre therapeutische Wirksamkeit bei der aGvHD ist in humanisierten Mausmodellen belegt (Janikashvili et al., 2015). Zusätzlich ist beschrieben, dass der Ausgang einer aGvHD von dem Anteil an MDSCs, der in den mittels G-CSF mobilisierten Spenderstammzellen enthalten ist, abhängt (Lv et al., 2015). Neueste Daten beschreiben einen neuen

Monozyten-Subtyp, der sich durch immunmodulierende Charakteristika auszeichnet. Diese Zellen werden durch G-CSF mobilisiert und haben im murinen Modell bereits positive Effekte bei der aGvHD erzielt (D'Aveni et al., 2015).

Neben den MDSCs werden regulatorische DZs als potentielle Therapie der aGvHD beschrieben. Diese aus Knochenmark unter Einfluss von GM-CSF, IL-10 und TGF $\beta$  entwickelten Zellen sind in der Lage die aGvHD zu beeinflussen (Scroggins et al., 2013). Dies belegen Experimente von Sato et. al. (Sato, 2003).

## 2.6. Fragestellung

GKs werden aufgrund ihrer anti-inflammatorischen Wirkung weitverbreitet als *First-line*-Therapie in der aGvHD eingesetzt. An der Pathogenese dieser Erkrankung sind sowohl alloreaktive T-Zellen als auch APZs wie beispielsweise Makrophagen essentiell beteiligt. GKs beeinflussen die Funktionen dieser Zellen und nehmen so positiven Einfluss auf den Verlauf einer aGvHD. Langfristige ist die Gabe von GKs jedoch vor allem bei hoher Dosierung mit einer Reihe von Nebenwirkungen wie Osteoporose oder Diabetes verbunden. Zudem kann es zu einer GK-Resistenz kommen, bei der der Patient kaum oder gar nicht mehr auf GKs anspricht. In dieser Arbeit sollten zwei mögliche Ansätze getestet werden, dieses Problem zu lösen.

Im ersten Teil der Arbeit sollte die Möglichkeit überprüft werden, ob eine aGvHD durch den Einsatz *ex vivo* generierter und zum M2-Phänotyp polarisierter BMDMs therapiert werden kann. Hierzu sollten Makrophagen *ex vivo* mit GKs und IL-4 zu einem regulatorischen und immunsuppressiven Phänotyp differenziert und anschließend adoptiv transferiert werden. Ähnliche Ansätze wurden bei anderen Erkrankungen bereits erfolgreich eingesetzt. In diesem Zusammenhang sollte zuerst getestet werden, ob Dex und IL-4 *in vitro* die M2-Polarisation in Hinblick auf die Expression von Markergenen und funktionelle Eigenschaften synergistisch zu beeinflussen vermögen. M2-Makrophagen, die unter optimalen Bedingungen generiert wurden, sollten dann *in vivo* in einem Mausmodell der aGvHD auf ihre Fähigkeit getestet werden, den Verlauf der Krankheit positiv zu beeinflussen. Auf dem Einsatz solcher Zellen basierende Therapien könnten möglicherweise in Zukunft als Alternative zur *in vivo* Behandlung mit GKs eingesetzt werden.

Im zweiten Teil der Arbeit sollten neue Einblicke in die Zelltyp-spezifischen Wirkungen des GKs in der Modulation der aGvHD im Mausmodell gewonnen werden, um auf diese Weise die differenzielle Relevanz der Repression einzelner Eigenschaften der T-Zellen und APZs für die GK-Therapie zu bestimmen. Durch Ausschalten des GR-Signalweges in Zelltyp-spezifischen GR knock-out Mäusen bzw. durch Funktionseinschränkung des GR in Form einer Dimerisierungsmutante sollten Effekte endogener und therapeutischer GKs bei der Regulation der aGvHD untersucht werden. Durch ein besseres Verständnis des Mechanismus der GKs im Verlaufe der aGvHD könnte es in Zukunft möglich sein, spezifischere Therapien zu entwickeln und die Ursache der GK-resistenten aGvHD aufzuklären.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1. Materialien

##### 3.1.1. Laborgeräte

Tab. 1: Laborgeräte

Gerät	Modell	Hersteller
Bestrahlungsgerät	RS255 X-Ray Research System	Gulmay Medical Systems, Surrey, UK
Blutzucker-Messgerät	Ascensia CONTOUR	Bayer, Leverkusen, Deutschland
Brutschrank	HERAcell 150 HERAcell 240	Heraeus, Hanau, Deutschland
Durchflusszytometer	FACS Canto II	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Elektrophoresekammer	Type 40-0708 Type 40-1214 Type 40-1410	Peqlab Biotechnology, Erlangen, Deutschland
Elektrophorese Netzteil	EPS 301	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Geldokumentationssystem	UV Transilluminator + Kamerasystem	Intas Science Imaging Instruments, Göttingen, Deutschland
Infrarotlampe	Balance 100W	Philips, Amsterdam, Netherlands
Kühlschrank	Liebherr Premium	Liebherr International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss, Deutschland
Laborwaage	TE313S	Sartorius, Göttingen, Deutschland
MACS	autoMACS	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland
Mikroplatten Spektrophotometer	PowerWave 340	BioTek Instruments, Bad Friedrichshall, Deutschland
Mikroskope	Televial 31 Primostar	Carl Zeiss, Oberkochen, Deutschland
Mikrowelle	R-212	Sharp, Osaka, Japan
Multisteppipette		Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Nagetierthermometer	TK9882	Bioseb, Vitrolles, Frankreich

Nanodrop	Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer	ThermoScientific, Wilmington, USA
PCR Cycler	Mastercycler EP Gradient	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
pH-Meter	766 Calimatic	Knick, Berlin, Deutschland
Pipetten	2 µl, 10 µl, 20 µl, 100 µl 200 µl, 1000 µl	Gilson, Middleton, Wisconsin, USA
Pipettierhilfe	Accu-Jet pro	Brand, Wertheim, Deutschland
	Easypet	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Real Time PCR	7500 Real Time PCR System	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Reinstwassersystem	Arium 611	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Rektalsonde für Nagetierthermometer	BIO-BRET-3	Bioseb, Vitrolles, Frankreich
Schüttelapparat	GFL-3006	Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland
Sterilbank	HERAguard HERAsafe	Heraeus, Hanau, Deutschland
	Interactive Safechange Station	Tecniplast, Hohenpreißenberg, Deutschland
Tiefkühlschrank	Liebherr Comfort -20°C	Liebherr International Deutschland GmbH, Biberach an der Riss, Deutschland
	Hera -80°C	Heraeus, Hanau, Deutschland
	VIP plus -150°C	Sanyo Electric Co. Moriguchi, Osaka, Japan
Vortexer	Vortex Genie2	Bender & Hobein, Zürich, Switzerland
Wasserbad	Type W12	Störk-Tronic, Stuttgart, Deutschland
Zählkammer	verbessertes Neubauer Hämocytometer	Henneberg-Sander GmbH, Gießen, Deutschland
Zentrifugen	Centrifuge 5417R Centrifuge 5804R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
	Labofuge 400R Multifuge 4KR	Heraeus, Hanau, Deutschland

Zentrifugen	Type 2-5 für 96-Loch-Platten	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz, Deutschland
-------------	------------------------------	--

### 3.1.2. Verbrauchsmaterial

Tab. 2: Verbrauchsmaterial

Labormaterial	Spezifikation	Hersteller
<b>Abdeckfolie für qRT-PCR</b>	MicroAmp Optical Adhesive Film	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
<b>Deckglas</b>	Deckglas für Hämozytometer (Zählkammer)	Menzel-Gläser, Braunschweig, Deutschland
<b>Einmalhandschuhe</b>	Nitril Nextgen®	Meditrade, Kiefersfelden, Deutschland
<b>ELISA-Platte</b>	Nunc Maxisorp Flachboden 96-Loch-Platten	eBioscience, San Diego, CA, USA
<b>FACS-Röhrchen</b>	5 ml Polystyren Rundboden-Röhrchen	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
<b>Glaswaren</b>	verschiedene	Schott, Mainz, Deutschland
<b>Hämozytometer (Zählkammer)</b>	vergleichbar mit Neubauer-Kammer	HBG Henneberg-Sander, Giessen-Lützelinden, Deutschland
<b>Kanülen</b>	BD Microlance 3 0,4x19 mm BD Microlance 3 0,5x16 mm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
	Sterican 0,45x12 mm Sterican 0,55x25 mm	B. Braun, Melsungen, Deutschland
<b>Kryoröhrchen</b>	CryoTube™ Vials	Nunc, Roskilde, Denmark
<b>MACS-Säule</b>	autoMACS Säule	Miltenyi Biotect, Bergisch Gladbach, Deutschland
<b>PCR-Reaktionsgefäß</b>	Multiply®-µStrip Pro 8-strip	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>Petrischalen</b>	Gewebe-/ Suspensions-Kulturschale 5 / 10 cm	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Pipettenspitzen</b>	Ultratip 1000 µl	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
	Ultratip 200 µl	

<b>Pipettenspitzen</b>	Pipettenspitze 0,1-10 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
<b>Platte für qRT-PCR</b>	96-Loch Microplatte für PCR	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Reaktionsgefäße</b>	Cellstar 50 ml PP Cellstar 15 ml PP	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
	Reaktionsgefäße 2 / 1,5 / 0,5 ml	
<b>serologische Pipetten</b>	Cellstar 5 / 10 / 25 ml	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Serumröhrchen</b>	BD Microtainer™ Plastic Capillary Blood Collectors (gelb mit Gerinnungsaktivatorgel)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
<b>Spritzen</b>	BD Micro-Fine™ U-100 1 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
	Discardit II 2 ml	
	Discardit II 5 ml	
	Discardit II 10 ml	
<b>Sterilfilter</b>	Filtropur S 0,2 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
	Filtropur S 0,45 µl	
<b>Verschlussfolie</b>	Parafilm M	
<b>Zellkulturflasche</b>	Cellstar 75 cm <sup>2</sup>	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
	Cellstar 175 cm <sup>2</sup>	
<b>Zellkulturschale</b>	Cellstar Suspensions Kulturschale 6-, 12-, 24-, 48-Vertiefung, Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
	Cellstar Suspensionskultur 96-Loch Rund-/ Flachboden	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
<b>Zellsieb</b>	Zellsieb 40 µm, 100 µm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland/ Greiner Bio-one, Frickenhausen, Deutschland
	Celltrics 50 µm	Systemex (Partec), Görlitz, Deutschland

### 3.1.3. Chemikalien und Reagenzien

Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien

Chemikalie/Reagenz	Hersteller
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin (TMB)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
7-Aminoactinomycin D (7-AAD)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Agarose, UltraPure Agarose	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl) p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Bovines Serumalbumin (BSA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Carboxyfluoresceinsuccinimidylester (CFSE)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Concanavalin A (ConA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dexamethason, wasserlöslich	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Dexa-ratiopharm® 100 mg Injektionslösung	Ratiopharm GmbH, Ulm
Dimethylsulfoxid ≥99,8 % Rotipuran p.a. (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Di-Natriumhydrogen -Phosphat Dodecahydrat ≥99% p.a. (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> *12H <sub>2</sub> O)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DMEM ( <i>Dulbeccos modified eagle medium</i> )	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
DNA-Marker, GeneRuler <i>low molecular weight DNA ladder</i>	Fermentas, St. Leon- Rot, Deutschland
Essigsäure Rotipuran 100% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol ≥99,8% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid-Lösung 1%	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethylendiamintetraessigsäure Salzhydrate ≥95% p.a. (EDTA)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
fötales Rinderserum ( <i>fetal bovine serum</i> , FBS = FCS)	Life Technologies, Darmstadt, Deutschland
IFN $\gamma$ (rm IFN $\gamma$ )	Immuno Tools GmbH, Friesoythe, Deutschland
IL-4 (rm IL-4)	Immuno Tools GmbH, Friesoythe, Deutschland

IL-17 (rm IL-17)	PeptoTech, Hamburg, Deutschland
Kaliumchlorid (KCl) p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumhydrogencarbonat (KHCO <sub>3</sub> ) p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kristallviolett	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
LPS (Lipopolysaccharide aus <i>E. coli</i> )	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumnitrit (NaNO <sub>2</sub> )	Merck, Darmstadt, Deutschland
Naphtylethylendiamin ( <i>N</i> -(1-Naphthyl)ethylenediamin-dihydrochlorid, ≥ 98%)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> ) p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl) ≥99,5% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> ) p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
di-Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x12H <sub>2</sub> O)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Natriumazid (NaN <sub>3</sub> ) p.a.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Neomycintrisulfat Salthydrat p.a.	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Orange G (Ladepuffer)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
PCR Reagenzien: dNTP Mix 10 μM, Taq-Polymerase (5U/μl), 10xPuffer ohne MgCl <sub>2</sub>	Genaxxon Bioscience, Ulm, Deutschland
Penicillin / Streptomycin (PS)	life Technologies, Darmstadt, Deutschland
Ortho-Phosphorsäure (H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ), ≥ 85%, p. a., ISO	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Protein G Plus Agarose	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland

Roti Histofix 4% (4% Paraformaldehyd, PFA)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (HCl)	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Schwefelsäure (H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> ) 95-98% p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland
Sulfanilamid, ≥ 99%	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Deutschland
Tris (Na <sub>3</sub> C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> O <sub>7</sub> ) Pufferan ≥99,9% p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin-EDTA 25%	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tween 20	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Wasserstoffperoxid (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) 30% Rotipuran p.a.	Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
Zitronensäure-Monohydrat p.a.	Merck, Darmstadt, Deutschland

### 3.1.4. Puffer, Lösungen und Medien

#### 3.1.4.1. Puffer und Lösungen

Tab. 4: Puffer und Lösungen

<b>Puffer/Lösung</b>	<b>Zusammensetzung</b>
<b>Assay Diluent (ELISA)/Blockpuffer (ELISA)</b>	1000 ml PBS 10% FCS
<b>Beschichtungspuffer (ELISA, Natriumcarbonatpuffer)</b>	1000 ml di H <sub>2</sub> O 7,13 g NaHCO <sub>3</sub> 1,59 g Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> pH 9,5
<b><i>Detachment</i>-Puffer</b>	1000 ml PBS 2 mM EDTA
<b>FACS-Puffer</b>	1000 ml PBS 0,1 % BSA 0,01 % NaN <sub>3</sub>
<b>Griß-Reagenz (Naphthylethylendiamin Sulfanilamid)</b>	100 ml di H <sub>2</sub> O 0,1% Naphthylethylendiamin 2,5% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>
	100 ml di H <sub>2</sub> O 1% Sulfanilamid 2,5% H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub>

<b>MACS-Puffer</b>	1000 ml PBS 0,5 % BSA 2 mM EDTA
<b>MACS Rinse-Puffer</b>	1000 ml PBS 2 mM EDTA
<b>NaNO<sub>2</sub> (Stocklösung 200 mM)</b>	200 mM NaNO <sub>2</sub>
<b>PBS</b>	1000 ml H <sub>2</sub> O 80 g NaCl 29 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O 2 g KCl 2 g KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> pH 7,2 – 7,3
<b>PBS / BSA</b>	1000 ml PBS 0,1 % BSA
<b>PBS / Tween (ELISA Waschpuffer)</b>	1000 ml PBS 0,1 % Tween 20
<b>Stop-Lösung</b>	2N H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
<b>Substratlösung (ELISA)</b>	10 ml Substrat-Puffer 1 mg TMB 100 µl DMSO 20 µl 3,5% H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
<b>Substratpuffer (ELISA)</b>	1000 ml di H <sub>2</sub> O 21 g Zitronensäure 71,7 g Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 12H <sub>2</sub> O
<b>TAE-Puffer</b>	1000 ml di H <sub>2</sub> O 4,8 g Tris 1,1 g Essigsäure 0,29 g EDTA

### 3.1.4.2. Medien

Tab. 5: Medien

Medien	Zusammensetzung
<b>DMEM / FCS / PS</b>	10% FCS 100 U / ml Penicillin 100 µg / ml Streptomycin
<i>L Cell Conditioned Medium</i> <b>(LCCM)</b>	Überstand aus kultivierten L929-Zellen, siehe Abschnitt 3.2.1.1.2.1.

### 3.1.5. Antikörper für FACS und Zellisolation

Tab. 6: Antikörper

Epitop	Klon	Isotyp	Fluoro- chrom	Anwen- dung	Hersteller
<b>7-AAD</b>	-	-	7-AAD	FACS	BioLegend, San Diego, CA, USA
<b>anti-IL-6</b>	MP5-20F3	Rat IgG1, κ	-	Injektion	eBioscience
<b>CD115</b>	AFS98	Rat IgG2a, κ	APC	FACS	BioLegend, San Diego, CA, USA
<b>CD11b</b>	M1/70	Rat IgG2b, κ	PE-Cy7	FACS	BioLegend, San Diego, CA, USA
<b>CD16/CD32</b> (TruStain fcX™, Fc- Block)	93	Rat IgG2a, λ	-	FACS	BioLegend, San Diego, CA, USA
<b>CD206</b>	C068C2	Rat IgG2a, κ	APC	FACS	BioLegend, San Diego, CA, USA
<b>CD3</b>	17A2	Rat IgG2b, κ	APC	FACS	BioLegend, San Diego, CA, USA
<b>CD54</b>	YN1/1.7.4	Rat IgG2b, κ	APC	FACS	BioLegend, San Diego, CA, USA
<b>CD71</b>	RI7217	Rat IgG2a, κ	PE	FACS	BioLegend, San Diego, CA, USA
<b>CD8</b>	53-6.7	Rat IgG2a, κ	APC	FACS	BioLegend, San Diego, CA, USA

<b>CD86</b>	GL-1	Rat IgG2a, κ	PE	FACS	BioLegend, San Diego, CA, USA
<b>CD90.2</b>	-	rat IgG2b	Micro- beads	Zellauf- reinigung	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany
<b>F4/80</b>	BM8	Rat IgG2a, κ	FITC	FACS	BioLegend, San Diego, CA, USA
<b>MHC II</b> (C57BL/6, I- Ab)	AF6 120.1	Mouse (BALB/c) IgG2a, κ	PE	FACS	BioLegend, San Diego, CA, USA

### 3.1.6. Oligonukleotide

Tab. 7: Oligonukleotide

A - Transkript, B - Name, C - Sequenz, D - Annealingtemperatur [°C], E - Produktgröße [bp], F - Referenz					
A	B	C	D	E	F
<b>HPRT</b>	fw	5'-GTC CTG TGG CCA TCT GCC TA-3'	60	91	J. Theiss- Sünnemann
	rev	5'-GGG ACG CAG CAA CTG ACA TT-3'			
<b>IL-2</b>	fw	5'-ACT TGC CCA AGC AGG CCA CA-3'	60	78	eigene Arbeit
	rev	5'-CCA GAA CAT GCC GCA GAG GTC C-3'			
<b>IL-17A</b>	fw	5'-TCC AGA AGG CCC TCA GAC TA-3'	60	239	J. Theiss- Sünnemann
	rev	5'-AGC ATC TTC TCG ACC CTG AA-3'			
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	fw	5'-ACT GGC AAA AGG ATG GTG AC-3'	60	237	J. Theiss- Sünnemann
	rev	5'-TGA GCT CAT TGA ATG CTT GG-3'			
<b>Granzym B</b>	fw	5'-TGT GGG CCC CCA AAG TGA CAT-3'	60	184	J. Theiss- Sünnemann
	rev	5'-AAA GGC AGG GGA GAT CAT CGG G-3'			
<b>HPRT</b>	fw	5'-CAT GGA CTG ATT ATG GAC AGG A- 3'	60	123	eigene Arbeit
	rev	5'-CAG CAG GTC AGC AAA GAA CTT A- 3'			
<b>CD206</b>	fw	5'-TCC GAA ATG TTG AAG GGA AG-3'	60	134	eigene Arbeit
	rev	5'-ATT ATT CCA AAG GCC CGA AG-3'			
<b>Ym1</b>	fw	5'-CCC ACC AGG AAA GTA CAC AGA-3'	60	181	eigene Arbeit
	rev	5'-GAG CCA CTG AGC CTT CAA CT-3'			
<b>iNos</b>	fw	5'-CAC CTT GGA GTT CAC CCA G-3'	60	170	eigene Arbeit
	rev	5'-ACC ACT CGT ACT TGG GAT GC-3'			
<b>Arg1</b>	fw	5'-GAA TGG AAG AGT CAG TGT GGT G-3'	60	79	eigene Arbeit

<b>Arg1</b>	rev	5'-CTG GTT GTC AGG GGA GTG TT-3'			
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	fw	5'-TCC CCA AAG GGA TGA GAA G-3'	60	133	eigene Arbeit
	rev	5'-CAC TTG GTG GTT TGC TAC GA-3'			
<b>CD163</b>	fw	5'-TGC CTC CCA AAA ATG ACT TC-3'	60	139	eigene Arbeit
	rev	5'-ATG GCT CCA CAA ACC AAG AG-3'			

### 3.1.7. Kommerzielle Kits und Enzyme

Tab. 8: Kommerzielle Kits und Enzyme

Bezeichnung	Hersteller
iScript cDNA Synthesis Kit	Bio-Rad Laboratories, München, Germany
Mouse IFN- ELISA MAX Standard	BioLegend, San Diego, CA, USA
Mouse IL-2 ELISA MAX Standard	BioLegend, San Diego, CA, USA
Mouse TNF $\alpha$ ELISA MAX Standard	BioLegend, San Diego, CA, USA
Pan T Cell Isolation Kit II, Mouse	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Germany
pHrodo® Green E. coli BioParticles® Konjugat für Phagozytose	life Technologies
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Quick-RNA MiniPrep	Zymo Research, Irvine, CA, USA
Taq-Polymerase	Genaxxon Bioscience, Ulm, Germany
Trypsin-EDTA 25%	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

### 3.1.8. Zelllinien

#### L929-Zellen

Bei L929-Zellen handelt es sich um eine M-CSF-produzierende murine Fibroblasten-Zelllinie. Der Überstand dieser Zellen wurde zur Differenzierung der hämatopoetischen Stammzellen zu Makrophagen genutzt. Die Zelllinie wurde von Prof. Dr. Jan Tuckermann (Institut für Molekulare Endokrinologie der Tiere der Universität Ulm, Deutschland) zur Verfügung gestellt.

### 3.1.9. Software

Tab. 9: Software

Software	Hersteller
7500 System SDS Software v. 1.4.0.25	Applied Biosystems, Foster City, California, USA
BD FACS Diva Software Version 6.1.2	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
BioTek® Gen5™ Version 1.09	BioTek, Bad Friedrichshall, Deutschland
FlowJo software Version 7.6	Tree Star, Inc., Ashland, Oregon, USA
Microsoft Excel (2007, 2010)	Microsoft Corporation, Redmond, WA, USA
Primer3	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/">http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/</a>
Primer-BLAST	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>
Prism Version 6.0	GraphPad Software, La Jolla, CA, USA
Endnote X4	Thomas Reuters

## 3.2. Methoden

### 3.2.1. *in vitro* Versuche

#### 3.2.1.1. Zellkultur

Alle zellkulturtechnischen Arbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Die Zellen wurden, wenn nicht anders beschrieben bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert.

##### 3.2.1.1.1. Bestimmung der Zellzahl

Die Zellzahl wurde mit Hilfe einer Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 10 µl der Zellsuspension entnommen und für die Vitalfärbung mit Trypanblau gemischt. Zum Auszählen wurden 10 µl aus diesem Gemisch unter das Deckglas der Zählkammer pipettiert und zwei schräg gegenüberliegende Quadranten ausgezählt. Dabei wurden tote Zellen (erkennbar durch intensive Blaufärbung) von der Zählung exkludiert. Die Zellzahl berechnete sich wie folgt:

Mittelwert der gezählten Zellen in den Quadranten x 10<sup>4</sup> x Verdünnungsfaktor x Volumen (ml).

### **3.2.1.1.2. Gewinnung von BMDMs**

#### **3.2.1.1.2.1. Herstellung von *L cell conditioned medium* (LCCM)**

Als Grundlage für die Differenzierung von hämatopoetischen Stammzellen (HSZ) in Makrophagen wurde LCCM genutzt, welches das zur Differenzierung benötigte M-CSF enthielt. Die Zellen wurden von Prof. Dr. Jan Tuckermann (Institut für Allgemeine Zoologie und Endokrinologie der Universität Ulm, Deutschland) zur Verfügung gestellt und in unserer Einrichtung vermehrt. Für die Gewinnung von LCCM wurden kryogenisch eingefrorene L929 Zellen (murine Fibrosarkomzelllinie) im Wasserbad aufgetaut und zusammen mit DMEM/FCS/PS gewaschen. Danach wurden die Zellen in DMEM/FCS/PS resuspendiert und in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche überführt. Nach Erreichen der Konfluenz wurden die Zellen durch Trypsin geerntet und auf fünf 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen verteilt. Nach abermaligem Konfluentwerden wurden die Zellen erneut mittels Trypsin geerntet und in fünf 175 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen kultiviert. Der Überstand wurde nach jedem zweiten Tag abgenommen und durch frisches Medium (DMEM/FCS/PS) ersetzt. Der Überstand wurde bei -20°C eingefroren. Dieser Vorgang wurde vier Mal wiederholt. Abschließend wurden alle Überstände aufgetaut, vereinigt, sterilfiltriert, aliquotiert und wieder eingefroren. Eingesetzt wurde das Medium in einer 1:5 Verdünnung mit DMEM/FCS/PS.

#### **3.2.1.1.2.2. Differenzierung zu Makrophagen**

Nach erfolgter Knochenmarkisolation (Abschnitt 3.2.2.3.1.) aus Tibia, Femur und Humerus aus C57BL/6 Mäusen wurden die Zellen mit PBS/BSA gewaschen. Die Zellen wurden in DMEM resuspendiert und anschließend in Petrischalen (Gewebe Kulturschalen) über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurden alle nicht-adhärenenten Zellen von den Platten durch leichtes Spülen abgenommen und bei 330 g für 6 Minuten (Min) bei 4°C zentrifugiert. Im Anschluss wurden die Zellen in LCCM resuspendiert und die Zellzahl bestimmt. Je 10<sup>7</sup> HSZs wurden in eine Petrischale (Suspensionskulturschale) bzw. 3x10<sup>6</sup> HSZs in eine Vertiefung einer 6-Loch-Platte (Platten für Suspensionskultur) gegeben. Die Petrischale wurde auf ein Volumen von 10 ml und die Vertiefung der 6-Loch-Platte auf 4 ml mit LCCM aufgefüllt. Nach vier Tagen wurden die Schalen bzw. Vertiefungen mit warmem PBS

gewaschen und das Medium (LCCM) ersetzt. Dieser Schritt wurde am 6. Tag wiederholt. Der Verlauf der Differenzierung wurde dabei unter dem Mikroskop kontrolliert. Nach insgesamt acht bis zehn Tagen wurden die Makrophagen geerntet. Dazu wurden die Platten mit PBS gewaschen und die Zellen mit 2 mM EDTA für 30 Min bei 37°C abgelöst. Die abgelösten Zellen wurden mit PBS/BSA gewaschen und ausgezählt. Mittels Durchflusszytometrie wurde sowohl die Reinheit als auch die Vitalität der Zellen geprüft. Dafür kamen F4/80 und CD11b sowie 7-AAD zur Anwendung.

### **3.2.1.1.2.3. Polarisierung von Makrophagen**

Nach vollständiger Differenzierung wurden die Makrophagen auf der Schale oder der Vertiefung gewaschen und das LCCM durch DMEM/FCS/PS ersetzt. Die Polarisierung der Makrophagen erfolgte für jeweils 24 h. Die M1-Polarisation erfolgte mit 100 ng/ml LPS. Die M2-Polarisation erfolgte je nach Bedarf mit 10 ng/ml IL-4 (M2I), mit  $10^{-7}$  M Dex (M2D) oder kombiniert mit IL-4 und Dex (M2ID) sowie unbehandelt (M0).

### **3.2.1.2. Funktionelle und immunologische Analysemethoden**

#### **3.2.1.2.1. T-Zell-Proliferation**

Alle T-Zellen bzw. Splenozyten wurden nach erfolgter Isolation (Abschnitt 3.2.2.3.2.1.) mit CFSE gefärbt. Dafür wurden die Zellen auf eine Konzentration von  $2 \times 10^6$ /ml mit PBS eingestellt und die Suspension 7 Min bei 37°C im Wasserbad mit einer Endkonzentration an CFSE von 0,5  $\mu$ M gefärbt. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 2% FCS gestoppt. Im Anschluss wurden die Zellen gewaschen, ausgezählt und in DMEM resuspendiert.

#### **3.2.1.2.1.1. Polyklonale Stimulation**

C57BL/6 WT-T-Zellen wurden wie beschrieben isoliert (Abschnitt 3.2.2.3.2.1.).  $10^5$  T-Zellen wurden zusammen mit  $10^5$  polarisierten Makrophagen in einem Volumen von 200  $\mu$ l in eine 96-Loch-Flachbodenplatte gegeben und die T-Zellen mit 2,5  $\mu$ g

ConcanavalinA (ConA) stimuliert. Als Kontrolle wurden T-Zellen ohne ConA mit Makrophagen inkubiert. Nach drei Tagen wurde dann die Proliferation durchflusszytometrisch bestimmt.

#### **3.2.1.2.2. Phagozytostest.**

Für den Phagozytostest wurde das pHrodo™Green E. coli BioParticles® Konjugat der Firma life Technologies verwendet. Lyophilisierte *E. Coli* Bakterien wurden in PBS/BSA resuspendiert und die Suspension 1:4 mit PBS/BSA verdünnt.  $10^5$  polarisierte Makrophagen, resuspendiert in PBS/BSA, wurden in je eine Vertiefung einer 96-Loch-Flachbodenplatte gegeben. Nach 3-stündiger Adhärenzzeit wurde der Überstand entfernt und durch 100 µl des verdünnten Konjugates ersetzt. Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C. Im Anschluss wurde der Überstand verworfen und die Makrophagen durch kräftiges Abspülen mit PBS/BSA in ein FACS-Röhrchen überführt. Die Makrophagen wurden vor der Bestimmung der Phagozytose mit 3 ml PBS gewaschen und die erfolgte Phagozytose am Durchflusszytometer analysiert.

#### **3.2.1.2.3. Adhärenztest**

Die polarisierten Makrophagen wurden in den Vertiefungen der 6-Lochplatte drei Mal mit PBS gewaschen. Im Anschluss erfolgte die Fixierung für 10 Min bei Raumtemperatur (RT) mit 100% Ethanol. Dieser wurde hinterher verworfen und die Zellen für 30 Min bei RT mit Kristallviolett gefärbt. Der überschüssige Farbstoff wurde entfernt und die Vertiefungen solange mit destilliertem Wasser gewaschen, bis kein Farbstoff mehr austrat. Die Zelllyse wurde mit 2%igem TritonX durchgeführt. Es erfolgte eine Verdünnungsreihe mit destilliertem Wasser und die anschließende photometrische Messung bei 570 nm.

#### **3.2.1.2.4. <sup>51</sup>Cr-Test von *in vivo* generierten alloreaktiven ZTLs**

Der <sup>51</sup>Cr-Test ermöglicht es Aussagen über die Zytotoxizität von Zellen zu machen. Hier wurde die Funktion von *in vivo* generierten alloreaktiven CD8<sup>+</sup>-T-Zellen am Tag 6 der aGvHD ermittelt. Für den <sup>51</sup>Cr-Test macht man sich die Fähigkeit der zytotoxischen T-Lymphozyten (ZTL) zu Nutze, dass diese MHC-ungleiche Zielzellen

lysieren können. Dabei wurden die ZTLs zusammen mit chromierten Zielzellen inkubiert und die Freisetzung von  $^{51}\text{Cr}$  im Überstand gemessen. Der  $^{51}\text{Cr}$ -Test wurde in Kooperation mit der AG Dressel durchgeführt. Als Zielzellen wurden Ag8.653 ( $\text{H2}^{\text{d}}$ ) und RMA ( $\text{H2}^{\text{b}}$ ) Zellen verwendet. Diese wurden geerntet, in 100  $\mu\text{l}$  FCS resuspendiert und 1 h  $37^{\circ}\text{C}$  mit  $^{51}\text{Cr}$  mit einer Konzentration von 1  $\mu\text{Ci}/\text{ml}$  markiert. Die chromierten Zielzellen wurden in bestimmten Verhältnissen mit den Effektorzellen ( $\text{CD8}^+$ -T-Zellen) für 4 h bei  $37^{\circ}\text{C}$  in 96-Loch-U-Boden-Platten in einem Volumen von 200  $\mu\text{l}$  inkubiert. Im Anschluss daran wurden 50  $\mu\text{l}$  des Überstandes in 96-Loch Opti-Plates überführt und 200  $\mu\text{l}$  flüssiger Szintillator dazugegeben. Zu den verbleibenden 150  $\mu\text{l}$  wurden 5  $\mu\text{l}$  10% Triton gegeben und gut gemischt. 50  $\mu\text{l}$  des lysierten Pellets wurden ebenfalls in eine 96-Loch-Platte überführt und mit 200  $\mu\text{l}$  des flüssigen Szintillators hinzugefügt. Die Messplatte wurde versiegelt, geschüttelt die Radioaktivität in den Vertiefungen gemessen Die relative Lyse berechnete sich an Hand des Quotienten aus freigesetzter Radioaktivität und der verbleibenden Radioaktivität im Zellpellet nach der Formel:

$\% \text{ Lyse} = 4 \times \text{cpm Überstand} \times 100 / (3 \times \text{cpm Pellet} + \text{cpm Überstand})$ . Die spezifische Lyse errechnete sich aus der Lyse minus des spontanen Chrom-Austritts aus der Zelle.

#### **3.2.1.2.4.1. Isolation von $\text{CD8}^+$ -T-Zellen**

Für den  $^{51}\text{Cr}$ -Test wurden  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen aus der Milz am Tag sechs nach GvHD-Induktion verwendet. Dabei wurden die Mäuse durch  $\text{CO}_2$ -Inhalation getötet, die Milzen entnommen und wie beschrieben eine Einzelzellsuspension (Abschnitt 3.2.2.3.2.) hergestellt. Für die Isolation der  $\text{CD8}^+$ -T-Zellen wurde das  $\text{CD8a}^+$  T cell isolation Kit II der Firma Miltenyi verwendet. Die Milzen mehrerer Mäuse aus jeder Gruppe wurden vereinigt. Die resultierenden Lymphozyten die wurden in 40  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer/ $10^7$  Zellen zusammen mit 10  $\mu\text{l}$  Biotin-Antikörpercocktail für 10 Min bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellen in 30  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer zusammen mit 20  $\mu\text{l}$  anti-Biotin-Microbeads für 15 Min bei  $4^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Die Zellen wurden mit 10 ml MACS-Puffer gewaschen,  $10^8$  Zellen in je 500  $\mu\text{l}$  MACS-Puffer aufgenommen und über einen 30  $\mu\text{m}$  Filter gegeben. Die Aufreinigung erfolgte mit dem autoMACS und dem Programm DEPLETS.

### **3.2.1.3. *Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)***

Zum Nachweis von Zytokinen im Überstand von Zellkulturen, kam der ELISA zur Anwendung. Dieses immunologische Nachweisverfahren beruht auf einem enzymvermittelten Farbumschlag, der photometrisch messbar ist. Verwendet wurden kommerzielle ELISA-Kits der Firma Biolegend, welche nach Protokoll angewendet wurden.

Zur Beschichtung wurde auf Nunc MaxiSorp 96-Loch ELISA-Platte der jeweilige Antikörper, in Beschichtungspuffer resuspendiert, gegeben und die Platte bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde der überschüssige Antikörper entfernt und die Platte drei Mal mit PBS/Tween (PBS-T) gewaschen. Im Anschluss erfolgte ein Blockschritt mit 10% FCS für 1 h bei RT. Dem abermaligen drei maligem Waschen mit PBS-T folgte das Auftragen der in 10% FCS verdünnten Proben und der Standards, die dann für 2 h bei RT inkubiert wurden. Nach erneutem drei maligem Waschen mit PBS-T wurden die Proben 1 h mit biotinyliertem Detektionsantikörper, verdünnt in 10% FCS, inkubiert. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit Streptavidin-HRP. Die Entwicklung erfolgte nach vier maligem Waschen mit PBS durch Zugabe von Tetramethylbenzidin (gelöst in Substratpuffer und Wasserstoffperoxid) für 5-30 Min im Dunkeln. Nach dem Abstoppen der Reaktion durch 50 µl 1M Schwefelsäure konnten die Absorption in den Platten im Photometer bei 450 bzw. 570 nm gemessen werden.

### **3.2.1.4. *Messung von Stickoxiden (NO-Test)***

Die Messung von Stickoxiden im Zellkulturüberstand von polarisierten Makrophagen wurde mit Hilfe von Kopplungsreagenzien photometrisch bestimmt. Zur Quantifizierung der Messwerte wurde eine Eichreihe mittels NaNO<sub>3</sub>-Lösung erstellt. 50µl der Standards bzw. des Überstandes wurden in einer Nunc MaxiSorp 96-Loch ELISA-Platte mit 50 µl 1% Sulfanilamid für 5 Min unter Lichtausschluss bei RT inkubiert. Im Anschluss wurden 50 µl 1% Naphtylethylendiamin hinzugefügt und die Absorption in den Vertiefungen im Photometer bei 540 nm gemessen.

### **3.2.1.5. Durchflusszytometrie (*fluorescence-activated cell sorting*) FACS)**

Die gewünschte Zellzahl wurde in ein FACS Röhrchen überführt und mit 3 ml FACS-Puffer für 5 Min bei 450 g gewaschen. Der Überstand wurde verworfen und eine Blockierung der Fc-Rezeptoren anti-CD16/CD32 für 30 Min bei 4°C durchgeführt. Im Anschluss erfolgte eine 30-minütige Inkubation mit spezifischen an Fluorochrome gekoppelten Antikörpern (in FACS-Puffer verdünnt) bei 4°C. Nach der Inkubation wurden die Proben mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte am FACS Canto II der Firma BD Biosciences. Beim Einsatz mehrerer Antikörper wurden vor der Messung Settings aufgenommen um störende spektrale Überlappungen der Fluorochrome auszugleichen. Die Auswertung der ermittelten Daten erfolgte mit FlowJo.

### **3.2.1.6. Molekularbiologische Methoden**

#### **3.2.1.6.1. RNA-Isolation aus Zellen**

Die RNA wurde mittels des Quick-RNA™ MiniPrep Kits der Firma Zymo Research isoliert. Alle Aufreinigungsschritte fanden bei RT statt. Dazu wurden die Zellen bei 330 g 6 Min zentrifugiert und der Überstand verworfen und das Pellet mit 300 µl Lysepuffer je  $5 \times 10^6$  Zellen resuspendiert. Das Lysat wurde auf eine *Spin-Away* Säule gegeben und bei 16.000 g für eine Minute zentrifugiert. Dieser Schritt diente der Entfernung genomischer RNA aus der Probe. Im Anschluss wurde das gereinigte Lysat 1:2 mit 98%igem Ethanol versetzt, auf eine Zymo-Spin IIIICG-Säule gegeben und für 30 Sekunden (Sek) bei 16.000 g zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Es folgte ein Waschschrift mit 400 µl Prep-Puffer mit einer Zentrifugation von 16.000 g für 30 Sek. Nachfolgend wurde die Säule zwei Mal mit Waschpuffer gewaschen und abermals zentrifugiert, wobei im ersten Waschschrift mit 700 µl Waschpuffer und 30 Sek bei 16.000 g und im zweiten Durchgang mit 400 µl für 2 Min ebenfalls bei 16.000 g zentrifugiert wurde. Anschließend wurde die Säule in ein RNase freies 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, 35 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert und wurde bei 21.000 g zentrifugiert. Dieser Elutionsschritt wurde einmal wiederholt um die Ausbeute an RNA zu erhöhen. Die isolierten RNA-Proben wurden bei -20°C aufbewahrt.

### **3.2.1.6.2. Qualitative und quantitative Analyse von RNA**

Nach erfolgter Isolierung wurde die Konzentration der RNA mit Hilfe des Nano-Drops der Firma Fischer Scientific Inc. photometrisch bestimmt. Dazu wurde 1 µl der RNA in das Gerät pipettiert und die Konzentration bei 260 nm gemessen. Zur Überprüfung der Reinheit wurde das Verhältnis 260/230 nm (Aussage über Lösemittel im Eluat) sowie 260/280 nm (Aussage über Proteinkontamination im Eluat) ermittelt. Die Qualität der RNA wurde mittels Gelelektrophorese mit einem 1%igen Agarosegel kontrolliert.

### **3.2.1.6.3. Agarosegelelektrophorese**

Die RNA sowie PCR-Amplifikate wurden mittels Gelelektrophorese analysiert. Dazu wurden 0,7 – 2%ige Agarosegele verwendet. Dazu wurde die benötigte Menge Agarose in 1x TAE-Puffer gelöst und in der Mikrowelle aufgeköcht. Nach dem Abkühlen auf 60°C wurde der Mischung Ethidiumbromid mit einer Endkonzentration von 1 µg/ml hinzugegeben. Die Agarose wurde in einen Schlitten mit einem Kamm für die späteren Kammern gegossen. Nach dem Erhärten wurde das Gel samt Schlitten in die Gelkammer, welche 1x TAE-Puffer enthielt, überführt. Die Proben wurden mit 5 µl 6x Orange G Ladepuffer gemischt und in die Taschen gegeben. Das Gel lief 30 Min bei 120-150 V bei 220 mA. Die Visualisierung der Banden erfolgte auf einem Bildschirm unter UV-Licht.

### **3.2.1.6.4. c-DNA-Synthese (Reverse Transkription)**

Die Umschreibung von RNA in komplementäre DNA (cDNA) wurde mittels des iScript™ cDNA-Kits der Firma Bio-Rad durchgeführt. Dazu wurde das Volumen von bis zu 1 µg RNA zusammen mit 4 µl 5xiScript sowie 0,2 µl reverser Transkriptase gemischt.

Tab. 10: Komponenten für die c-DNA-Synthese

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
RNase freies H <sub>2</sub> O	variabel
5x iScript reaction Mix	4
I Script reverse Transkriptase	0,2
RNA (max. 1 $\mu$ g)	variabel
Gesamtvolumen	20

Die reverse Transkription erfolgte im Thermo-Cycler bei folgendem Programm:

Tab. 11: Programm für die c-DNA-Synthese

Prozess	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [Min]
Bindung der Oligonukleotide	25	5
cDNA-Synthese	42	30
Inaktivierung der reversen Transkriptase	85	5

Die cDNA-Proben wurden bei  $-20^{\circ}$ C gelagert.

### 3.2.1.6.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Zur Etablierung von neuen Primern und zur Qualitätsüberprüfung der erzeugten cDNA vor dem Einsatz in einer quantitativen Real-Time-PCR (qRT-PCR) wurde die PCR verwendet. Dabei wurden die gleichmäßige Expression des *Housekeeping*-Gens HPRT (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase) analysiert. Dafür wurde 1  $\mu$ l cDNA mit sequenzspezifischen Primern, destilliertem Wasser, MgCl<sub>2</sub>-haltigem Puffer, Nukleotiden sowie Taq-Polymerase gemischt.

Tab. 12: Komponenten einer PCR-Reaktion

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
H <sub>2</sub> O	19,8
10x PCR-Puffer (mit 1,5 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5
dNTP	1
Primer-Mix 10 $\mu$ M	0,5
Taq-Polymerase	0,2
cDNA	1
Gesamtvolumen	25

Die PCR wurde in einem Thermo-Cycler der Firma Eppendorf durchgeführt.

Tab. 13: PCR-Programm

Prozess	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer [Min]
Initiale Denaturierung	94	5
Denaturierung	94	1
Primeranlagerung	60	1 40x
Elongation	72	1
Finale Elongation	72	10
Lagerung	10	$\infty$

Im Anschluss daran wurde die Integrität des Amplifikats durch eine Gelelektrophorese geprüft.

### 3.2.1.6.6. Quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Die Genexpression wurde mittels quantitativer Real-Time-PCR ermittelt, wobei in dieser Arbeit eine relative Quantifizierung stattfand. Unter relativer Quantifizierung

versteht man wie stark ein Gen in Bezug auf ein Referenz- bzw. *Housekeeping*-Gen exprimiert wird. Zur Berechnung der Genexpression wurde die  $\Delta\Delta$ CT-Methode genutzt.

Dafür wurde die cDNA mit den folgenden Komponenten in eine 96-Loch Microplatte für PCR gegeben und mit einer transparenten Folie versiegelt.

Tab. 14: Komponenten für die qRT-PCR

Reagenz	Volumen [ $\mu$ l]
H <sub>2</sub> O	11
SYBR Green PCR Mastermix	12,5
Primer-Mix 10 $\mu$ M	0,5
cDNA	1
Gesamtvolumen	25

Für die Real-Time-PCR wurde der ABI7500 der Firma Applied Biosystems benutzt. Dabei setzte sich die PCR-Reaktion aus folgenden Einzelschritten zusammen.

Tab. 15: qRT-PCR-Programm

Prozess	Temperatur [ $^{\circ}$ C]	Dauer
Vorwärmen	50	2 Min
Aktivierung der Polymerase, erste Denaturierung	95	10 Min
Denaturierung	95	15 Sek
Primeranlagerung, Elongation	60	1 Min
	95	15 Sek
Dissoziierungsschritt (Schmelzkurve)	60	1 Min
	95	15 Sek

Zur Berechnung der Expression bediente man sich der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode. Dabei beschreibt der CT (*Cycle Threshold*)-Wert den Zyklus in dem die Signalstärke erstmals die Hintergrundfluoreszenz übersteigt und so den Beginn der exponentiellen Phase markiert. Bei der  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Methode wird zuerst der CT-Wert der endogenen Kontrolle von dem des Zielgens subtrahiert. Dieser  $\Delta\text{CT}$ -Wert wird dann von dem  $\Delta\text{CT}$  eines Kalibrators (Normgröße) abgezogen. Man erhält den  $\Delta\Delta\text{CT}$ -Wert. Der quantitative Unterschied zwischen zwei Proben wurde dann nach der Formel  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  berechnet.

### **3.2.2. *in vivo* Versuche**

#### **3.2.2.1. Tierhaltung**

Alle Tierversuche wurden unter der Berücksichtigung ethischer Standards zur humanen Tierhaltung und mit Genehmigung der Landesanstalt für Gesundheit und Soziales (LAVES) Niedersachsen durchgeführt. Die Mäuse wurden in Gruppen in der zentralen tierexperimentellen Einrichtung (ZTE) unter spezifisch pathogenfreien (SPF) Bedingungen in individuell belüfteten Käfigen (IVC) gehalten. Dabei erhielten die Tiere spezielle Nagernahrung und Trinkwasser *ad libitum* und unterlagen einem 12-stündigen Tag-Nacht-Rhythmus.

#### **3.2.2.2. Mäuse**

Die genutzten Mausstämme wurden entweder selbst in Göttingen gezüchtet oder über einen externen Züchter (Charles River, Sulzfeld) bezogen. Neben dem Wildtypstamm wurde zur Untersuchung der Rolle des GR in der aGvHD verschiedene Genotypen auf BALB/c-Hintergrund genutzt. Dabei handelt es sich um einen Inzuchtstamm mit dem MHC-Haplotyp H2<sup>d</sup> mit charakteristisch weißer Fellfarbe. Zum einen wurde mit GR<sup>dim</sup>-Mäusen gearbeitet (Reichardt et al., 1998), die zuvor über mehr als zehn Generationen auf einen BALB/c-Hintergrund rückgekreuzt wurden. Diese Mäuse zeichnen sich durch eine Punktmutation in der Dimerisierungsdomäne des GR aus. Der GR ist damit nicht mehr in der Lage zu dimerisieren und kann somit keine DNA-Bindungsabhängige Genregulation mehr durchführen. Daneben wurden Mäuse mit einer GR-Defizienz in den myeloiden Zellen (GR<sup>flox/flox</sup>; GR<sup>lysMcre</sup> = GR<sup>lysM</sup>) (Clausen et al., 1999) genutzt. Außerdem wurden verschiedene Genotypen des Mausstammes C57BL/6 verwendet. Hierbei

handelt es sich ebenfalls um einen Inzuchtstamm mit dem MHC-Haplotyp H2<sup>b</sup> für den eine schwarze Fellfarbe charakteristisch ist. Benutzt wurde zum einen der Wildtypstamm und zum anderen ein Stamm mit T-zellspezifischer GR-Defizienz ( $GR^{flox/flox}$ ;  $GR^{lckCre} = GR^{lck}$ ) (Gu et al., 1994). Für die T-Zell- und Knochenmarkisolation wurden alternativ zu Wildtyp oder geflochten Mäusen auch B6.SJL-PtprcaPepcb/BoyJ (CD45.1-kongene C57BL/6J) Mäuse (Uhmann et al., 2011) verwendet.

### **3.2.2.3. aGvHD**

Für alle Tierexperimente wurden als Empfänger 8 bis 12 Wochen alte männliche und weibliche BALB/c Mäuse verwendet. Diese wurden in Gruppen gehalten. Zwei Tage vor der aGvHD-Induktion wurde zur Antibiose-Therapie Neomycin über das Trinkwasser verabreicht, welches alle 2 Tage gewechselt wurde. Einen Tag vor der Induktion wurden die Mäuse mit 8,5 Gy (1 Gy/Min) einer Ganzkörperbestrahlung unterzogen. Die Induktion der aGvHD erfolgte am nächsten Tag durch die Injektion von  $10^7$  T-Zell-depletierten Knochenmarkzellen zusammen mit  $2 \times 10^6$  aufgereinigten T-Zellen. Diese wurden zumeist aus Lymphknoten oder Milz aus C57BL/6 Mäusen gewonnen. Die Mischung aus T-Zell-depletierten Knochenmarkzellen und aufgereinigten T-Zellen wurden in einem Volumen von 200  $\mu$ l mit PBS über die Schwanzvene (i. v.) injiziert. Die Knochenmarkskontrollen erhielten nur T-Zell-depletiertes Knochenmark.

#### **3.2.2.3.1. Knochenmarksgewinnung**

Nach dem Töten der Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Inhalation wurden die Vorder- sowie Hinterbeine entfernt und Tibia, Femur sowie Humerus herauspräpariert. Die Knochenenden wurden mit einer Knochenschere entfernt und das Knochenmark mittels 24G-Kanüle und einer 5 ml Spritze mit PBS/BSA herausgespült. Zur Herstellung einer homogenen Suspension wurde das Knochenmark gut in PBS/BSA resuspendiert und im Anschluss über einen 40  $\mu$ m Filter gegeben. Die Zellen wurden mit PBS/BSA gewaschen und bei 330 g für 6 Min bei 4°C zentrifugiert.

### **3.2.2.3.1.1. Herstellung von T-Zell-depletiertem Knochenmark**

Für die aGvHD-Experimente wurde T-Zell-depletiertes Knochenmark verwendet. Dazu wurden CD90.2 Microbeads der Firma Miltenyi verwendet. Nach der Zentrifugation der Zellen wurden diese in MACS-Puffer aufgenommen und die Zellzahl bestimmt. Die benötigte Menge an Knochenmarkzellen wurde entnommen und mit MACS-Puffer gewaschen. Im Anschluss daran wurden je  $10^7$  Zellen in 90  $\mu$ l MACS-Puffer zusammen mit 10  $\mu$ l anti-CD90.2 Microbeads resuspendiert und bei 4°C für 15 Min inkubiert. Es erfolgte ein erneuter Waschschrift mit 10 ml MACS-Puffer. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von  $2 \cdot 10^8$ /ml mit MACS-Puffer eingestellt und über einen PreSeparation-Filter gegeben. Die Aufreinigung erfolgte mittels autoMACS der Firma Miltenyi. Zur Entfernung der CD90.2. positiven Zellen wurde das Programm DEPLETES verwendet. Nach erfolgter Aufreinigung wurde die Negativfraktion, welche das T-Zell-depletierte Knochenmark enthielt mit 10 ml PBS gewaschen und ausgezählt. Der Wirkungsgrad der Depletion wurde durchflusszytometrisch per anti-CD3-Färbung kontrolliert. Der Gehalt an verbliebenen T-Zellen lag unter 1%.

### **3.2.2.3.2. Herstellung von Leukozyten-Einzelzellsuspension**

Die Lymphozyten wurden sowohl aus Lymphknoten (*nodi lymphoidei cervicales, nodi lymphoidei axillares, nodi lymphoidei inguinales, nodi lymphoidei mesenterici*) als auch der Milz gewonnen. Dazu wurden die Mäuse durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet, die Gewebe entnommen und in kleine Petrischalen mit PBS/BSA überführt. Die Milz wurde mittels einer Pinzette zerzupft und die resuspendierte Zellsuspension über einen 40  $\mu$ m Filter gegeben. Die Lymphknoten wurden mit einem Stempel einer 5 ml Spritze über einen 40  $\mu$ m Filter gegeben. Die Zellen wurden dann 6 Min bei 330 g und 4°C mit PBS/BSA gewaschen

#### **3.2.2.3.2.1. T-Zellisolation**

Für die Gewinnung von T-Zellen kam das Pan T Cell Isolation Kit II der Firma Miltenyi zur Anwendung. Dabei wurden die gewonnenen Lymphozyten (Abschnitt 3.2.2.3.2.) mit MACS-Puffer gewaschen und je  $10^7$  Zellen mit 40  $\mu$ l MACS-Puffer und 10  $\mu$ l Biotin-

Antikörpercocktail gemischt. Die Inkubation erfolgte für 10 Min bei 4°C. Im Anschluss wurden je  $10^7$  Zellen in 30  $\mu$ l MACS-Puffer sowie 20  $\mu$ l anti-Biotin Microbeads resuspendiert und für 15 Min bei 4°C inkubiert. Die Zellen wurden auf eine Konzentration von  $2 \cdot 10^8$ /ml mit MACS-Puffer eingestellt und über einen PreSeparation-Filter gegeben. Die Aufreinigung wurde mit dem autoMACS und dem Programm DEplete durchgeführt. Die Negativfraktion, welche die aufgereinigten T-Zellen enthielt, wurde mit 10 ml PBS gewaschen und ausgezählt. Die Reinheit der isolierten T-Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie und Färbung der Zellen mit anti-CD3-Antikörpern ermittelt. Sie lag bei durchschnittlich 95%.

### 3.2.2.3.3. Bewertung des Krankheitsverlaufes

Die Tiere wurden in den ersten zehn Tagen täglich und im Anschluss daran drei Mal die Woche begutachtet und an Hand verschiedener Parametern bewertet, die an das Bewertungsschema in der Klinik angelehnt sind (Cooke et al., 1996). Dazu gehörte die Messung des Gewichts, die Bewertung des Fells, der Körperhaltung, der vorhandenen Aktivität und das Vorhandensein von Durchfall. Jeder Parameter erhielt die Wertigkeit von 0 (keine Symptome) bis hin zu 2 (starke Symptome). Daraus errechnete sich eine Punktezahl von 0 bis 10. Beim Erreichen von 7 und mehr Punkten oder dem Gewichtsverlust von mehr als 25% an zwei aufeinanderfolgenden Messungen wurden die Tiere aus ethischen Gründen aus dem Versuch genommen und euthanasiert.

Tab. 16: Bewertungsschema aGvHD

Parameter	0	1	2
<b>Fell</b>	Normal (gesund, glatt)	Leicht struppiges Fell	Sehr struppig, keine Fellpflege
<b>Haltung</b>	Normal	Leicht gekrümmter Rücken (in Ruhe)	Stark gekrümmter Rücken
<b>Aktivität</b>	Normal (aktiv)	Leicht reduziert	Bewegungslos, Reaktion nur über direktes Anstoßen
<b>Durchfall</b>	Keinen	Mild (After leicht verschmutzt)	Stark (After stark verschmutzt)
<b>Gewichtsabnahme</b>	< 10%	10-25%	> 25%

#### **3.2.2.4. Messung der Blut-Glukose**

Für manche Versuche wurde der Gehalt an Glukose im Blut bestimmt. Dazu wurde die Maus an der Schwanzvene mit einer Kanüle punktiert, der erste Blutstropfen verworfen und ein Tropfen Blut mit dem Ascensia CONTOUR<sup>®</sup> Blutzuckermessgerät sowie den dazugehörigen CONTOUR<sup>®</sup> Test Streifen gemessen.

#### **3.2.2.5. Erfassung der Körpertemperatur**

Zur Messung der Körpertemperatur wurde die Maus in eine Halterung gesetzt und die Temperatur rektal mit einem Thermometer für Nagetiere gemessen.

#### **3.2.2.6. Dex-Behandlung**

Die ersten Symptome in unserem Modell der aGvHD traten ab Tag 3 auf und nahmen rasch zu. Daher erfolgte eine intraperitoneale (i. p.) Applikation von Dex zwischen Tag 3 und Tag 6 mit einer Konzentration von 100 mg/kg Körpergewicht.

#### **3.2.2.7. anti-IL-6-Gabe**

Zur Analyse der Rolle von IL-6 bei der aGvHD wurden 100 µl des anti-IL-6-Antikörpers MP5-20F3 der Firma eBioscience an Tag 2 sowie Tag 6 (bei Langzeitexperimenten) mit einer Konzentration von 1 mg/ml i. v. injiziert.

#### **3.2.2.8. Gewinnung von Serum**

Die Mäuse wurden mittels CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet und das Herz mit einer 24G-Kanüle und einer 5 ml Spritze punktiert. Das Blut wurde in Serum-Röhrchen (BD Microtainer™ Plastic Capillary Blood Collector, gold mit Clot Gel) überführt und nach 30 Min bei RT bei 16.000 g zentrifugiert. Das Serum wurde in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei -20°C gelagert.

### **3.2.2.9. Probenentnahme**

Die Mäuse wurden durch CO<sub>2</sub>-Inhalation getötet, der Bauchraum mittels Pinzette und Schere eröffnet und die entsprechenden Zielorgane ganz oder nur zum Teil entnommen. Der Dünndarm wurde entnommen, gründlich mit PBS gespült und in kurze Stücke geteilt. Ein Teil wurde für histologische Untersuchungen in 4% PFA eingelegt. Der andere Teil wurde für Genexpressionsanalysen in Kryo-Röhrchen überführt und bei -80°C eingefroren. Ebenso wurde die Milz entnommen und entweder sofort für die direkte Analyse verwendet, z. B. Durchflusszytometrie oder für den <sup>51</sup>Cr-Test (Abschnitt 3.2.1.2.4.), oder auch ein Teil für Genexpressionsanalysen bei -80°C gelagert.

### **3.2.3. Statistik**

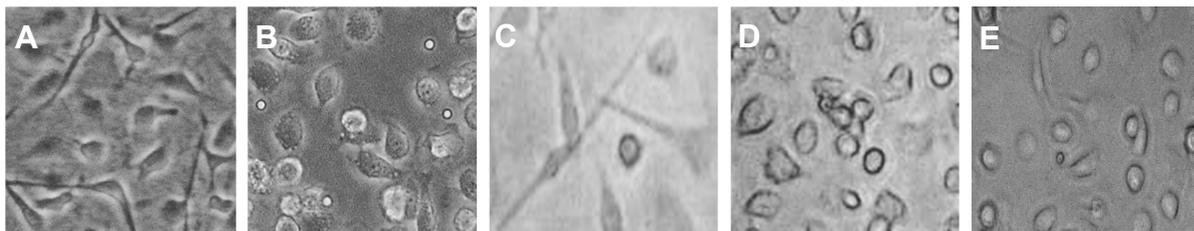
Die statistische Analyse und Darstellung wurde unter Verwendung des Programms GraphPad Prism durchgeführt. Es wird wenn nicht anders ausgewiesen der Mittelwert mit dazugehörigem Standardfehler dargestellt. P-Werte unter 0,05 wurden als signifikant erachtet. Dabei gab es folgende Unterteilungen: P 0,05: ns; P ≤ 0,05: \*; P ≤ 0,01: \*\*; P ≤ 0,001: \*\*\*

## 4. Ergebnisse

### 4.1. Charakterisierung verschieden polarisierter muriner Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) *in vitro*

#### 4.1.1. Morphologie

Makrophagen polarisieren unter dem Einfluss verschiedener Stimuli wie Zytokinen oder Hormonen zu unterschiedlichen Phänotypen mit definierten Eigenschaften, beispielsweise einem erhöhten pro-inflammatorischen Potential oder einer verbesserten Wundheilungsfähigkeit. Um zu untersuchen, ob sich dies in typischen morphologischen Veränderungen widerspiegelt, die möglicherweise mit den funktionellen Charakteristika der Makrophagen in Verbindung stehen, sollte die Morphologie von Knochenmarksmakrophagen (*bone marrow derived macrophages*, BMDMs) untersucht werden, welche mit LPS, IL-4, Dex oder einer Kombination letzterer beider behandelt wurden. Hierzu wurden Makrophagen aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen generiert (BMDMs) und für 24 h stimuliert. LPS wurde dabei verwendet, um eine M1-Polarisation zu erzielen, IL-4 und Dex um die Makrophagen in Richtung M2 zu polarisieren. Daneben blieb eine Gruppe unbehandelt (M0-Makrophagen). Anschließend wurden die BMDMs mikroskopisch untersucht (Abb. 4).



**Abb. 4: Morphologie polarisierter muriner BMDMs**

BMDMs, generiert aus C57BL/6 Mäusen, wurden 24 h entweder mittels IL-4 (**C**, M2I), Dex (**D**, M2D) oder der Kombination aus beiden (**E**, M2ID) in die M2-Richtung, mit LPS (**B**, M1) in M1-Richtung polarisiert oder nur mit Medium behandelt (**A**, unpolarisiert, M0). (20-40x Vergrößerung)

Die unbehandelten BMDMs stellten sich als adhärenente Zellen mit gut ausgebildeten Pseudopodien dar. Die Behandlung mit LPS führte zu stark abgeflachten Zellen, welche eine einem Spiegel-Ei ähnelnde Form aufwiesen und vielen Granula enthielten (M1-Makrophagen). Dagegen war die Behandlung mit IL-4 mit einer starken Elongation der Zellen verbunden (M2I-Makrophagen). Dex hatte zur Folge,

dass sich die Zellen (M2D-Makrophagen) abrundeten und nicht mehr so adhärent waren. Die Kombination aus Dex und IL-4 (M2ID-Makrophagen) führte interessanterweise zu einem Phänotyp, der den Dex-behandelten Makrophagen ähnelte, da die Zellen ebenfalls stark abgerundet waren. Vereinzelt waren jedoch auch stark elongierte Zellen zu beobachten. Zusammengefasst zeigt dieser Versuch, dass Makrophagen unter dem Einfluss unterschiedlicher Stimuli distinkte morphologische Änderungen zeigen, welche möglicherweise mit dem Phänotyp korrelieren und Rückschlüsse auf deren funktionelle Eigenschaften zulassen.

#### 4.1.2. Genexpressionsanalyse

Angesichts der morphologischen Unterschiede sollte im nächsten Schritt getestet werden, inwiefern die Polarisierungen der Makrophagen mit einer veränderten Genexpression in Verbindung stehen. So war bereits bekannt, dass der Phänotyp polarisierter Makrophagen in der Maus durch die Expression definierter Markergene bestimmt wird (Murray et al., 2014). Zu diesem Zweck wurden die mit unterschiedlichen Stimuli behandelten BMDMs hinsichtlich der Expression charakteristischer M1- (*TNFA* und *iNos*) und M2- (*CD163*, *Arg1*, *CD206*, *Ym1*) assoziierter Gene auf mRNA-Ebene untersucht. Im Vordergrund stand insbesondere die Frage, ob die kombinierte Behandlung der Makrophagen mit IL-4 und Dex synergistische Effekte auf das Genexpressionsmuster hat. Die Ergebnisse sind in Abb. 5 dargestellt.

*CD163* ist ein *Scavenger*-Rezeptor, der bei der Phagozytose und der Regeneration eine Rolle spielt, und dessen erhöhte Expression mit einem M2-Status assoziiert ist (Fabriek et al., 2009; Kowal et al., 2011; Schaer et al., 2002). Die Expression von *CD163* (Abb. 5 B) war bei IL-4 (M2I), sowie Dex (M2D) als auch bei kombinierter Behandlung mit IL-4 und Dex (M2ID) signifikant erhöht gegenüber den unbehandelten (M0) und LPS-behandelten BMDMs (M1). Es war weiterhin zu erkennen, dass diese Erhöhung bei den mit Dex (M2D) behandelten BMDMs stärker ausfällt und durch die kombinierte Behandlung nochmals angehoben wurde. Diese Erhöhung der *CD163*-Expression war bei der kombinierten Behandlung im Vergleich zur Einzelbehandlung mit IL-4 (M2I) signifikant und mit Dex (M2D) tendenziell zu erkennen. Bei den LPS-behandelten BMDMs (M1) wurde dagegen die Expression von *CD163* im Vergleich zu den unbehandelten BMDMs signifikant reduziert.

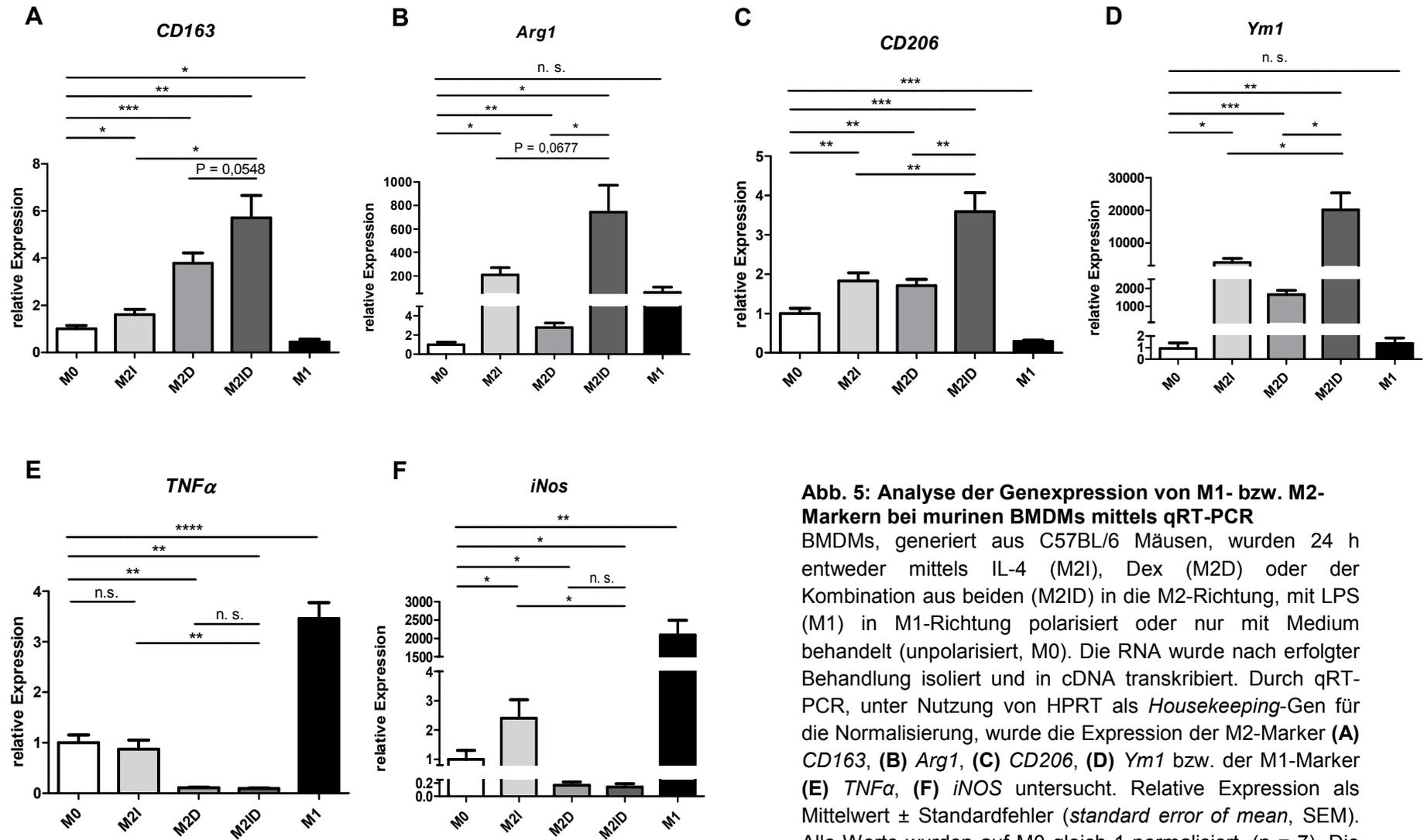
Arginase1 (*Arg1*) ist ein in der Literatur oft beschriebener Marker der M2-Polarisation, speziell bei IL-4-Behandlung (Raes et al., 2005). Es handelt sich hierbei um ein Enzym, welches antagonistisch zu iNOS wirkt, weil es mit dieser um dasselbe Substrat konkurriert und somit die Menge an pro-inflammatorisch wirkendem NO vermindert (Rath et al., 2014). An Hand der Abb. 5 B erkennt man eine signifikante Erhöhung der *Arg1*-Expression durch IL-4-Behandlung (M2I) und Dex-Behandlung (M2D) im Vergleich zu den unbehandelten M0-Makrophagen. Die Kombinationsbehandlung (M2ID) erhöhte die Expression gegenüber denen der Einzelbehandlung nochmals. In den LPS-behandelten Makrophagen (M1) war ebenfalls ein Anstieg der Expression von *Arg1* zu verzeichnen. Dieser war jedoch nicht signifikant.

CD206 gehört ebenfalls zu den in der Literatur beschriebenen M2-Markern (Rözer, 2015). Dabei handelt es sich um den Mannose-Rezeptor, der der Pathogenerkennung dient (Kerrigan and Brown, 2009). Man beobachtete eine signifikante Induktion der *CD206*-Expression bei IL-4 (M2I), sowie Dex (M2D) als auch bei kombinierter Behandlung mit IL-4 und Dex (M2ID) im Vergleich zu den unbehandelten und M1-Makrophagen (Abb. 5 C). Zu erwähnen ist auch eine zusätzliche Induktion von *CD206*-Expression bei der Kombinationsbehandlung aus IL-4 und Dex (M2ID) gegenüber der Einzelbehandlung. Dagegen war die Expression bei M1-Makrophagen im Vergleich zu den M0-Makrophagen signifikant reduziert. Ym1 ist ein weiterer M2-Marker, ein sekretorisches Protein (Chitinase) (Raes et al., 2005). Seine Funktion ist nur unzureichend geklärt, aber es gibt Hinweise für eine Beteiligung an der Wundheilung (Nair et al., 2005). Wie in Abb. 5 D zu erkennen ist, fand eine Induktion der *Ym1*-Expression sowohl bei IL-4 (M2I) sowie Dex (M2D) als auch bei kombinierter Behandlung mit IL-4 und Dex (M2ID) im Vergleich zu den unbehandelten und M1-Makrophagen statt. Die Kombinationsbehandlung erhöhte die Expression von *Ym1* nochmals gegenüber der Einzelbehandlung signifikant. Dagegen war die Expression bei den M1-Makrophagen vergleichbar mit den M0-Makrophagen.

TNF $\alpha$  ist ein pro-inflammatorisches Zytokin, das vor allen von Makrophagen produziert wird und insbesondere in der Anfangsphase einer Entzündung eine Rolle spielt (Gillett et al., 2010; Mizgerd et al., 2001). Zudem ist TNF $\alpha$  bekannt als ein wichtiger Makrophagenmarker der M1-Polarisation, die z. B. durch LPS stimuliert wurden (Benoit et al., 2008). Die Expression war bei Dex (M2D)- sowie kombinierter

Behandlung mit IL-4 (M2ID) signifikant reduziert im Vergleich zu M0- und M1-Makrophagen (Abb. 5 E). Jedoch konnte hinsichtlich der Kombinationsbehandlung kein additiver Effekt festgestellt werden. Bei den LPS-behandelten M1-Makrophagen war die *TNF $\alpha$* -Expression gegenüber den M0-Makrophagen signifikant erhöht. Bei IL-4 (M2I)-Behandlung bleibt die Expression auf dem Niveau von M0-Makrophagen.

Bei iNOS handelt es sich um ein Enzym, das die Synthese von Stickstoffmonoxid aus Arginin katalysiert (Rath et al., 2014). Dieser Vorgang ist für M1-Makrophagen charakteristisch. Das gebildete NO ist ein wichtiges Effektormolekül, z. B. bei der Beseitigung von Bakterien oder der Induktion der Apoptose (Fang, 2012; Niedbala et al., 2006). An Hand der Abb. 5 F sieht man, dass die Expression von *iNOS* bei den Dex-behandelten Makrophagen (M2D) und durch Kombinationsbehandlung (M2ID) signifikant herabgesetzt war im Vergleich zu den M0-Makrophagen. Ein additiver Effekt durch die kombinierte Behandlung war nicht festzustellen. Dagegen war sie bei den IL-4-behandelten Makrophagen (M2I) und bei den LPS-behandelten (M1) Makrophagen signifikant gegenüber den M0-Makrophagen erhöht.



**Abb. 5: Analyse der Genexpression von M1- bzw. M2-Markern bei murinen BMDMs mittels qRT-PCR**

BMDMs, generiert aus C57BL/6 Mäusen, wurden 24 h entweder mittels IL-4 (M2I), Dex (M2D) oder der Kombination aus beiden (M2ID) in die M2-Richtung, mit LPS (M1) in M1-Richtung polarisiert oder nur mit Medium behandelt (unpolarisiert, M0). Die RNA wurde nach erfolgter Behandlung isoliert und in cDNA transkribiert. Durch qRT-PCR, unter Nutzung von HPRT als *Housekeeping*-Gen für die Normalisierung, wurde die Expression der M2-Marker (A) *CD163*, (B) *Arg1*, (C) *CD206*, (D) *Ym1* bzw. der M1-Marker (E) *TNF $\alpha$* , (F) *iNOS* untersucht. Relative Expression als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler (*standard error of mean*, SEM). Alle Werte wurden auf M0 gleich 1 normalisiert. (n = 7). Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaarten t-Tests.

Die Ergebnisse der Genexpressionsanalyse stehen im Einklang mit aus in der Literatur bekannten Datenlage, nämlich dass sich durch LPS-Stimulation eine M1- und durch Behandlung mit IL-4 oder Dex eine M2-Polarisation erreichen lässt (Gordon, 2003; Mosser and Edwards, 2008; Murray et al., 2014). Die kombinierte IL-4/Dex-Behandlung hatte einen synergistischen Effekt in Hinblick auf die Regulation M2-typischer Marker, wobei auffiel, dass die Wirkung von Dex zumeist dominant war.

#### **4.1.3. Durchflusszytometrische Analyse (FACS)**

Im nächsten Schritt sollten die qRT-PCR Daten auf Proteinebene verifiziert werden. Dies sollte durch Untersuchung spezifischer Oberflächenmarker mittels FACS-Analyse erreicht werden. Die Ergebnisse sind in Abb. 6 gezeigt.

Im Falle des für M2-Makrophagen typischen Mannose-Rezeptors CD206 (Abb. 6 A) zeigt sich nach IL-4-Behandlung (M2I) eine signifikante Induktion gegenüber dem M0-Zustand und eine leichte Erhöhung bei den kombiniert behandelten Makrophagen (M2ID). Tendenziell war ein zusätzlicher Anstieg durch die Kombinationsbehandlung (M2ID) im Vergleich zu den Einzelbehandlungen mit IL-4 (M2I) oder Dex (M2D) zu beobachten. Die Reduktion von CD206 in den M1-Makrophagen im Vergleich zu den M0-Makrophagen hingegen war knapp nicht signifikant.

Der Transferrin-Rezeptor CD71, welcher eine wichtige Rolle im Eisenstoffwechsel spielt, ist ebenfalls als M2-Marker beschrieben (Corna et al., 2010). Die Analyse von CD71 (Abb. 6 B) zeigte eine tendenzielle Erhöhung der Expression bei den mit IL-4 behandelten Makrophagen (M2I), während sie in allen anderen Gruppen gegenüber den M0-Makrophagen vermindert war.

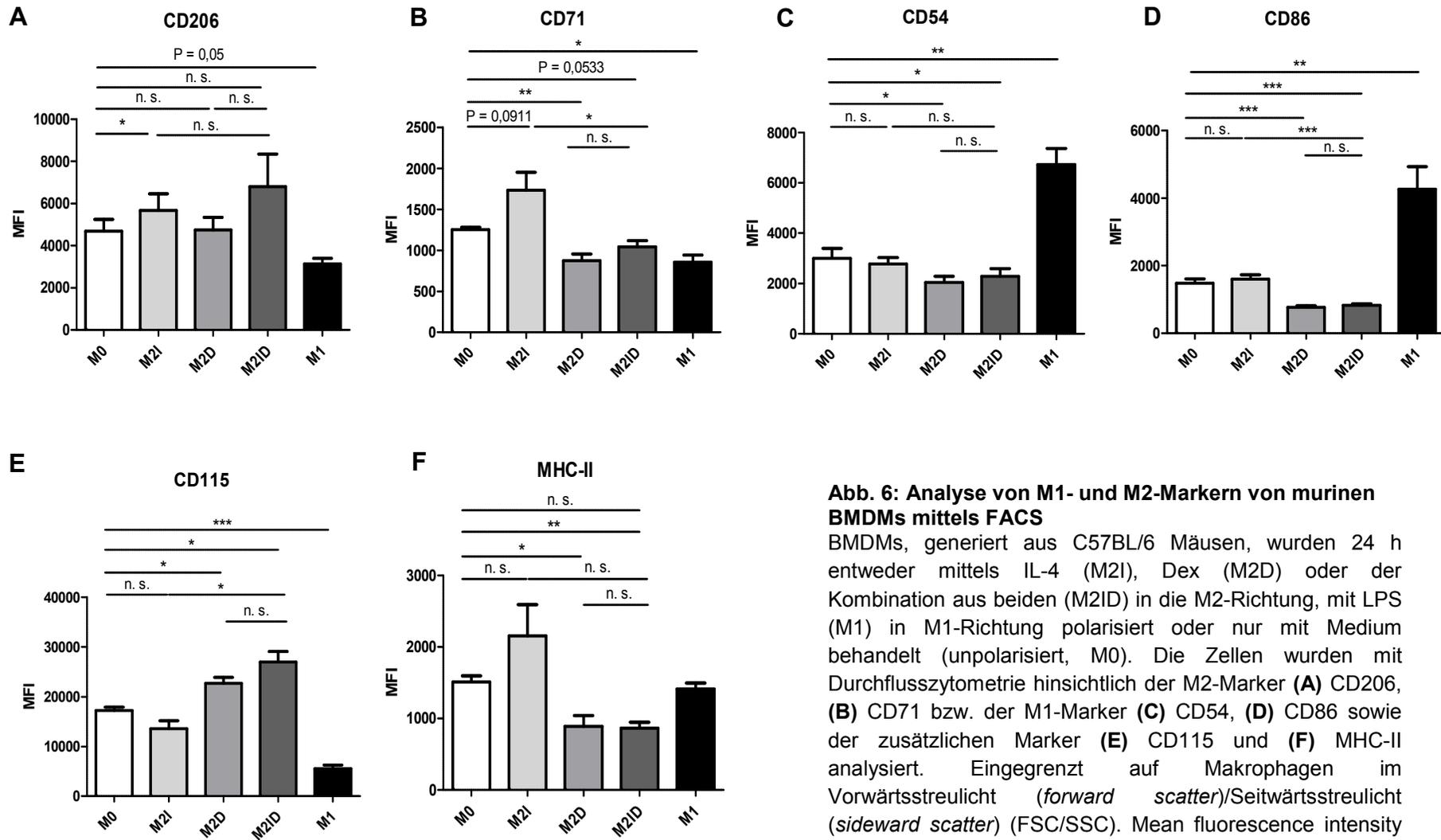
Das Zelladhäsionsmolekül CD54 (ICAM-1) sowie das co-stimulatorische Molekül CD86 (B7-2), dass bei der Aktivierung von T-Zellen wichtig ist, sind klassische M1-Marker (Martinez and Gordon, 2014). Sie sind wie in Abb. 6 C bzw. D zu sehen in den LPS-behandelten Makrophagen (M1) signifikant erhöht, während sie in den Dex-behandelten (M2D) sowie den kombiniert behandelten Makrophagen (M2ID) gegenüber den M0-Makrophagen signifikant reduziert war.

Bei CD115 handelt es sich um den Rezeptor für M-CSF (CSF-1R). Dieser ist zwar keiner Polarisation zugeordnet, jedoch mit dem Reifungsgrad von Makrophagen

assoziiert (Wang et al., 2013a). Man erkennt eine signifikante Induktion bei den Dex-behandelten Makrophagen (M2D) sowie bei kombinierter Behandlung (M2ID) im Vergleich zu den M0-Makrophagen. Die Kombinationsbehandlung (M2ID) führte dabei zu einer tendenziellen zusätzlichen Erhöhung von CD115 gegenüber der Einzelbehandlung mit Dex (M2D). Bei den M1-Makrophagen war CD115 dagegen verglichen mit den M0-Makrophagen signifikant erniedrigt (s. Abb. 6 E).

Die MHC-II-Expression beeinflusst die Antigenpräsentation gegenüber CD4<sup>+</sup>-T-Zellen (Murphy Kenneth M., 2009). Bei den IL-4-behandelten Makrophagen (M2I) war ein Anstieg von MHC-II zu verzeichnen, der jedoch nicht signifikant war. Dagegen war MHC-II bei den Makrophagen mit Dex-Behandlung (M2D) signifikant und bei kombinierter Behandlung (M2ID) tendenziell reduziert. Bei den M1-Makrophagen war die Expression von MHC-II vergleichbar mit den M0-Makrophagen (s. Abb. 6 F).

Zusammengenommen bestätigen diese Ergebnisse die zuvor gemachten Beobachtungen der Genexpressionsanalyse, dass die Behandlung von BMDMs mit verschiedenen Stimuli zu unterschiedlichen Polarisierungen führt, die sich durch einen bestimmten Phänotyp auszeichnen. Zusammen mit den Daten der qRT-PCR lässt sich eine starke M2-Polarisation der kombiniert behandelten Makrophagen feststellen.



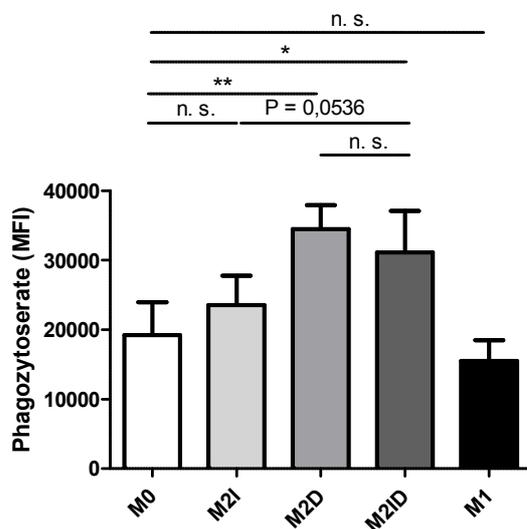
**Abb. 6: Analyse von M1- und M2-Markern von murinen BMDMs mittels FACS**

BMDMs, generiert aus C57BL/6 Mäusen, wurden 24 h entweder mittels IL-4 (M2I), Dex (M2D) oder der Kombination aus beiden (M2ID) in die M2-Richtung, mit LPS (M1) in M1-Richtung polarisiert oder nur mit Medium behandelt (unpolarisiert, M0). Die Zellen wurden mit Durchflusszytometrie hinsichtlich der M2-Marker **(A)** CD206, **(B)** CD71 bzw. der M1-Marker **(C)** CD54, **(D)** CD86 sowie der zusätzlichen Marker **(E)** CD115 und **(F)** MHC-II analysiert. Eingegrenzt auf Makrophagen im Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*)/Seitwärtsstreulicht (*sideward scatter*) (FSC/SSC). Mean fluorescence intensity (MFI) als Mittelwert  $\pm$  SEM ( $n = 4-7$ ). Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaarten t-Tests.

#### 4.1.4. Funktionelle Eigenschaften der BMDMs

##### 4.1.4.1. Phagozytose

Die Phagozytose von Pathogenen durch Makrophagen ist ein essentieller Bestandteil der Immunabwehr. Außerdem werden mittels Phagozytose auch apoptotische Zellen entfernt, beispielsweise bei der Wundheilung und Gewebereparatur. Die Unterschiede bezüglich der Expression von *CD163* und *CD206* deuteten bereits auf eine veränderte Phagozytose hin. Daher wurde diese Fähigkeit für die verschieden behandelten BMDMs untersucht. BMDMs wurden wie beschrieben generiert und mit LPS, IL-4, Dex oder IL-4/Dex für 24 h behandelt. Zur Untersuchung der Phagozytoseeigenschaft wurden Fluorophor-gekoppelte *Escherichia Coli*-Bakterien eingesetzt, die zusammen mit den Makrophagen inkubiert wurden. Nach Ablauf einer Stunde wurde die Aufnahme der Bakterien in die Makrophagen mittels FACS-Analyse gemessen, wobei man sich zu Nutze machte, dass die Emission des Fluorophors pH-abhängig war und somit nur nach Aufnahme des Bakteriums in das Phagolysosom erfolgte.



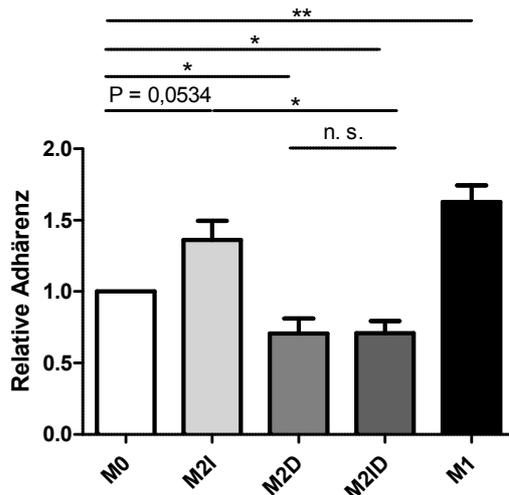
#### Abb. 7: Phagozytose-Eigenschaften von polarisierten murinen BMDMs

BMDMs, generiert aus C57BL/6 Mäusen, wurden 24 h entweder mittels IL-4 (M2I), Dex (M2D) oder der Kombination aus beiden (M2ID) in die M2-Richtung, mit LPS (M1) in M1-Richtung polarisiert oder nur mit Medium behandelt (unpolarisiert, M0). Für den Phagozytose-Test wurde das pHrodo™ Green *E. coli* BioParticles® Konjugat verwendet. Die Zellen wurden zur Analyse der Aufnahme von pHrodo gekoppelten *Escherichia Coli*-Bakterien auf Makrophagen (im FSC/SSC) eingegrenzt und mittels Durchflusszytometrie untersucht. (n = 4). Mean fluorescence intensity (MFI) als Mittelwert ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaarten t-Tests.

In Abb. 7 ist zu erkennen, dass die Phagozytoserate bei den mit Dex-behandelten (M2D) sowie den kombiniert behandelten Makrophagen (M2ID) im Vergleich zu den M0-Makrophagen signifikant zunahm. Dagegen war sie bei den M1-Makrophagen tendenziell erniedrigt. Dies deutet darauf hin, dass die unterschiedlichen Stimuli auch die Fähigkeit zur Phagozytose beeinflussen. Die Ergebnisse bestätigen somit Daten aus der Literatur, dass beispielsweise Dex die Phagozytose verstärkt (Giles et al., 2001; McColl et al., 2007). Dennoch ließ sich ein additiver Effekt nach kombinierter Behandlung nicht feststellen, wie es die Genexpression von *CD163* oder *CD206* hatte vermuten lassen.

#### **4.1.4.2. Adhärenz**

Die morphologische Analyse der Makrophagen hatte Hinweise darauf geliefert (s. Abb. 4), dass die Polarisierung auch Einfluss auf die Adhärenz hat. Ebenso deutete die Analyse der Expression von *CD54* auf ein verändertes Adhärenzverhalten hin. Zur Quantifizierung der Adhärenz wurde ein Test durchgeführt, bei dem die verschieden polarisierten BMDMs fixiert, mit Kristallviolettlösung gefärbt und dann lysiert wurden. Die Farbtintensität gab dann Auskunft über die Anzahl der adhärenierten BMDMs. Die in Abb. 8 dargestellten Ergebnisse zeigen eine tendenzielle Erhöhung der Adhärenz bei den mit IL-4-behandelten Makrophagen (M2I) sowie eine signifikante Steigerung bei den M1-Makrophagen im Vergleich zu den M0-Makrophagen. Gleichzeitig führten die Behandlung mit Dex (M2D) sowie die Kombination aus IL-4 und Dex (M2ID) zu einer verringerten Adhärenz gegenüber den unbehandelten M0-Makrophagen. Folglich beeinflussen die verschiedenen Polarisierungen die Adhärenz auf unterschiedliche Weise, wobei Dex einen dominanten Einfluss gegenüber IL-4 hat.

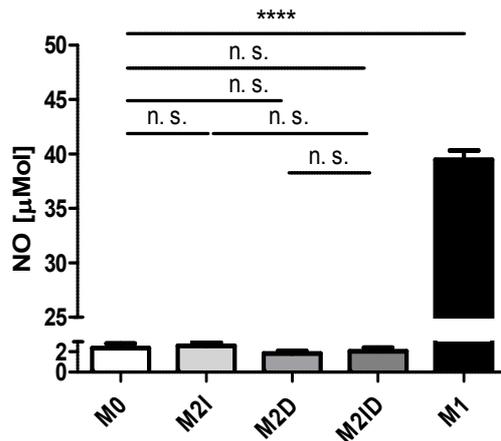


#### Abb. 8: Adhärenz von polarisierten murinen BMDMs

BMDMs, generiert aus C57BL/6 Mäusen, wurden 24 h entweder mittels IL-4 (M2I), Dex (M2D) oder der Kombination aus beiden (M2ID) in die M2-Richtung, mit LPS (M1) in M1-Richtung polarisiert oder nur mit Medium behandelt (unpolarisiert, M0). Für den Adhärenz-Test wurde Kristallviolett verwendet. Die Zellen wurden mit Ethanol fixiert, mit Kristallviolett gefärbt und mit TritonX-Lösung lysiert. Die Absorption des Lysates wurde bei 570 nm gemessen. Alle Werte wurden auf M0 gleich 1 normalisiert. (n = 5). Relative Quantifizierung als Mittelwert ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels ungepaarten t-Tests.

#### 4.1.4.3. NO-Synthese

Klassisch aktivierte Makrophagen zeichnen sich durch die Synthese von Stickstoffmonoxid (NO) aus. Wie bereits zuvor ausgeführt gehört NO zu den Effektormolekülen, die bei der Pathogenentfernung eine Rolle spielen (Mosser and Edwards, 2008). Ebenso lassen die Ergebnisse der qRT-PCR auf eine veränderte NO-Synthese schließen. Zur Klärung, ob die Behandlung der Makrophagen einen Einfluss auf die NO-Synthese hat und zur Bestätigung der qRT-PCR Ergebnisse, wurde die Menge an NO im Überstand der Makrophagenkultur mittels einer Farbreaktion unter Nutzung des Griess-Reagenz bestimmt. Wie man in der Abb. 9 sehen kann, stieg die synthetisierte Menge an NO bei den mit LPS behandelten Makrophagen (M1) signifikant an. Dagegen fand sich in allen anderen Gruppen ein ähnliches Niveau wie bei den M0-Makrophagen. Dies bestätigt die Ergebnisse der qRT-PCR hinsichtlich der Expression von iNOS und belegt, dass ausschließlich eine Stimulation mit LPS zur NO-Synthese führt (Weisz et al., 1996).



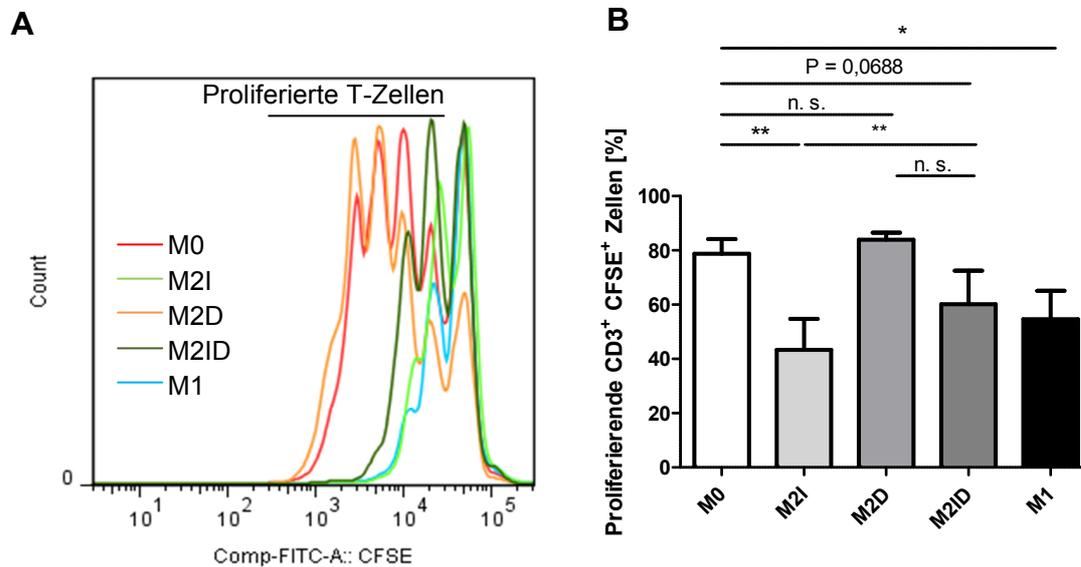
#### Abb. 9: NO-Produktion von polarisierten murinen BMDMs

BMDMs, generiert aus C57BL/6 Mäusen, wurden 24 h entweder mittels IL-4 (M2I), Dex (M2D) oder der Kombination aus beiden (M2ID) in die M2-Richtung, mit LPS (M1) in M1-Richtung polarisiert oder nur mit Medium behandelt (unpolarisiert, M0). Für den NO-Test wurden 50 µl des Überstandes mit Griess-Reagenz inkubiert und das Gemisch bei 570 nm gemessen. (n = 6). Relative Quantifizierung als Mittelwert ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaarten t-Tests.

#### 4.1.4.4. Einfluss auf die T-Zellproliferation

Ein wichtiger Schritt im Verlauf einer aGvHD ist die Aktivierung und Proliferation von alloreaktiven T-Zellen (Ferrara et al., 2009; Reddy, 2003). Die Fähigkeit von Makrophagen zur Suppression dieser T-Zellen ist daher eine wichtige funktionelle Eigenschaft vor dem Hintergrund deren möglichen Einsatzes in der Therapie einer aGvHD. Zur Untersuchung, welchen Einfluss die verschieden behandelten Makrophagen auf proliferierende T-Zellen haben, und inwiefern sie in der Lage sind diese zu modulieren, wurde ein T-Zell-Proliferationstest durchgeführt. Hierzu wurden T-Zellen *in vitro* mit Concanavalin A (ConA) polyklonal aktiviert und in Gegenwart verschieden polarisierter BMDMs inkubiert (Rudick et al., 1993; Weisz et al., 1996). Wie man der Abb. 10 B entnehmen kann, war der Anteil der proliferierenden T-Zellen bei den M2I-Makrophagen signifikant geringer als bei den M0-Makrophagen. Eine tendenziell verringerte Proliferation war auch bei den kombiniert behandelten Makrophagen (M2ID) zu finden. Es ist zu beobachten, dass die Proliferation der T-Zellen bei den M1-Makrophagen ebenfalls signifikant abnahm. Die Dex-behandelten Makrophagen (M2D) zeigten keinen Einfluss auf die proliferierenden T-Zellen. Die durch verschiedene Stimuli polarisierten Makrophagen beeinflussen die T-Zellproliferation in unterschiedlicher Weise, wobei die

M2I-Makrophagen wie zuvor beschrieben suppressiv wirken (Huber et al., 2010). Es ließ sich ebenso ein dominanter Effekt von Dex feststellen, da es nicht möglich war, durch die Kombination mit IL-4 die T-Zellproliferation noch stärker zu supprimieren.



#### Abb. 10: Einfluss von polarisierten murinen BMDMs auf die T-Zellproliferation

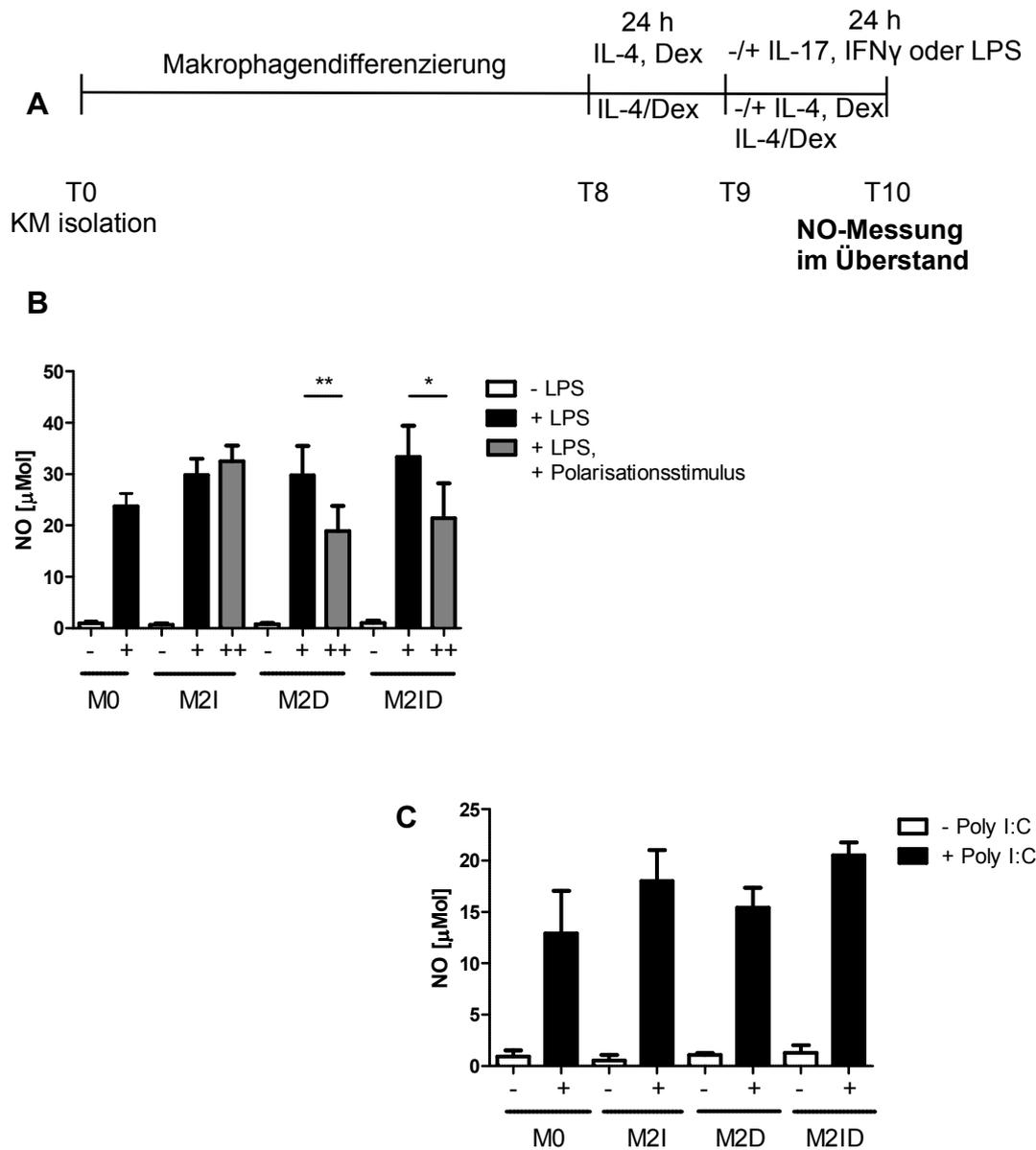
BMDMs, generiert aus C57BL/6 Mäusen, wurden 24 h entweder mittels IL-4 (M2I), Dex (M2D) oder der Kombination aus beiden (M2ID) polarisiert oder nur mit Medium behandelt (unpolarisiert, M0). T-Zellen aus C57BL/6 wurden mit CFSE gefärbt, mit ConA stimuliert und zusammen mit verschiedenen polarisierten BMDMs co-kultiviert. Nach drei Tagen wurde die T-Zellen geerntet und die Proliferation mittels FACS bestimmt (eingegrenzt auf CD3<sup>+</sup> CFSE<sup>+</sup> proliferierende T-Zellen). **(A)** Das Histogramm zeigt das CFSE-Profil von eingegrenzten CD3<sup>+</sup> CFSE<sup>+</sup> T-Zellen (stellvertretend für 8 Experimente) **(B)** Quantifizierung der Proliferation (%) als Mittelwert  $\pm$  SEM. (n = 8). Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaarten t-Tests.

#### 4.1.4.5. Stabilität: Stimulation mit TLR-Agonist (LPS, Polyl:C) und IL-17/IFN $\gamma$

In der Literatur ist beschrieben, dass die Stabilität der Polarisation von Makrophagen von ihrer Umgebung abhängt (Davis et al., 2013). Die aGvHD ist durch ein Th1-Milieu sowie durch das Vorkommen von LPS, besonders im Darm, bestimmt (Holler et al., 2010; Ju et al., 2005). Die Beibehaltung insbesondere einer M2-Polarisation wäre jedoch für eine Modulation der aGvHD essentiell. Zur Untersuchung der Stabilität der Polarisation und des damit verbundenen Phänotyps der Makrophagen wurden daher polarisierte Makrophagen einem pro-inflammatorischen Milieu ausgesetzt. Hierzu wurden ausdifferenzierte und mit

verschiedenen Stimuli behandelte BMDMs mit dem TLR4-Agonist LPS (Lu et al., 2008) oder dem TLR3-Agonisten PolyI:C (Matsumoto and Seya, 2008) stimuliert. Dabei wurde entweder der Polarisationsstimulus (IL-4, Dex, IL-4/Dex) beibehalten oder aber die Makrophagen ohne diesen stimuliert (Abb. 11 A). Eine Stimulation von M1-Makrophagen wurde dabei nicht durchgeführt. Die Überstände wurden nach 24 h auf das Vorhandensein und die Menge an NO analysiert (Abb. 11 B, C).

Man beobachtete einen signifikanten Anstieg an NO in allen Gruppen sowohl nach LPS als auch nach PolyI:C-Stimulation. Zwischen den Gruppen waren keine Unterschiede messbar. Wurde jedoch der Polarisationsstimulus Dex in der Kultur beibehalten, so erkennt man eine signifikante Reduktion der NO-Synthese, wenn die Makrophagen mit LPS stimuliert wurden. Dieses sah man sowohl bei der Einzelbehandlung, als auch in der Kombination mit IL-4. IL-4 allein dagegen hatte keinen Einfluss auf die NO-Produktion. Auch bei PolyI:C war eine Verringerung der NO-Menge bei beibehaltener Dex-Behandlung zu beobachten (Daten nicht gezeigt).

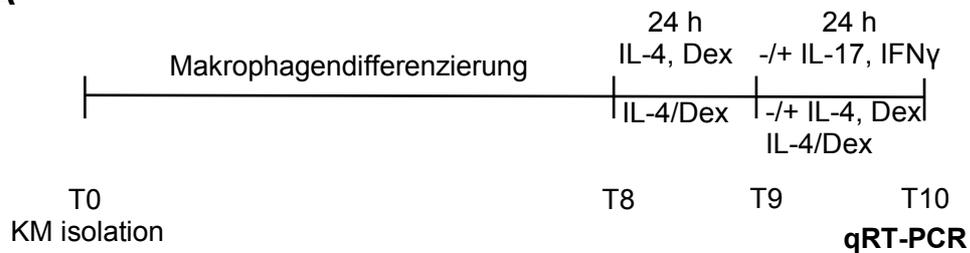


### Abb. 11: Einfluss von TLR-Agonisten auf polarisierte murine BMDMs

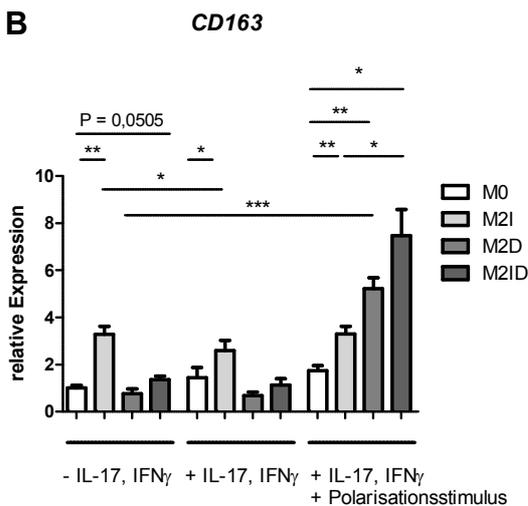
BMDMs, generiert aus C57BL/6 Mäusen, wurden 24 h entweder mittels IL-4 (M2I), Dex (M2D) oder der Kombination aus beiden (M2ID) in die M2-Richtung polarisiert oder nur mit Medium behandelt (unpolarisiert, M0). **(A)** Schematischer experimenteller Aufbau: Generierung der BMDMs aus Knochenmark für 8 Tage. Es folgt die primäre Aktivierung mit verschiedenen Polarisationsstimuli für 24 h sowie eine zweite Stimulation mit und ohne LPS oder PolyI:C für weitere 24 h unter Beibehaltung oder ohne den ersten Polarisationsstimulus. **(B)** Polarisierte BMDMs wurden ohne (weiß) und mit (schwarz) LPS (100 ng/mL) für 24 h inkubiert (n = 4). Dabei wurde den BMDMs der Polarisationsstimulus entzogen oder beibehalten (grau) (n = 3). **(C)** Polarisierte BMDMs wurden ohne (weiß) und mit (schwarz) PolyI:C (50 µg/ml) für 24 h inkubiert (n = 2). Quantifizierung der NO-Synthese im Kulturüberstand. Mittelwert ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaarten t-Tests.

Erste FACS- und Genexpressionsanalysen zur Instabilität der Makrophagen-Polarisation bestätigten die hier gemachten Beobachtungen. (Daten nicht gezeigt). Diese Daten lieferten Hinweise auf einen veränderten Phänotyp der Makrophagen, wenn diese einer pro-inflammatorischen Umgebung ausgesetzt sind. Um die Stabilität des Phänotyps in einem physiologischeren Milieu zu untersuchen, wurden polarisierte Makrophagen für 24 h mit IL-17 und IFN $\gamma$  stimuliert. Diese Zytokine spielen bei der von einer Th1-Dominanz geprägten aGvHD eine wichtige Rolle (Ju et al., 2014). Auch dabei wurde entweder der Polarisationsstimulus beibehalten oder entzogen (s. Abb. 12 A).

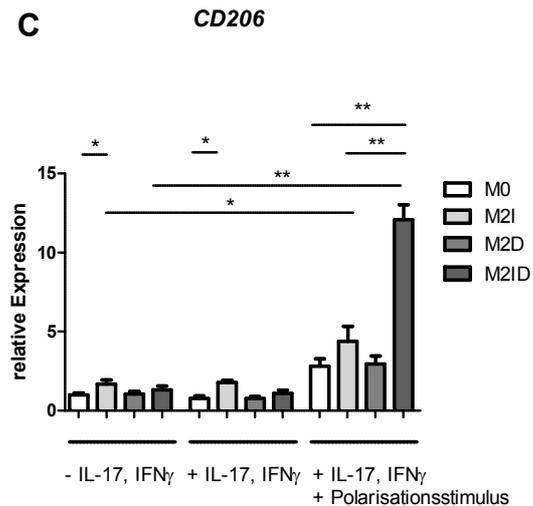
**A**

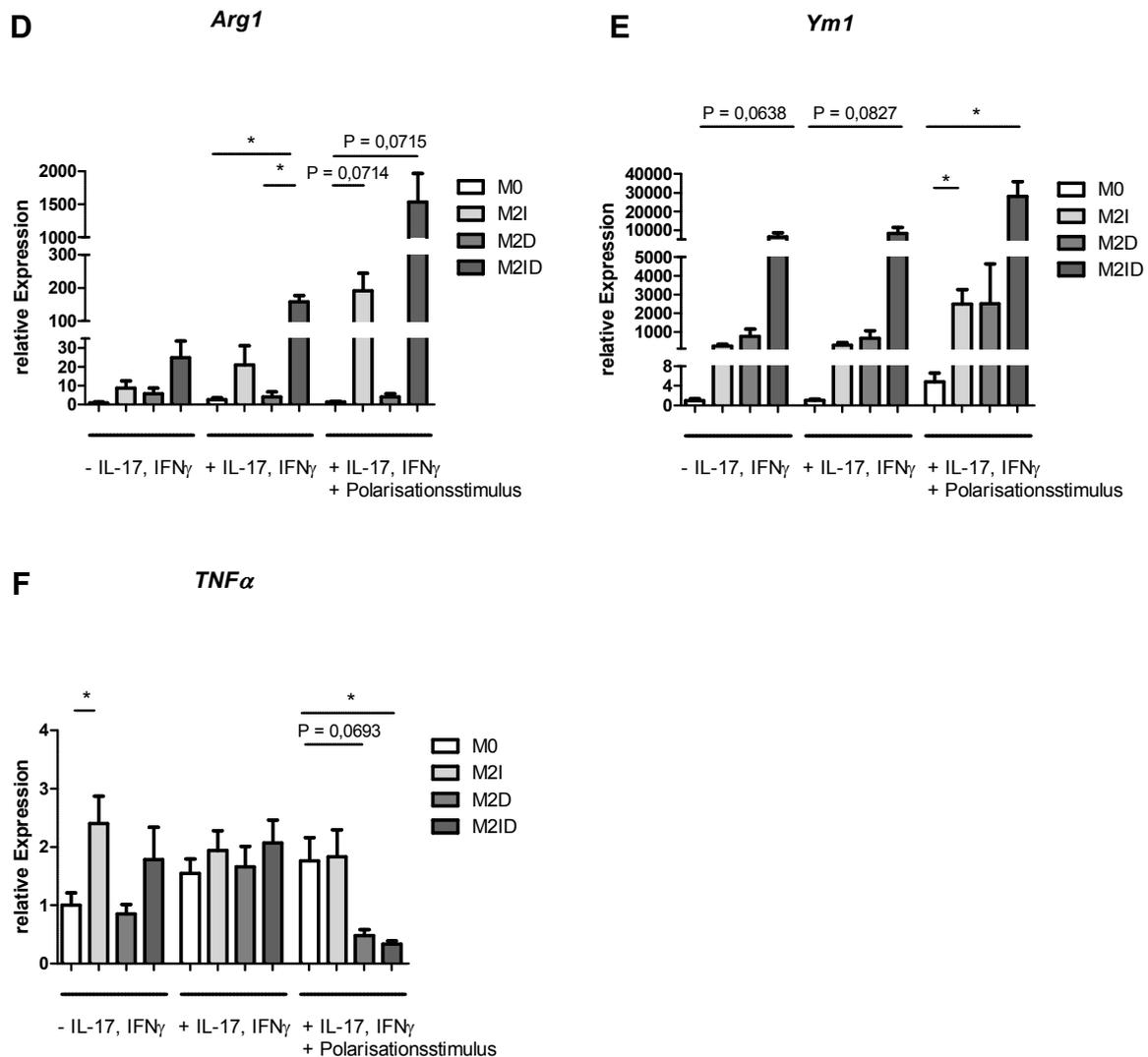


**B**



**C**





**Abb. 12: Analyse der Genexpression von M1 bzw. M2-Markern bei murinen BMDMs nach IL-17 und IFN $\gamma$ -Stimulation mittels qRT-PCR**

BMDMs, generiert aus C57BL/6 Mäusen, wurden 24 h entweder mittels IL-4 (M2I), Dex (M2D) oder der Kombination aus beiden (M2ID) in die M2-Richtung, mit LPS (M1) in M1-Richtung polarisiert oder nur mit Medium behandelt (unpolarisiert, M0). **(A)** Schematischer experimenteller Aufbau: Differenzierung der BMDMs aus Knochenmark für 8 Tage. Es folgt die primäre Aktivierung mit verschiedenen Polarisationsstimuli für 24 h sowie eine zweite Stimulation mit und ohne IL-17 sowie IFN $\gamma$  für weitere 24 h unter Beibehaltung oder ohne den ersten Polarisationsstimulus. **(B-F)** Polarisierte BMDMs wurden ohne (links) und mit (Mitte) IL-17 und IFN $\gamma$  (je 50 ng/mL) für 24 h inkubiert. Dabei wurde den BMDMs der Polarisationsstimulus entzogen oder beibehalten (rechts). Die RNA wurde nach erfolgter Behandlung isoliert und in cDNA transkribiert. Durch qRT-PCR, unter Nutzung von HPRT als *Housekeeping*-Gen für die Normalisierung, wurde die Expression der M2-Marker **(B)** *CD163*, **(C)** *Arg1*, **(D)** *CD206*, **(E)** *Ym1* bzw. des M1-Markers **(F)** *TNF $\alpha$* , untersucht. Alle Werte wurden auf M0 – IL-17/IFN $\gamma$  gleich 1 normalisiert. (n = 4). Relative Quantifizierung als Mittelwert  $\pm$  SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels gepaarten t-Tests.

Die Abb. 12 zeigt, dass ein Verbleiben der Makrophagen in Medium für 24 h (- IL-17, IFN $\gamma$ ) zu einer Reduktion der M2-Markergene *CD163*, *CD206* sowie *Arg1* im Vergleich zu den Makrophagen, die mit IL-17 und IFN $\gamma$  stimuliert und dabei der

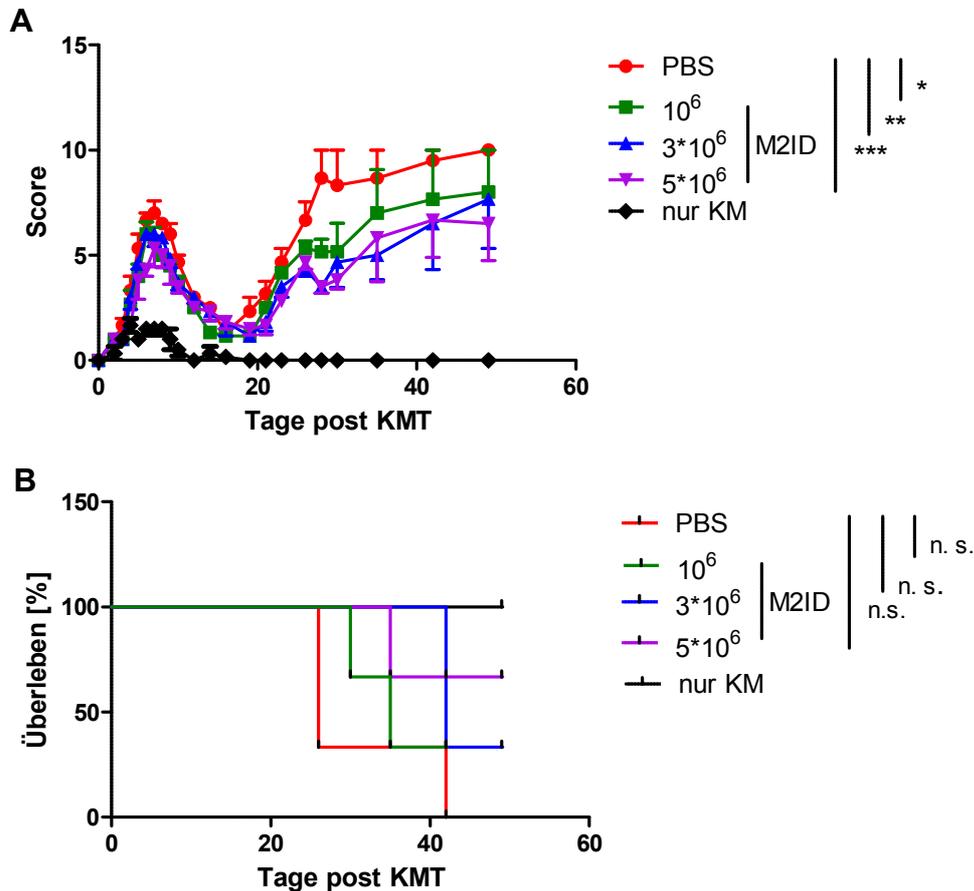
Polarisationsstimulus aufrecht erhalten blieb, führte. Dabei wirkte sich der Entzug von Dex besonders auf die Expression von *CD163* und *CD206* aus. Sie wurden weniger exprimiert und dafür wird das M1-Markergen *TNF $\alpha$*  induziert. Dennoch war die Expression der M2-assoziierten Gene in den IL-4 (M2I), Dex (M2D) oder kombiniert polarisierten (M2ID) Makrophagen in der Gruppe ohne IL-17 und IFN $\gamma$  höher im Vergleich zu den M0-Makrophagen aus dieser Gruppe. Die Stimulation mit IL-17, IFN $\gamma$  für 24 h induzierte die Expression von *TNF $\alpha$*  in M0- und M2D-Makrophagen. Die Inkubation mit IL-17, IFN $\gamma$  und der Beibehaltung des Polarisationsstimulus' erhielt den Phänotyp der Makrophagen aufrecht, wie er auch schon in Punkt 4.1.2. beschrieben ist. *TNF $\alpha$*  wurde verringert in den Dex-behandelten Makrophagen (M2D) exprimiert und die Expression von *CD163* induziert. Man erkennt auch den additiven Effekt einer Kombinationsbehandlung bzgl. der M2-assoziierten Gene.

Die M2-assoziierte Genexpression war in den sekundär mit IL-17 und IFN $\gamma$  stimulierten M2-Makrophagen noch präsent, wohingegen die M1-assoziierten Gene wie *TNF $\alpha$*  anstiegen. Zusammengefasst deuten diese Daten daraufhin, dass die in M2-Richtung polarisierten Makrophagen ihren Phänotyp unter den physiologischen Bedingungen *in vitro* weithin beibehalten können.

#### **4.2. Einfluss einer präventiven Behandlung mit verschiedenen polarisierten BMDMs auf den Krankheitsverlauf im murinen Modell der aGvHD**

Die *in vitro* erhobenen Daten legen nahe, dass die *ex vivo* generierten und modifizierten BMDMs mit starkem M2-Phänotyp möglicherweise erhebliches Potential in der Therapie der aGvHD aufweisen könnten. Wegen des auftretenden additiven Effektes einer Kombinationsbehandlung aus IL-4 und Dex sowie der verstärkten Phagozytose und dem inhibierenden Einfluss auf die T-Zellproliferation, wurde das therapeutische Potential von mit IL-4 und Dex-behandelten Makrophagen (M2ID) im *in vivo* Modell der aGvHD untersucht. Hierzu wurden MHC Haplotyp-inkompatible T-Zellen und Knochenmark aus C57BL/6-Mäusen (H2<sup>b</sup>) in letal bestrahlte BALB/c-Mäuse (H2<sup>d</sup>) transplantiert, wodurch eine aGvHD ausgelöst wurde. Gleichzeitig mit der Krankheitsinduktion erfolgte die Injektion einer unterschiedlichen Anzahl an zuvor *in vitro* differenzierten und 24 h mit IL-4 und Dex-behandelten Makrophagen aus C57BL/6-Mäusen. Ziel des ersten Experimentes war die

Etablierung in Form der Bestimmung der optimalen Zellzahl an Makrophagen für die Therapie. Die Ergebnisse sind in Abb. 13 dargestellt.



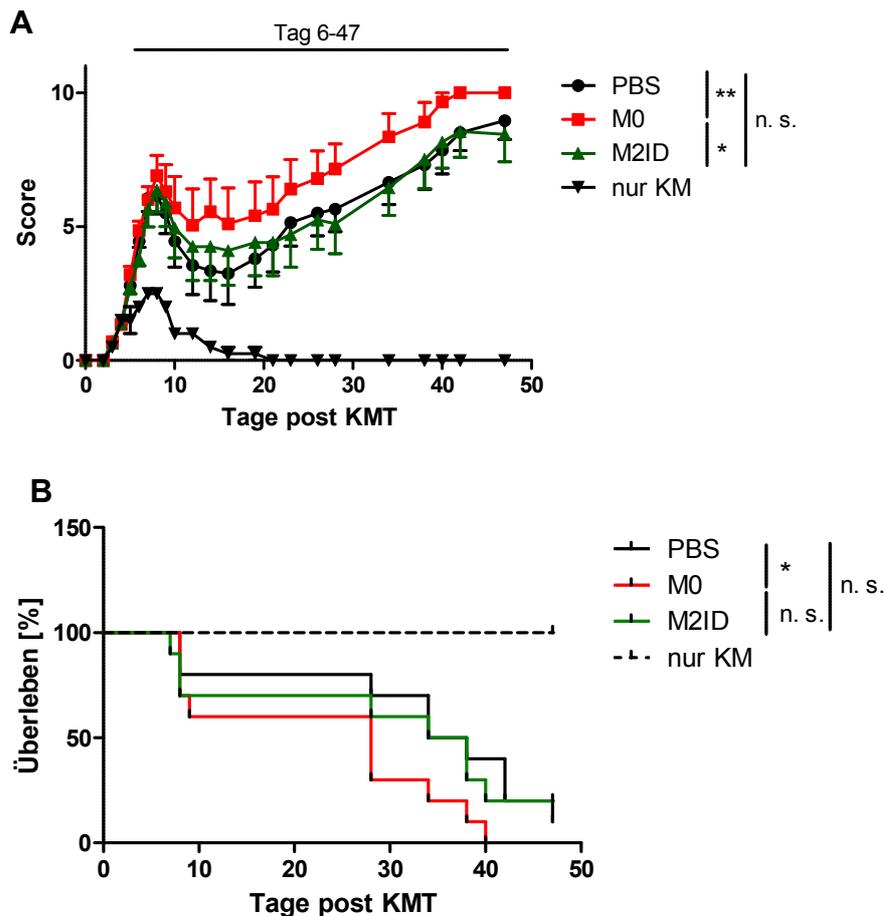
### Abb. 13: Titration von M2-Makrophagen zur aGvHD-Therapie

BMDMs, generiert aus C57BL/6 Mäusen wurden mit IL-4 sowie Dex für 24 h in M2-Richtung polarisiert. Induktion der aGvHD (Transfer von T-Zell-depletiertem Knochenmark und T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen) in letal bestrahlte BALB/c-Mäuse. Die Knochenmarkskontrolle (nur KM) erhielt nur T-Zell-depletiertes Knochenmark. Zeitgleich erfolgte die Injektion unterschiedlicher Mengen an IL-4/Dex-behandelten BMDMs (M2ID) oder Vehikel (PBS, Kontrolle) i.v. in BALB/c-Mäuse. **(A)** Morbidität (Mittelwert  $\pm$  SEM), **(B)** Mortalität ( $n = 3$ ). Die statistische Analyse erfolgte mittels one-way Anova mit anschließendem Bonferroni-Test (Morbidität) sowie dem Logrank-Test (Mortalität).

Wie in Abbildung 13 zu erkennen ist, nahm mit zunehmender Dosis der injizierten M2ID-Makrophagen die Schwere der aGvHD, besonders in der 2. Phase der Erkrankung (ab Tag 21), signifikant ab im Vergleich zu den mit PBS behandelten Mäusen (A). Dieser Trend fand sich auch im Überleben wieder. So fand sich auch

hier eine Dosisabhängigkeit (Abb. 13 B). Da jedoch nur 3 Tiere pro Gruppe untersucht wurden, ergaben sich keine statistisch signifikanten Unterschiede. Dennoch ließen sich tendenzielle Veränderungen beobachten. 50 Tagen nach Knochenmarkstransplantation (KMT) überlebten tendenziell mehr der mit  $5 \cdot 10^6$  M2ID-Makrophagen behandelten Tiere (2 von 3), als bei einer verringerten Dosis (1 von 3). Bei den PBS-behandelten Mäusen überlebte keines der Tiere den Versuchszeitraum von 50 Tagen. Die Mäuse, die nur Knochenmark erhielten überlebten zu 100%. Aufgrund des tendenziell längeren Überlebens sowie des signifikant besseren Scores wurde für den Langzeitversuch die Zellzahl von  $5 \cdot 10^6$  ausgewählt.

Im nächsten Schritt wurde der Einfluss der mit IL-4 und Dex polarisierten Makrophagen (M2ID) noch einmal genauer untersucht. Dafür wurden letal bestrahlten BALB/c-Mäusen, neben T-Zell-depletiertem Knochenmark und den aufgereinigten T-Zellen gleichzeitig entweder  $5 \cdot 10^6$  M2ID-Makrophagen, dieselbe Anzahl unpolarisierter M0-Makrophagen oder PBS als Kontrolle injiziert. Gleichzeitig diente eine Gruppe, die nur Knochenmark erhielt als Kontrolle. Hierbei (Abb. 14) zeigten sich in der ersten Phase der Erkrankung (Tag 3-10 nach KMT) keine Unterschiede in der Schwere der aGvHD zwischen den Gruppen.



**Abb. 14: Einfluss von M2 BMDM-Applikation auf die Morbidität und die Mortalität von Mäusen nach aGvHD-Induktion**

BMDMs, generiert aus C57BL/6 Mäusen wurden mit IL-4 sowie Dex für 24 h in M2-Richtung polarisiert (M2ID) oder nur mit Medium behandelt (unpolarisiert, M0). Die Induktion der aGvHD erfolgte durch Transfer von T-Zell-depletiertem Knochenmark und T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen in letal bestrahlte BALB/c-Mäuse. Die Knochenmarkskontrolle (nur KM)(n = 2) erhielt nur T-Zell-depletiertes Knochenmark. Gleichzeitig erfolgte die Injektion von IL-4/Dex-behandelten (M2ID,  $5 \cdot 10^6$ , n = 10), unbehandelten BMDMs (M0,  $5 \cdot 10^6$ , n = 10) oder eines Vehikels (PBS, Kontrolle, n = 10) i.v. in BALB/c-Mäuse. Pool aus 2 Experimenten. **(A)** Morbidität (Mittelwert +SEM), **(B)** Mortalität. Die statistische Analyse erfolgte mit den Daten von Tag 6-47 mittels one-way Anova mit anschließendem Bonferroni-Test (Morbidität) sowie dem Logrank-Test (Mortalität).

Ab Tag 10 nach KMT zeigte sich bei den Tieren, die mit unpolarisierten M0-Makrophagen behandelt wurden, ein signifikant schwererer Verlauf der aGvHD im Vergleich zur den mit PBS behandelten Kontrollmäusen oder den Tieren, die polarisierte M2ID-Makrophagen erhalten hatten. Die mit M0-Makrophagen behandelten Mäuse waren im Vergleich zur PBS-Kontrollgruppe auch durch ein geringeres Überleben charakterisiert. 40 Tage nach KMT waren alle Tiere, die mit unpolarisierten Makrophagen behandelt wurden verstorben, während in den anderen beiden Gruppen noch 20% überlebten. Im Vergleich von PBS-behandelten Tieren

und Mäusen, die mit IL-4 und Dex polarisierte Makrophagen (M2ID) erhalten hatten, war weder im Score noch im Überleben ein Unterschied feststellbar. Diese Daten deuten somit drauf hin, dass die Applikation von Makrophagen, die mit IL-4 und Dex polarisiert wurden, keinen positiven Effekt auf den Ausgang und Verlauf der aGvHD hat. Darüber hinaus hat die Injektion von unpolarisierten Makrophagen sogar einen negativen Einfluss auf den Krankheitsverlauf.

### **4.3. Glukokortikoide und ihre Rolle in der aGvHD**

Neben der Erforschung des adoptiven Transfers von M2-Makrophagen als alternative Therapie in der aGvHD, sollte es im zweiten Teil der Arbeit um die Bedeutung und das bessere Verständnis der bestehenden Glukokortikoid-Therapie sowie den Einfluss endogener Glukokortikoide gehen. Es ist derzeit noch nicht vollständig verstanden, welche modulierenden Eigenschaften der GKs auf die an der aGvHD beteiligten Zellen wichtig sind und welche Mechanismen dabei eine Rolle spielen. Zur Aufklärung dieser Fragestellung kamen zellspezifische Knock-outs des GR sowie GR-Dimerisierungsmutanten zum Einsatz.

#### **4.3.1. Wirkung von Glukokortikoiden auf die Zellen des Empfängers in der aGvHD**

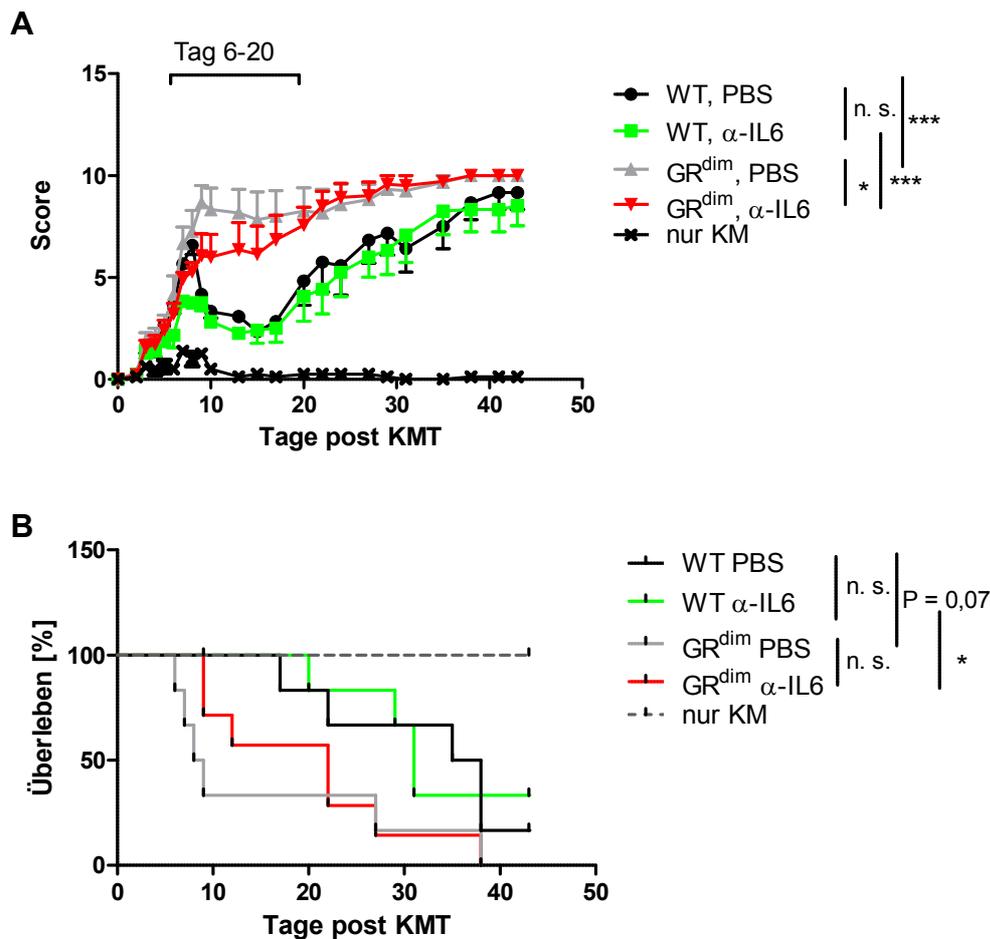
Glukokortikoide können über verschiedene molekulare Mechanismen wirken. Zum einen binden sie an den GR, der daraufhin als Dimer im Kern die Transkription von Zielgenen verstärkt, was man als Transaktivierung bezeichnet. Alternativ kann der GR als Monomer mit anderen Transkriptionsfaktoren interagieren und so die Genexpression vermindern. Dieser Vorgang wird Transrepression genannt (Vandevyver et al., 2012a; Vandevyver et al., 2013). Um zu untersuchen, welche Rolle diese beiden Mechanismen in der aGvHD spielen, können GR<sup>dim</sup>-Mäuse verwendet werden, deren GR nicht in der Lage ist zu dimerisieren.

Frühere Ergebnisse aus der Arbeitsgruppe zeigten, dass die Transplantation von wildtypischen T-Zellen in letal bestrahlte GR<sup>dim</sup>-Mäuse zu einem schwereren Verlauf der aGvHD sowie zu einer erhöhten Mortalität führte. Dies war begleitet von einem signifikanten Anstieg der IL-6- und MCP-1-Serumspiegel während des Höhepunktes der ersten Phase der Erkrankung an Tag 6. Auffällig war das gleichzeitige Absenken

der Körpertemperatur sowie des Blutglukosespiegels bei  $GR^{dim}$ -Empfängermäusen. Diese Daten deuteten darauf hin, dass ein Fehlen der Transaktivierung durch den GR in Zellen der Empfängermäuse zu einer Verstärkung der aGvHD in Verbindung mit einer vermehrten Zytokinproduktion und einem veränderten Metabolismus führt (*Theiss-Suennemann, 2012*). Hier sollte nun die Frage geklärt werden, ob sich durch Neutralisation von IL-6 mittels eines monoklonalen Antikörpers die aGvHD, die Körpertemperatur und die Blutglukose in der ersten Phase der Erkrankung beeinflussen lassen.

#### **4.3.1.1. Bedeutung der Neutralisation von IL-6**

Letal bestrahlte  $GR^{wt}$  oder  $GR^{dim}$ -Mäuse wurden mit T-Zell-depletiertem Knochenmark aus C57BL/6 Mäusen sowie aufgereinigten T-Zellen transplantiert. Zusätzlich wurde durch die Injektion eines monoklonalen anti-IL-6 Antikörpers an Tag 2 und 6 IL-6 neutralisiert. Analog erfolgte an den gleichen Tagen die Gabe von PBS als Kontrolle. An Hand der Abb. 15 A ist zu beobachten, dass die aGvHD bei den  $GR^{dim}$ -Mäusen sowohl mit als auch ohne anti-IL-6-Gabe signifikant schwerer verlief als bei den WT-Mäusen mit und ohne Therapie, was die bisherigen Ergebnisse bestätigte. Betrachtet man den Score von Tag 6 bis 20 nach KMT so fand sich auch ein signifikanter Unterschied zwischen den  $GR^{dim}$ -Mäusen mit und ohne anti-IL-6 Therapie, in der Hinsicht, dass die Schwere der Erkrankung bei den Tieren mit IL-6-Neutralisation signifikant abnahm. Nach Tag 20 nach KMT nahm die aGvHD-Symptomatik zu und die aGvHD nahm einen vergleichbaren Verlauf wie bei den PBS-behandelten  $GR^{dim}$ -Mäusen. Bei den WT-Mäusen ohne und mit anti-IL-6-Therapie zeigte sich im Score kein Unterschied.



**Abb. 15: Effekte von der IL-6-Neutralisierung auf die Morbidität und die Mortalität von WT- bzw.  $GR^{dim}$ -Mäusen nach aGvHD-Induktion**

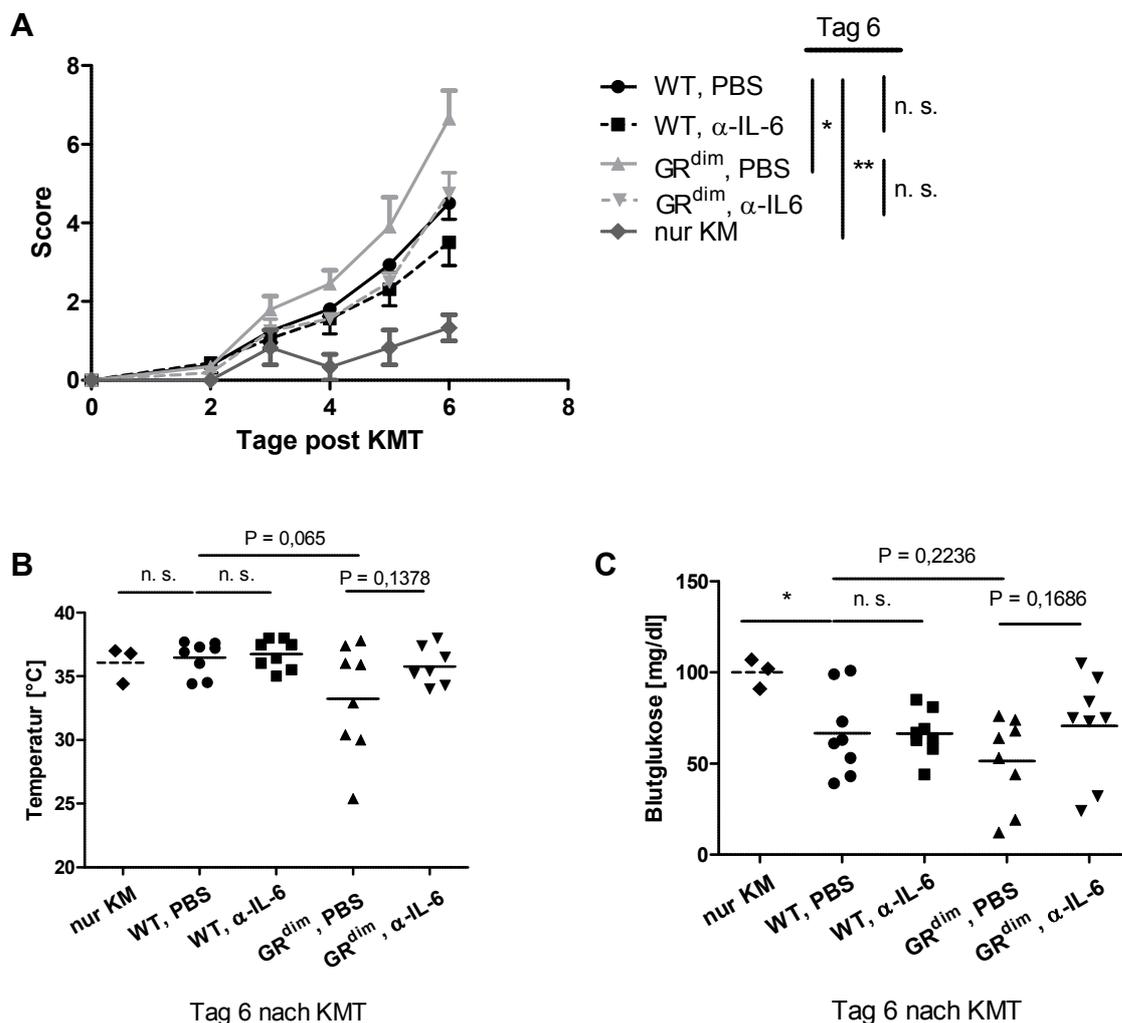
Der Transfer von Knochenmark und WT-T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen erfolgte in letal bestrahlte BALB/c WT oder  $GR^{dim}$ -Mäuse. Anti-IL-6-Antikörper (100  $\mu\text{g/ml}$ ) oder PBS als Kontrolle wurden an Tag 2 und 6 i.v. injiziert. WT PBS (n = 6), WT anti-IL-6 (n = 6),  $GR^{dim}$  PBS (n = 6),  $GR^{dim}$  anti-IL-6 (n = 7). Die Knochenmarkskontrolle (nur KM) (n = 4) erhielt nur T-Zell-depletiertes Knochenmark. **(A)** Morbidität, Mittelwert  $\pm$  SEM, **(B)** Mortalität. Die statistische Analyse erfolgte mit den Daten von Tag 6-20 mittels one-way Anova mit anschließendem Bonferroni-Test (Morbidität) sowie dem Logrank-Test (Mortalität).

Auch an Hand der Überlebenskurve (Abb. 15 B) ließen sich Unterschiede feststellen. So war das Überleben von WT-Mäusen mit und ohne anti-IL-6-Therapie gegenüber den jeweiligen  $GR^{dim}$ -Mäusen erhöht. Die  $GR^{dim}$ -Mäuse mit IL-6-Neutralisierung überlebten tendenziell länger als jene mit PBS behandelten Tiere. Allerdings bezieht sich diese Beobachtung auf die Zeit der ersten Phase der aGvHD (Tag 6-22). Im Anschluss daran näherte sich die Mortalität dem Verlauf der mit PBS behandelten  $GR^{dim}$ -Mäuse an.

Zur genaueren Untersuchung des Effektes einer IL-6-Neutralisierung wurden Kurzzeitversuche mit WT- und  $GR^{dim}$ -Mäusen durchgeführt. Dabei wurde der anti-IL-6-Antikörper an Tag 2 injiziert. An Tag 6, dem ersten Höhepunkt der

Erkrankung, wurden zusätzlich zum Score auch noch die Körpertemperatur und der Blutglukosespiegel der Tiere ermittelt.

Auch in den Kurzzeitversuchen (Abb. 16) bestätigte sich eine verstärkte aGvHD-Symptomatik bei den GR<sup>dim</sup>-Mäusen im Vergleich zu den WT-Mäusen. An Tag 6 zeigte sich ein signifikant höherer Score bei den GR<sup>dim</sup>-Mäusen mit PBS im Vergleich zu den WT-Mäusen (s. Abb. 16 A). Die anti-IL-6-Gabe führte zu einem geringeren Score bei den GR<sup>dim</sup>-Mäusen. Bei ihnen näherte sich der Score dem der WT-PBS-Mäuse an und war an Tag 6 nach KMT etwa vergleichbar.



**Abb. 16: Effekte einer IL-6-Neutralisierung auf die Morbidität und die Mortalität von WT- bzw. GR<sup>dim</sup>-Mäusen nach aGvHD-Induktion**

Der Transfer von Knochenmark und WT-T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen erfolgte in letal bestrahlte BALB/c WT- oder GR<sup>dim</sup>-Mäuse. Anti-IL-6-Antikörper (100  $\mu$ g/ml) oder PBS als Kontrolle wurden an Tag 2 i.v. injiziert. WT PBS (n = 6), WT anti-IL-6 (n = 8), GR<sup>dim</sup> PBS (n = 10), GR<sup>dim</sup> anti-IL-6 (n = 9). Die Knochenmarkskontrolle (nur KM) (n = 3) erhielt nur Knochenmark. **(A)** Morbidität, **(B)** Körpertemperatur und **(C)** Blutglukosespiegel am Tag 6 nach der Transplantation; (Mittelwert  $\pm$  SEM). Die statistische Analyse erfolgte mit den Daten von Tag 6 mittels unpaired t-Tests.

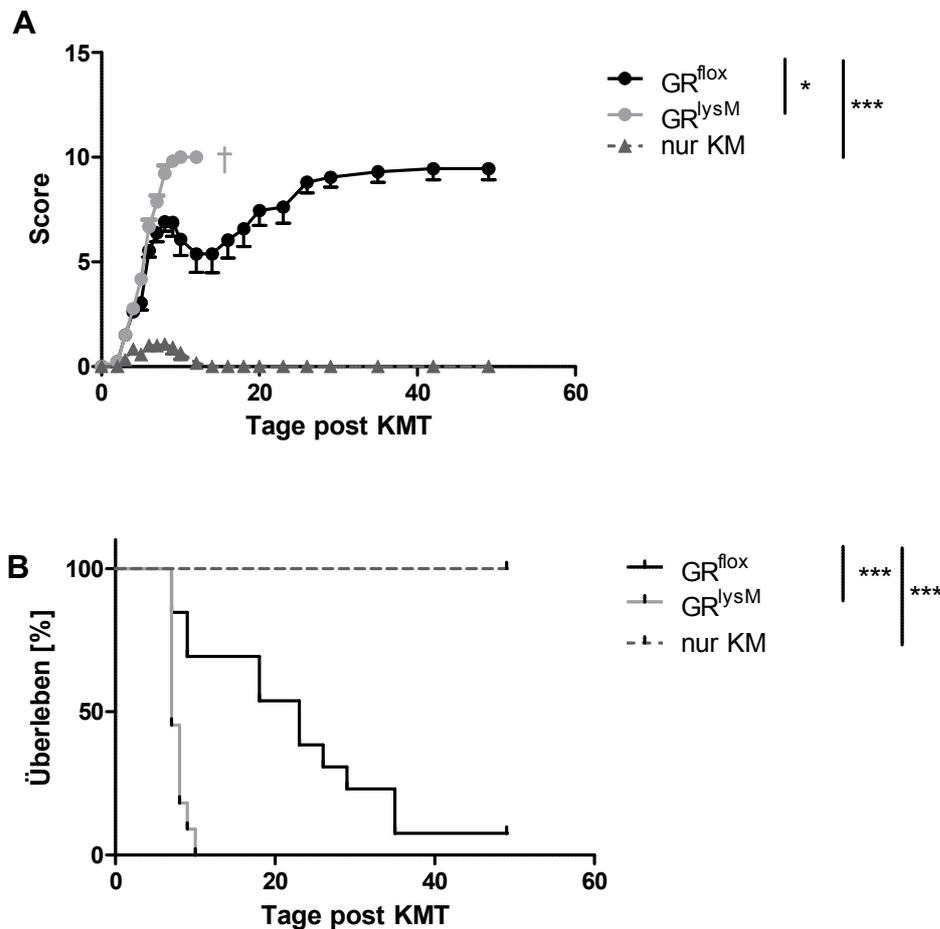
Weiterhin fiel auf, dass an Tag 6 nach KMT sowohl die Körpertemperatur (Abb. 16 B) als auch der Blutglukosespiegel (Abb. 16 C) bei den GR<sup>dim</sup>-Tieren mit PBS-Behandlung geringer waren als bei den WT-Mäusen mit PBS-Behandlung. Die Behandlung mit dem anti-IL-6-Antikörper führte bei den GR<sup>dim</sup>-Mäusen zu einem Anstieg der Körpertemperatur und des Blutglukosespiegels im Vergleich zu den GR<sup>dim</sup>-Tieren mit PBS-Behandlung. Ein Unterschied in der Körpertemperatur und dem Blutglukosespiegel zwischen PBS- und anti-IL-6 Gabe war bei den WT-Tieren nicht zu beobachten. Zusammengefasst lässt sich also schließen, dass die Neutralisierung von IL-6 während der ersten Phase der Erkrankung sowohl in den WT- als auch in den GR<sup>dim</sup>-Mäusen einen positiven Einfluss hat, wobei der Einfluss bei den GR<sup>dim</sup>-Mäusen stärker ist. Dies deutet darauf hin, dass die Sezernierung von IL-6 als Folge des Verlustes der GR-Transaktivierung in den Zellen des Empfängers in GR<sup>dim</sup>-Mäusen einen essentiellen Faktor bei der aGvHD in diesen Tieren darstellt, wobei das IL-6 auch auf den Metabolismus Auswirkungen hat.

#### 4.3.1.2. Bedeutung der myeloischen Zellen

Der schwere Verlauf der aGvHD bei den GR<sup>dim</sup>-Empfängermäusen und die Möglichkeit, diesem durch Neutralisierung von IL-6 entgegenzuwirken, ließ auf eine wichtige Rolle von Zytokinen myeloiden Ursprungs in der Modulation der aGvHD durch GKs schließen. Allerdings sind viele Zellen in der Lage, beispielsweise IL-6 zu sezernieren. Hierzu zählen Makrophagen, T-Zellen, Hepatozyten und Enterozyten (Hamzic et al., 2013). Daher stellte sich die Frage, inwiefern der Phänotyp der GR<sup>dim</sup>-Mäuse auf einem Effekt auf die myeloiden Zellen beruht, also insbesondere der professionellen APZs wie DZs, Monozyten und Makrophagen. Zur Beantwortung dieser Frage wurden daher GR<sup>lysM</sup>-Mäuse verwendet, denen der GR spezifisch in den myeloiden Zellen fehlt (Clausen et al., 1999); als Kontrollen wurden GR<sup>flox</sup>-Mäuse verwendet.

Die Transplantation von WT-T-Zellen in GR<sup>lysM</sup>-Mäuse ging mit einer aGvHD-Symptomatik einher, die gegenüber der der GR<sup>flox</sup>-Empfänger signifikant stärker war (s. Abb. 17 A). Das Überleben der GR<sup>lysM</sup>-Tiere war im Vergleich zu den GR<sup>flox</sup>-Mäusen signifikant verringert, was an Hand der Überlebensraten zu erkennen ist (Abb. 17 B). Die GR<sup>lysM</sup>-Mäuse verstarben innerhalb der ersten 14 Tage nach KMT zu 100%, während bei den GR<sup>flox</sup>-Mäusen am Ende des Versuchszeitraumes

(Tag 50 nach KMT) noch ca. 10% am Leben waren. Es bleibt daher festzustellen, dass das Fehlen des GR in den myeloiden Zellen der Empfängertiere, ähnlich wie in den  $GR^{dim}$ -Empfängermäusen, mit einer fulminanten aGvHD und einer verstärkten Mortalität verbunden war.

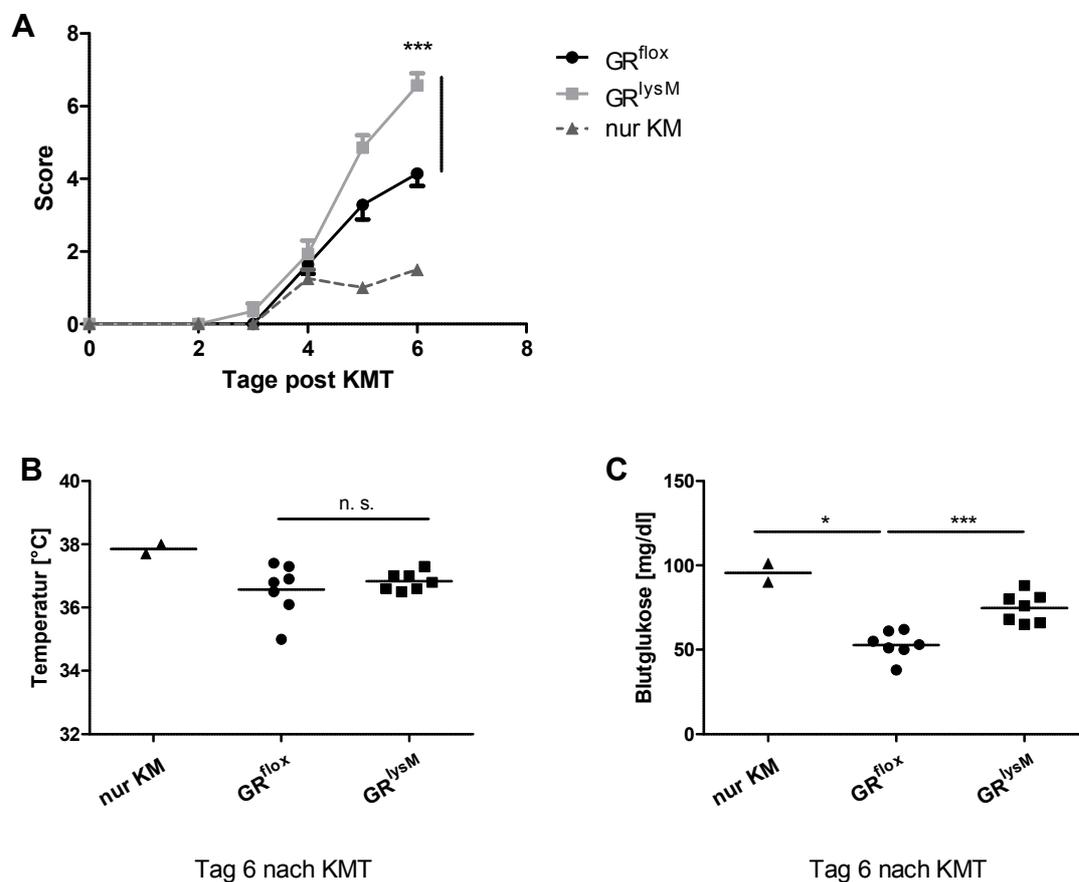


**Abb. 17: Einfluss der GR-Defizienz in myeloiden Zellen auf die Morbidität und Mortalität von Mäusen nach aGvHD-Induktion**

Der Transfer von T-Zell-depletiertem Knochenmark und T-Zellen aus WT-C57BL/6-Mäusen erfolgte in letal bestrahlte BALB/c  $GR^{flox}$  (WT, n = 13) oder  $GR^{lysM}$ -Mäuse, n = 11). Die Knochenmarkskontrolle (nur KM) (n = 6) erhielt nur T-Zell-depletiertes Knochenmark. **(A)** Morbidität (Mittelwert  $\pm$  SEM), **(B)** Mortalität. Die statistische Analyse erfolgte mittels one-way Anova mit anschließendem Bonferroni-Test (für die statistischen Analysen der Morbidität erhalten tote Tiere den Score von 10) sowie dem Logrank-Test (Mortalität).

Zur näheren Analyse, was zu dieser auffallend starken Ausprägung der aGvHD führte, und ob sie wie bei den  $GR^{dim}$ -Mäusen von Auswirkungen auf den Metabolismus begleitet war, wurden Kurzzeitexperimente durchgeführt. Nach erfolgter aGvHD-Induktion in  $GR^{lysM}$ - und  $GR^{flox}$ -Mäusen wurden diese an Tag 6

getötet. Außerdem wurden zuvor die Körpertemperatur und der Blutglukosespiegel bestimmt. Hierbei bestätigte sich wie schon im Langzeitversuch beobachtet eine ausgeprägtere aGvHD-Symptomatik bei den  $GR^{lysM}$ -Mäusen im Vergleich zu den  $GR^{flox}$ -Tieren (Abb. 18 A). Besonders an Tag 6, dem Höhepunkt der ersten Phase der aGvHD, war der Unterschied im Score zwischen diesen beiden Gruppen signifikant. Gleichzeitig stellte man fest, dass die Körpertemperatur in den beiden Gruppen vergleichbar war (Abb. 18 B). Auffällig war jedoch, dass der Blutglukosespiegel bei den  $GR^{lysM}$ -Mäusen gegenüber den  $GR^{flox}$ -Mäusen am Tag 6 nach KMT signifikant erhöht war (Abb. 18 C).



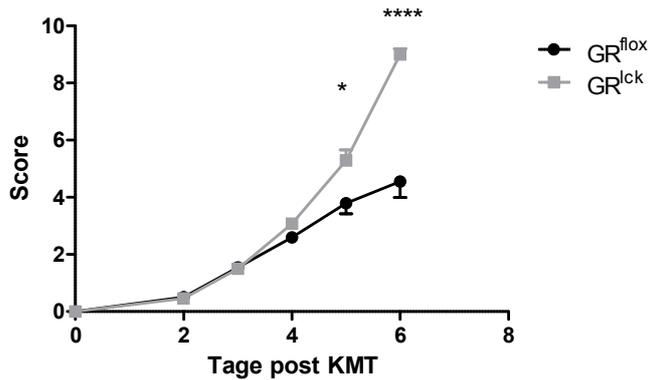
**Abb. 18: Einfluss von GR-Defizienz in myeloiden Zellen nach aGvHD-Induktion auf Morbidität, Körpertemperatur und Blutglukosespiegel**

Der Transfer von T-Zell-depletiertem Knochenmark und WT-T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen erfolgte in letal bestrahlte BALB/c  $GR^{flox}$  (WT, n = 7) oder  $GR^{lysM}$ -Mäuse (n = 7). Die Knochenmarkskontrolle (nur KM) (n = 2) erhielt nur Knochenmark. **(A)** Morbidität, **(B)** Körpertemperatur und **(C)** Blutglukosespiegel am Tag 6 nach der Transplantation; (Mittelwert ± SEM). Die statistische Analyse der Daten an Tag 6 erfolgte mittels ungepaarten T-Tests.

Die Ergebnisse bestätigten den fulminanten Verlauf der aGvHD, der aber anders als bei GR<sup>dim</sup>-Empfängertieren nicht mit vergleichbaren Auswirkungen auf den Metabolismus verbunden war. Zur näheren Klärung dieses Unterschieds bedarf es jedoch noch weitere Versuche und Analysen.

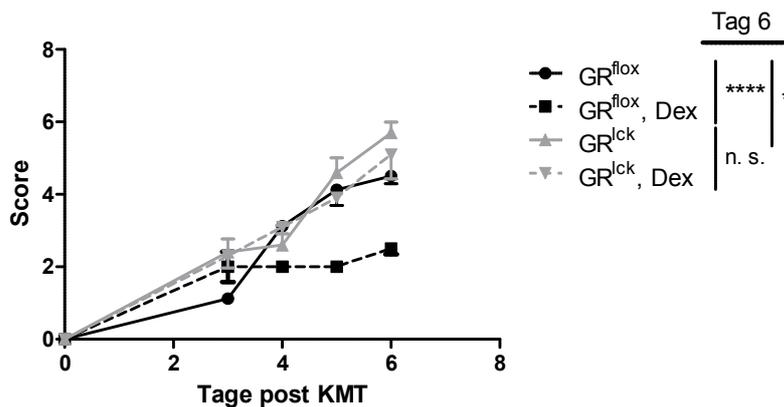
#### **4.3.2. Wirkung von Glukokortikoiden auf transplantierte T-Zellen in der aGvHD**

Glukokortikoide beeinflussen nicht nur APZs sondern auch T-Zellen (Coutinho and Chapman, 2011). T-Zellen spielen bei der aGvHD eine wesentliche Rolle. Sie tragen durch Zytokinproduktion beispielsweise von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, aber auch durch zytotoxische CD8<sup>+</sup>-T-Zellen über eine aktive Gewebeschädigung zum Entstehen der aGvHD bei (Reddy and Ferrara, 2003; Truitt and Atasoylu, 1991). Sowohl endogene als auch therapeutische GKs modulieren T-Zellen in vielfältiger Weise (Ashwell et al., 2000; Herold et al., 2006; Schleimer et al., 1984). Allerdings ist noch nicht vollständig geklärt, welche der modulierenden Mechanismen auf T-Zellen bei der Regulation der aGvHD von Bedeutung sind. Zur Untersuchung von Wirkmechanismen in T-Zellen und ihrer Rolle in der Modulation der aGvHD wurden daher T-Zell-spezifische GR-Knockout-Mäuse verwendet (GR<sup>lck</sup>) (Gu et al., 1994). Frühere Daten aus unserer Arbeitsgruppe belegen, dass beim Fehlen des GR in den transplantierten T-Zellen eine fulminante aGvHD sowie eine erhöhte Mortalität auftritt. Diese erhöhte Mortalität ließ sich auch durch kurzzeitige therapeutische Gabe von Dex jedoch nicht verringern (Theiss-Suennemann et al., 2015). Kurzeitexperimente bestätigten diese Befunde (s. Abb. 19 sowie 20).



**Abb. 19: Einfluss von GR-Defizienz in T-Zellen nach aGvHD-Induktion auf die Morbidität**

Letal bestrahlte WT-BALB/c-Mäuse wurden mit T-Zell-depletiertem WT-Knochenmark und entweder WT-T-Zellen (GR<sup>fllox</sup>, n = 10) oder GR<sup>lck</sup>-T-Zellen (T-Zellen mit GR-Defizienz, n = 12) aus C57BL/6-Mäusen transplantiert. Morbidität in der ersten Phase der aGvHD (Mittelwert ± SEM). Die statistische Analyse der Daten erfolgte mittels ungepaarten T-Tests.



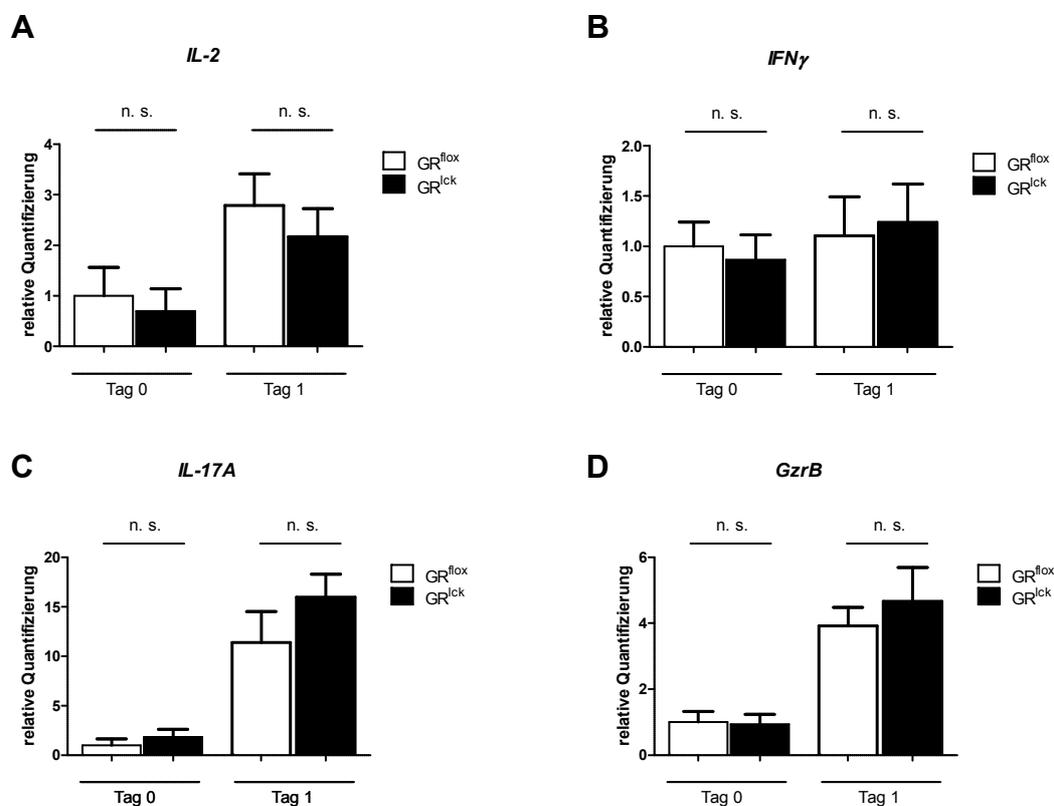
**Abb. 20: Einfluss von GR-Defizienz in T-Zellen nach aGvHD-Induktion auf die Morbidität**

Letal bestrahlte WT-BALB/c-Mäuse wurden mit WT-Knochenmark und entweder WT-T-Zellen (GR<sup>fllox</sup>, n = 5) oder GR<sup>lck</sup>-T-Zellen (T-Zellen mit GR-Defizienz, n = 5) aus C57BL/6-Mäusen transplantiert. Zusätzlich erfolgte eine Behandlung mit Dex oder PBS, als Kontrolle, an Tag 3 bis 6. Morbidität in der ersten Phase der aGvHD (Mittelwert ± SEM). Die statistische Analyse erfolgte an Tag 6 mittels unpaired t-Tests.

Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe (Theiss-Sünnemann) hatten zuvor gezeigt, dass die ausgeprägte aGvHD sowie die erhöhte Mortalität bei den Mäusen, die mit GR-defizienten T-Zellen transplantiert wurden, einherging mit der Erhöhung der Expression der für die Zytotoxizität verantwortlichen Gene Granzym B (*GrzB*) und Perforin (*Perf*) sowie der Induktion der Expression der bei der aGvHD eine wichtige Rolle spielenden Zytokine IL-2, IFN $\gamma$  und IL-17 (Antin and Ferrara, 1992; Ju et al., 2014). Die Zytokinexpression ließ sich durch therapeutische Dex-Gabe reprimieren,

nicht jedoch die schwere aGvHD-Symptomatik verbunden mit der erhöhten Mortalität und der verstärkten Expression von *GrzB* und *Perf* (Theiss-Suennemann et al., 2015).

Um auszuschließen, dass die GR-Defizienz in T-Zellen zu einer veränderten Expression von Zytokinen und zytotoxischen Moleküle führt und damit nicht *per se* schon eine vermehrte Zytokinproduktion aufwies, wurden T-Zellen aus  $GR^{fllox}$ - und  $GR^{lck}$ -Mäusen isoliert und *in vitro* für 24 h mit ConA stimuliert. Im Anschluss wurde die Expression von *IL-2*, *IFN $\gamma$* , *IL-17A* und *GrzB* in diesen T-Zellen mittels qRT-PCR untersucht. Wie in Abb. 21 ersichtlich, fand sich hinsichtlich der Expression der zu untersuchenden Gene keinen Unterschied zwischen den beiden Genotypen.



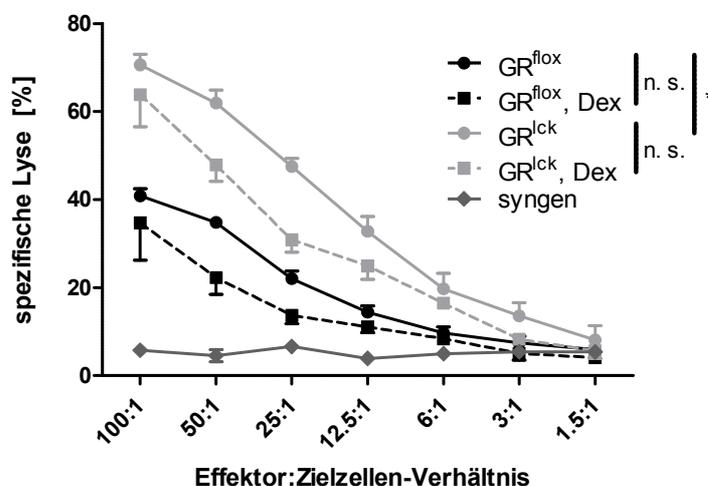
**Abb. 21: Expression von Zytokinen und zytotoxischen Molekülen durch *in vitro* stimulierte T-Zellen von WT- und  $GR^{lck}$ -Mäusen**

Isolierte T-Zellen aus Lymphknoten und Milz von  $GR^{fllox}$  sowie  $GR^{lck}$ -Mäusen wurden für 24 h *in vitro* mit ConA stimuliert. Die RNA wurde vor (Tag 0) und 24 h (Tag 1) nach erfolgter Stimulation isoliert und in cDNA transkribiert. Durch qRT-PCR, unter Nutzung von HPRT als *Housekeeping*-Gen für die Normalisierung, wurde die Expression von (A) *IL-2*, (B) *IFN $\gamma$* , (C) *IL-17A* und (D) *GrzB* ermittelt (n = 6-11). Alle Werte wurden auf  $GR^{fllox}$  Tag 0 normalisiert. Die statistische Analyse erfolgte mittels unpaired t-Tests.

Diese Ergebnisse belegen, dass die vermehrte Zytokinproduktion eine Folge der aGvHD darstellte und nicht schon vorher intrinsisch vorlag.

### Einfluss des GR auf die Aktivität von ZTLs *in vivo*

Die zuvor erhobenen Daten hatten einen Anstieg der Genexpression der zytotoxischen Moleküle Granzym und Perforin in GR-defizienten T-Zellen während der Erkrankung *in vivo* gezeigt. Um zu untersuchen, welchen Einfluss die GR-Defizienz bzw. die Behandlung mit Dex auf die Zytotoxizität in der aGvHD hat, wurden alloreaktive ZTLs *in vivo* generiert. Dazu wurden BALB/c Mäuse entweder mit GR<sup>flox</sup> Kontroll-T-Zellen oder mit GR-defizienten T-Zellen (GR<sup>lck</sup>) transplantiert. An Tag 6 nach aGvHD-Induktion wurden die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus den Mäusen isoliert. Diese wurden dann für einen <sup>51</sup>Chrom (<sup>51</sup>Cr)-Test eingesetzt. Hierfür wurden entweder Ag8.653-Zellen (H2<sup>d</sup>, Tumorzelllinie aus BALB/c-Mäusen als allogenes Ziel) oder RMA-Zellen (H2<sup>b</sup>, Tumorzelllinie aus C57BL/6-Mäusen als syngene Kontrolle) verwendet. Konkret wurden die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Effektorzellen) in bestimmten Verhältnissen zu den mit <sup>51</sup>Chrom beladenen Zielzellen (RMA oder Ag8.653) hinzugefügt und damit die Gegebenheiten in der aGvHD *in vitro* simuliert. Die Abb. 22 zeigt die Auswertung des Chrom-Testes.



**Abb. 22: Einfluss von GR-Defizienz von *in vivo* generierten alloreaktiven CD8<sup>+</sup>-T-Lymphozyten (ZTL) auf deren Zytotoxizität**

Letal bestrahlte WT-BALB/c-Mäuse wurden mit T-Zell-depletierterm WT-Knochenmark und entweder Kontroll-T-Zellen (GR<sup>flox</sup>, mit vorhandenem und funktionellem GR) oder GR<sup>lck</sup>-T-Zellen (T-Zellen mit GR-Defizienz) aus C57BL/6-Mäusen transplantiert. Zusätzlich erfolgte eine Behandlung mit Dex oder PBS, als Kontrolle, an Tag 3 bis 6. An Tag 6 wurden CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus der Milz isoliert und ein <sup>51</sup>Cr-Test durchgeführt. Dazu wurden die isolierten CD8<sup>+</sup>-T-Zellen (Effektorzellen) in bestimmten Verhältnissen zu Ag8.653-Zellen (H2<sup>d</sup>, BALB/c) als allogene Zielzellen bzw. RMA-Zellen (H2<sup>b</sup>, C57BL/6) als syngene Kontrolle gegeben. Spezifische Lyse (Mittelwert ± SEM) von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen mit und ohne GR-Defizienz bzw. Dex-Einfluss, n = 6 (Pool aus 2 unabhängigen Experimenten). Die statistische Analyse erfolgte mittels one-way Anova mit anschließendem Bonferroni-Test (Theiss-Suennemann et al., 2015).

Es ist zu sehen, dass sich die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen aus Mäusen mit transplantierten GR-defizienten T-Zellen durch eine höhere zytotoxische Aktivität auszeichneten im Vergleich zu Mäusen, die mit T-Zellen transplantiert wurden, die einen intakten GR aufwiesen. Die Behandlung mit Dex verringerte die Zytotoxizität in beiden Genotypen. Sie ist aber im Vergleich zur PBS-Behandlung nicht signifikant. Diese Daten zeigen somit, dass die starke Ausprägung der aGvHD und die hohe Mortalität der Mäuse, die GR-defiziente T-Zellen erhielten, vermutlich durch die erhöhte zytotoxische Aktivität der CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bedingt war.

#### *Infiltration von T-Zellen in die Zielorgane*

Neben der Zytotoxizität hängt die Schwere der aGvHD auch von der Anzahl der eingewanderten T-Zellen in die Zielorgane, wie dem Darm, ab. Es wurde gezeigt, dass es sowohl bei Mäusen die mit GR<sup>flox</sup>- als auch mit GR<sup>lck</sup>-T-Zellen transplantiert wurden, zu einer äquivalenten Infiltration von CD3<sup>+</sup>-Zellen in den Darm kam. Die genaue Zusammensetzung der T-Zellen, die in den Darm einwandern war jedoch unklar. Die histologischen Analysen von Dünndarmschnitten (Jejunum) auf CD4<sup>+</sup>-sowie CD8<sup>+</sup>-T-Zellen zeigten bezüglich der Infiltration von CD4<sup>+</sup>-T-Zellen keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Jedoch fanden sich signifikant mehr CD8<sup>+</sup>-T-Zellen in den Mäusen, die mit GR<sup>lck</sup>-T-Zellen transplantiert wurden im Vergleich zu denen, die GR<sup>flox</sup>-T-Zellen erhielten (Daten nicht gezeigt; Theiss-Suennemann et al., 2015).

Zusammengefasst lässt sich sagen, dass die Modulation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bzw. ihrer Funktion ein bedeutsames Ziel für die Regulation der aGvHD darstellt und die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen essentiell verantwortlich sind für die in diesem Modell außergewöhnlich starke aGvHD.

## 5. Diskussion

### 5.1. Einfluss verschiedener Behandlungen auf den Phänotyp von murinen Makrophagen

Makrophagen sind ein elementarer Bestandteil des Immunsystems, sowohl der angeborenen als auch der adaptiven Immunantwort. Sie übernehmen vielfältige Aufgaben von der Pathogenabwehr bis hin zur Wundheilung (Gordon et al., 2014; Murray and Wynn, 2011b). Die Anforderungen dieser spezialisierten Aufgaben erfordern die Polarisierung in einen entsprechenden Phänotyp. Es ist ein großes Spektrum verschiedener Polarisierungen bekannt, die sich in unterschiedliche Gruppen einteilen lassen (Sica and Mantovani, 2012). Zum einen gibt es die durch LPS und/oder IFN $\gamma$  klassisch aktivierten (pro-inflammatorischen) Makrophagen, die sich durch die vermehrte Produktion von co-stimulatorischen Molekülen und MHC-II sowie die Sezernierung von pro-inflammatorischen Zytokinen und NO auszeichnen (Martinez and Gordon, 2014; Sica and Mantovani, 2012). Zum anderen existieren die anti-inflammatorischen M2-Makrophagen. Diese wiederum lassen sich in mehrere Untergruppen gliedern. Die mit IL-4 stimulierten Makrophagen werden auch als alternativ aktiviert bezeichnet, wohingegen Glukokortikoid-Stimulation zu deaktivierten bzw. suppressiven Makrophagen führt (Gordon, 2003). Die Literatur erwähnt neben den genannten Stimuli weitere Möglichkeiten M1- und M2-Makrophagen zu generieren (Murray et al., 2014). In dieser Arbeit sollte die Wirkung verschiedener Stimuli auf die Polarisierung von murinen Knochenmarksmakrophagen (BMDMs) untersucht werden um diese letztendlich als potentielle zelluläre Therapie der aGvHD anzuwenden. Dafür wurden aus Knochenmark von C57BL/6-Mäusen BMDMs differenziert und für 24 h mit verschiedenen Stimuli behandelt. Zum Einsatz kamen hierbei LPS, ein Stimulus für die M1-Polarisation, IL-4, welches die alternative Aktivierung induziert (M2I), sowie Dexamethason (Dex), ein synthetisches Glukokortikoid, welches zu suppressiven Makrophagen führt (M2D) (Gordon, 2003). Zusätzlich wurden die Kombination aus IL-4 und Dex eingesetzt (M2ID) sowie unpolarisierte Makrophagen (M0) untersucht.

Die Experimente bestätigen, dass die Behandlung mit verschiedenen Stimuli zu verschiedenen Polarisierungen führt, die sich sowohl auf Gen-Ebene als auch auf Protein-Ebene und auf funktioneller Ebene unterscheiden. Die mit LPS behandelten

Makrophagen zeichneten sich durch einen M1-Phänotyp aus, der durch eine gesteigerte Expression der pro-inflammatorischen Gene wie *TNF $\alpha$*  und *iNOS* sowie der vermehrten Produktion des co-stimulatorischen Moleküls CD86 oder des Adhäsionsmoleküls CD54 gekennzeichnet war, was durch die Literatur bestätigt wird (Martinez and Gordon, 2014; Sica and Mantovani, 2012). Funktionell charakterisierten sie sich in Übereinstimmung mit der Literatur sowohl durch eine verstärkte NO-Produktion (Rath et al., 2014) und eine verstärkte Adhärenz als auch durch eine verminderte Phagozytose von *E. coli*-Bakterien und einen suppressiven Einfluss auf proliferierende T-Zellen, die mit ConA stimuliert wurden. M1-Makrophagen haben ihre Funktion in der Pathogenabwehr (Murray and Wynn, 2011b). Daher sezernieren sie pro-inflammatorische Zytokine und weitere Mediatoren, wie Chemokine, die weitere Immunzellen, z. B. Monozyten und T-Zellen, anlocken (Mantovani et al., 2004). Die Produktion von NO dient dabei dem Abtöten der Pathogene (Fang, 2012) sowie der Gewebeerstörung (Abramson et al., 2001). Außerdem ist belegt, dass sezerniertes NO *in vitro* die Suppression der T-Zellproliferation vermittelt (Bingisser et al., 1998; Sato et al., 2007).

Es ist uns erfolgreich gelungen durch IL-4-Behandlung M2-Makrophagen zu generieren. IL-4 ist ein in der Literatur vielfach beschriebener Stimulus, der zur M2-Polarisierung führt (Gordon, 2003). Die durch IL-4 stimulierten Makrophagen werden auch Wundheilungsmakrophagen genannt. Alternative Aktivierung von Makrophagen führt zur Induktion von Arg1, CD206, CD71 und Ym1 sowie MHC-II (Gordon, 2003; Lawrence and Natoli, 2011b). Diesem Muster folgten auch die von uns generierten Makrophagen. Ebenso konnten wir zeigen, dass IL-4-behandelte Makrophagen *in vitro* einen supprimierenden Einfluss auf proliferierende T-Zellen haben, die durch ConA stimuliert wurden. Das steht in Übereinstimmung mit Beobachtungen von Huber et. al., die berichteten, dass dieser Vorgang durch die STAT6-abhängige Expression von PDL2 bedingt war (Huber et al., 2010). Außerdem konnten wir nachweisen, dass sich IL-4-behandelte Makrophagen im Vergleich zu unbehandelten Makrophagen durch eine verstärkte Adhärenz auszeichnen.

Die Dex-Behandlung von Makrophagen induzierte die Expression des *Scavenger*-Rezeptors CD163 sowie des M-CSF-Rezeptors (CD115). CD115 ist keiner Polarisation zugeordnet, aber es ist beschrieben, dass dieser Marker häufig auf aus Knochenmark gewonnenen Makrophagen zu finden ist (Wang et al., 2013a). Die Expression von CD115 markiert ähnlich wie die von Gr1 einen weniger

differenzierten Status von Makrophagen und Monozyten. Daher wären die BMDMs als weniger reif anzusehen als Makrophagen anderer Herkunft, wie z. B. der Milz oder des Peritoneums (Wang et al., 2013a). Dagegen war die Expression von *TNF $\alpha$*  sowie *iNOS* vermindert und CD86, CD54 sowie MHC-II waren reduziert, was auch die Literatur zeigt (Li et al., 2001; van de Garde et al., 2014). Unsere Daten belegen auch morphologische Veränderungen, die sich bei den Dex-behandelten Makrophagen in einem starken Abrunden der Zellen und reduzierter Adhärenz äußerten. Zudem bestätigen unsere Daten Ergebnisse von Giles et al. sowie McColl et al., die durch Glukokortikoid-Behandlung der Makrophagen einen Anstieg der Phagozytosekapazität von apoptotischen Zellen beobachteten (Giles et al., 2001; McColl et al., 2009; McColl et al., 2007). Auch wir konnten eine signifikante Erhöhung der Phagozytose von *E. coli*-Bakterien gegenüber den unbehandelten Makrophagen feststellen. Ein Grund könnte die vermehrte Expression von *CD163* sein, da belegt ist, dass *CD163* in der Erkennung und Phagozytose bakterieller Pathogene eine Rolle spielt (Fabriek et al., 2009; Schaer et al., 2002). Zusätzlich ließ sich zeigen, dass Dex in der Lage ist über die Repression von *iNOS* die NO-Synthese zu regulieren (Di Rosa et al., 1990). Dabei ließ sich erkennen, dass bei gleichzeitiger Gabe von Dex und LPS die Mengen an NO vermindert waren im Vergleich zur alleinigen LPS-Behandlung. Im Gegensatz zu IL-4-behandelten Makrophagen waren Dex-behandelte Makrophagen nicht in der Lage inhibierend auf ConA-stimulierte proliferierende T-Zellen einzuwirken. Unsere Daten bestätigen die Meinung in der Literatur, dass die Behandlung mit Dex zu einem eigenen M2-Phänotyp führt, der sich sowohl von den klassisch aktivierten LPS-stimulierten als auch den alternativ aktivierten mit IL-4-behandelten Makrophagen unterscheidet (Heasman et al., 2004).

Die Kombination aus IL-4 und Dex war interessanterweise mit einem synergistischen Effekt hinsichtlich der Expression von M2-Markern wie *CD206*, *CD163*, *Arg1* und *Ym1* verbunden. Ebenso additiv erhöht war auch *CD115*. Bezüglich der Morphologie zeigte sich ein ähnlicher Phänotyp wie bei der Einzelbehandlung mit Dex mit einem identischen Verlust der Adhärenz. Auch bezüglich der Expression von *CD86*, *CD54*, *iNOS* sowie *TNF $\alpha$*  war eine Dominanz von Dex zu beobachten. Funktionell war es möglich zu zeigen, dass die Doppelbehandlung ebenfalls zu einer signifikanten Erhöhung der Phagozytose von *E. coli*-Bakterien führte, worauf die vermehrte Expression von *CD163* sowie *CD206* schon Hinweise lieferte. Die phagozytotische Aktivität konnte jedoch durch die

IL-4-Behandlung nicht weiter erhöht werden. Die sekundäre pro-inflammatorische Stimulation von kombiniert behandelten Makrophagen mit LPS führte zu einer Verringerung an NO, wenn Dex dabei im Medium verblieb. Dies kann damit erklärt werden, dass Dex in der Lage ist die Reduktion der Expression von iNOS herbeizuführen und damit zu einer beobachtbaren Repression an NO führt (Di Rosa et al., 1990). Interessanterweise zeigten auch die kombiniert-behandelten Makrophagen eine suppressive Wirkung auf die Proliferation von ConA-stimulierten T-Zellen, jedoch nicht in dem Umfang wie die IL-4-behandelten Makrophagen. Man konnte feststellen, dass sich bezüglich der Expression bestimmter Marker wie *CD163*, *CD54* oder *CD86* ein von Dex dominierter Effekt zeigte. Insgesamt bleibt festzustellen, dass sich der additive Effekt, der sich in der Expression der M2-Markergene und auf Protein-Ebene zeigte, nicht auf die Funktion (z. B. Phagozytose, T-Zellsuppression) auswirkt.

Unbehandelte Makrophagen exprimieren sowohl M1- als auch M2-Marker geringer als die in distinkte Polarisierungen differenzierten Makrophagen, was eine fehlende Polarisation beweist.

Unterschiede der Signalwege bedingen die Verschiedenartigkeit der Genexpression sowie der Funktion der Makrophagen. So wirkt Dex über den GR. Nach Bindung an den GR transloziert dieser in den Kern und beeinflusst dort die Transkription von Zielgenen auf positive oder negative Weise. Die Expression pro-inflammatorischer Zytokine wie TNF $\alpha$  und IL-6 wird ebenso gehemmt wie die Expression von iNOS (Newton, 2000).

IL-4 dagegen wirkt über den IL-4-Rezeptor. Dieser wird phosphoryliert woraufhin Januskinasen (JAK1-3) aktiviert werden. Dies führt zur Aktivierung von STAT3 sowie STAT6, die Dimere bilden und in den Zellkern translozieren. Dort nehmen sie Einfluss auf die Genexpression, beispielsweise auf die Expression des Mannose-Rezeptors *CD206*, von *Ym1*, *Arg1* oder dem Transferrin-Rezeptor *CD71* (Lawrence and Natoli, 2011b).

Die Behandlung mit bakteriellem LPS induziert über TLR4 eine Signalkaskade, welche mit der Aktivierung von NF $\kappa$ B endet. Dies führt zur Expression pro-inflammatorischer Zytokine und zur Synthese von NO. M1-Makrophagen sind vornehmlich für die Pathogenabwehr zuständig (Mizel et al., 2003).

Auffällig war die veränderte Morphologie der behandelten Makrophagen. Während

die Behandlung mit LPS mit stark abgeflachten Zellen einherging, waren sie nach IL-4-Behandlung stark elongiert, wohingegen sie durch Dex und die Kombinationsbehandlung aus Dex und IL-4 kugelförmig abgerundet waren. Die veränderte Morphologie ging auch mit verschiedenen Polarisierungen einher und hatte Auswirkungen auf ihre Funktion. Den Zusammenhang von Zellform und Polarisation untersuchten McWhorter et. al.. Sie zeigten, dass die durch IL-4 ausgelöste Elongation zu einer erhöhten Arg1-, CD206-, sowie Ym1-Expression führte, während sie bei M1-Makrophagen (LPS, IFN $\gamma$ ) reduziert war, dafür jedoch iNOS induziert war. Außerdem zeigten sie, dass sich der durch IL-4 induzierte Phänotyp ebenfalls erzeugen ließ, in dem das Wachstum der Makrophagen in eine bestimmte Form (Elongation) forciert wurde, ohne, dass eine Stimulation mit IL-4 notwendig war (McWhorter et al., 2013). Die Rolle des Zytoskeletts bei LPS stimulierten Makrophagen untersuchten auch Eswarappa et. al.. Sie stellten fest, dass das Aktin-Zytoskelett an der post-translationalen Regulation von iNOS beteiligt sein könnte (Eswarappa et al., 2008). Auch Leporatti et al. beschrieben zytomechanische Veränderungen von LPS-stimulierten Makrophagen. Diese charakterisieren sich durch die verstärkte Adhärenz der Makrophagen (Leporatti et al., 2006). Ursache für die morphologischen Veränderungen sind Änderungen im Zytoskelett. Alle in der vorliegenden Arbeit genutzten Stimuli zur Polarisation der Makrophagen waren in der Lage Veränderungen des Zytoskeletts hervorzurufen. Diese Veränderungen hatten auch funktionelle Auswirkungen, etwa auf Adhärenz und Phagozytose. So induzierte Dex-Behandlung in den Makrophagen eine Reorganisation des Zytoskeletts mit der Folge einer verminderten Adhärenz, wohingegen sie bei IL-4 oder LPS-Behandlung erhöht war (Krause et al., 1996). Es zeigte sich auch hinsichtlich der Adhärenz ein von Dex dominierter Effekt, da diese im Gegensatz zur IL-4 Einzelbehandlung in der Doppelbehandlung reduziert war. Diese Daten bestätigen Ergebnisse von Heasman et al. (Heasman et al., 2004)

Bezüglich der Phagozytose bestätigen unsere Ergebnisse die derzeitige Datenlage, dass sich Dex-behandelte Makrophagen durch eine erhöhte Phagozytoseleistung auszeichnen (Giles et al., 2001; McColl et al., 2007). Die Einzelbehandlung mit IL-4 dagegen war nicht in der Lage die Phagozytose zu erhöhen. Interessanterweise war es nicht möglich durch eine gleichzeitige Behandlung mit IL-4 und Dex die Phagozytose gegenüber der Dex-Einzelbehandlung zu erhöhen. Daran zeigt sich, dass das IL-4 antagonistisch zu der Dex-Behandlung wirkt. Diese Vermutung wird

auch durch Experimente von Gratchev et al. sowie Schaer et al. unterstützt (Gratchev et al., 2005; Schaer et al., 2002). Dieser Antagonismus lässt sich auch bei der Produktion extrazellulärer Matrix (EZM) beobachten. IL-4 induziert dabei die Expression von EZM-Proteinen, wohingegen Dex diese reduziert (Gratchev et al., 2005). Diese Beobachtungen bekräftigen den funktionellen Unterschied der Makrophagen. Während IL-4-behandelte Makrophagen mit der Wundheilung in Verbindung stehen, wofür die Synthese und Expression von EZM-Proteinen notwendig sind, werden Glukokortikoid-behandelte Makrophagen mit einem suppressiven oder „tolerogenen“ Status assoziiert (Heasman et al., 2004).

Zur Klärung der Ursache bzw. des Mechanismus‘ für den synergistischen Effekt von IL-4 und Dex sind weitere Untersuchungen nötig. Belegt ist jedoch, dass sowohl GKs als auch IL-4 in der Lage sind die NFκB-Aktivität zu inhibieren. Wichtig dabei ist die Expression von GILZ (*Glucocorticoid induced leucin zipper*), welches sowohl durch Dex als auch durch IL-4 induziert werden kann (Ayroldi and Riccardi, 2009; Berrebi et al., 2002). GILZ ist ein NFκB-abhängiger Transkriptionsaktivierungs-Inhibitor (Di Marco et al., 2007). Die NFκB-Signalkaskade kann sowohl durch den GR als auch durch STAT6 über unterschiedliche Wege gehemmt werden (Nelson et al., 2003). Biola et al. zeigten in ihren Ergebnissen, dass in T-Zellen der GR mit STAT6 interagieren konnte (Biola et al., 2000). Es ist beschrieben, dass die Interaktion des GR-Monomers mit STAT3 als Co-Aktivator einen synergistischen Effekt hat (de Miguel et al., 2003; Zhang et al., 1997).

## **5.2. Effekt von adoptivem Zelltransfer von M2-polarisierten Makrophagen auf die Schwere und den Ausgang der aGvHD**

Die bisherige Therapie der aGvHD bestehend aus dem Langzeiteinsatz hochdosierter Glukokortikoide bringt viele Nebenwirkungen mit sich (Schäcke et al., 2002). Außerdem birgt das Auftreten von Glukokortikoid-resistenten Verlaufsformen ein nicht unerhebliches Risiko für den Ausgang der aGvHD (Westin et al., 2011). *Ex vivo* generierte und polarisierte Makrophagen sind in der Literatur als eine alternative Therapie in vielen Krankheiten der Maus beschrieben, da sie modulierend auf das inflammatorische Geschehen einwirken. Die Verbesserung des Krankheitsbildes wird sowohl durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen sowie die Suppression von Entzündungsmediatoren wie pro-inflammatorischen Zytokinen und Chemokinen also

auch durch die Induktion der Gewebereparatur erreicht (Ma et al., 2015; Parsa et al., 2012; Wang et al., 2007). Ebenso ist gezeigt, dass der adoptive Transfer von myeloiden Suppressorzellen den Ausgang der aGvHD positiv beeinflusst (Highfill et al., 2010).

Auf Grund des zu beobachtenden synergistischen Effektes, der auf eine verstärkte M2-Polarisation hindeutet, sowie der funktionellen Charakteristika einer vermehrten Phagozytose wie auch Suppression auf proliferierende T-Zellen wurden die kombiniert mit IL-4 und Dex behandelten Makrophagen für den adoptiven Transfer verwendet. Untersucht wurde dabei ein Effekt auf die aGvHD in einem totalen MHC-*mismatch*-Modell, bei dem T-Zell-depletiertes Knochenmark und aufgereinigte T-Zellen aus C57BL/6-Mäusen in lethal bestrahlte BALB/c-Empfängermäuse transplantiert wurden. Die Auswertung der Daten des klinischen Scores sowie des Gewichtes und des Überlebens zeigten, dass ein positiver Effekt durch den Einsatz von kombiniert-behandelten Makrophagen nicht erzielt werden konnte. Allerdings fiel auf, dass die mit unpolarisierten Makrophagen (M0) behandelten Mäuse eine schwerere aGvHD-Symptomatik und eine erhöhte Mortalität aufwiesen als die unbehandelten oder die mit M2-Makrophagen behandelten Tiere. Makrophagen besitzen die Fähigkeit in Abhängigkeit von Stimuli in ihrer Umgebung in verschiedene Richtungen zu polarisieren (Davis et al., 2013). M0-Makrophagen stellen einen naiven oder auch undifferenzierten Status dar (Tyteca et al., 2015). Sie können durch geeignete Stimulation in die spezifischen Makrophagen-Subtypen M1 oder M2 entwickelt werden. Zytokine können dabei die Polarisation von Makrophagen beeinflussen (Davis et al., 2013). Ebenso ist es möglich, dass Makrophagen, anders als T-Zellen, einen phänotypischen Wechsel vollziehen können. Beschrieben ist das z. B. für Makrophagen, die bei Krebserkrankungen oder bei Adipositas eine Rolle spielen (Mosser and Edwards, 2008). Das starke pro-inflammatorische Milieu während der aGvHD, geprägt von IL-12, IL-1 $\beta$ , IL-6 sowie IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$ , die von alloreaktiven T-Zellen und anderen Effektorzellen produziert werden, könnte einen großen Einfluss auf den Phänotyp der Makrophagen haben (Ju et al., 2005). Es ist anzunehmen, dass die M0-Makrophagen innerhalb der ersten Tage an den Ort der Entzündung, wie den Darm, wandern und dort in M1-Richtung polarisiert werden. Besonders im Darm, wo es zum Übertritt von Mikroorganismen und damit zum Kontakt mit bakteriellem LPS kommt, ist eine klassische Aktivierung wahrscheinlich (Holler et al., 2010). Außerdem ist bekannt, dass es nach erfolgter HSZT sowie durch

die vorherige Bestrahlung zu einer Gewebeschädigung kommt, die mit der Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie INF $\gamma$ , IL-12 und TNF $\alpha$  einhergeht (Ramadan and Paczesny, 2015). Dieses während der Konditionierungsphase geschaffene Th1-Zytokinmilieu könnte zu einer M1-Polarisierung der M0-Makrophagen beitragen. Diese Polarisierung geht mit der vermehrten Expression co-stimulatorischer Moleküle sowie von MHC-II und Adhäsionsmolekülen einher. Die M1-polarisierten Makrophagen sezernieren dann ihrerseits pro-inflammatorische Zytokine und Chemokine, die weitere Immunzellen anlocken, sowie NO, welches zur Gewebeschädigung beiträgt (Murray and Wynn, 2011b; Sica and Mantovani, 2012). Die aus C57BL/6-Mäusen generierten Makrophagen präsentieren auf ihrem MHC Peptide des Empfängers (BALB/c). Die vermehrte Ausbildung co-stimulatorischer Moleküle führt zur verstärkten Aktivierung und Stimulation von alloreaktiven T-Zellen. So könnten die injizierten M0-Makrophagen verstärkend auf die Entstehung und den Verlauf der aGvHD einwirken.

Im Gegensatz dazu verstärkten die kombiniert behandelten Makrophagen die aGvHD zwar nicht, jedoch trugen sie auch nicht zur Verbesserung bei, was bedeutet, dass auch sie ihre Polarisation verändert haben. Es ist jedoch zu vermuten, dass diese eine geringere Affinität zur Repolarisierung haben. Ursächlich für die Repolarisierung der kombiniert behandelten Makrophagen könnten zwei Faktoren sein. Zum einen könnte die starke Expression von CD115 eine Rolle spielen. Es ist beschrieben, dass CD115<sup>+</sup> Makrophagen eher einem unreifen und undifferenzierten Makrophagenstatus entsprechen (Wang et al., 2013a). Cao et al. zeigten am Beispiel einer Nierenerkrankung, dass aus KM generierte und in M2-Richtung polarisierte Makrophagen, im Gegensatz zu denen aus der Milz oder dem Peritoneum, keinen positiven Einfluss auf den Krankheitsverlauf hatten. Begründet wurde diese Beobachtung mit dem Verlust des M2-Phänotyps hin zu einem M1-Phänotyp. Als Ursache wurde die Expression und Wirkung von M-CSF genannt. Sie zeigten ebenfalls, dass BMDMs mehr CD115 exprimierten und die Makrophagen durch sezerniertes M-CSF zur Proliferation angeregt wurden, was mit dem Verlust der M2-Polarisation einherging (Cao et al., 2014). Unsere Ergebnisse bestätigen eine erhöhte CD115-Expression, die sowohl durch die Einzelbehandlung mit Dex als auch durch die Kombinationsbehandlung aus IL-4 und Dex gesteigert werden konnte. Weiterhin ist bekannt, dass sowohl nach HSZT beim Menschen als auch bei der

aGvHD in der Maus vermehrt M-CSF produziert wird (Praloran et al., 1990; Sakata et al., 2001). Eine zweite Ursache für die Repolarisation bzw. den Verlust der M2-Polarisation könnte die pro-inflammatorische Umgebung sein, der die *ex vivo* generierten und polarisierten Makrophagen ausgesetzt sind. Tarique et al. sowie Stout et al. demonstrierten, dass M2-Makrophagen in Stimulus-freier Umgebung sowie in einem pro-inflammatorischen Milieu nach einer gewissen Zeit ihre Polarisation verloren haben oder in M1-Richtung polarisiert wurden (Stout et al., 2005; Tarique et al., 2015). Unsere Daten bestätigen die Flexibilität des Phänotyps der kombiniert behandelten Makrophagen. Wurden diese mit LPS stimuliert, ohne dass der Polarisationsstimulus verblieb, nahmen die Expression der M2-Marker ab und die der M1-Marker zu. Ebenso konnten wir einen Anstieg der NO-Konzentration messen. Auch die sekundäre Stimulation der polarisierten Makrophagen mit IL-17 und IFN $\gamma$  zeigte eine Abnahme der M2-Marker und die Zunahme der M1-Marker-Expression. IFN $\gamma$  sorgt zum Beispiel für eine verringerte Phagozytoseleistung von Dex-behandelten Makrophagen (Heasman et al., 2004). Die Literatur belegt, dass Makrophagen sich durch eine hohe Plastizität auszeichnen und in der Lage sind zwischen den verschiedenen Phänotypen zu wechseln. Diese Dynamik ist von entscheidender Bedeutung zur Erhaltung des Gleichgewichts (Wang et al., 2014). Eine Störung des Gleichgewichtes ist mit verschiedenen Krankheiten assoziiert wie Krebserkrankungen oder Fettleibigkeit (Mosser and Edwards, 2008).

Insgesamt bestätigen die Daten, dass es möglich war *ex vivo* polarisierte Makrophagen mit distinkten Phänotypen zu generieren, was mit der Induktion spezifischer Marker und Funktionen einherging. Diese sind repräsentativ für ihre biologische Funktion. IL-4 führt zu Wundheilungsmakrophagen und Dex zu suppressiven Makrophagen. Für die Ausübung ihrer spezifischen Funktion ist die Expression bestimmter Rezeptoren, Enzyme oder Zytokine erforderlich. Dabei verifizieren unsere Ergebnisse, dass es innerhalb der Gruppe der M2-Makrophagen verschiedene Subpopulationen gibt. Es wurde *in vitro* gezeigt, dass die Kombination der zwei Stimuli IL-4 und Dex zu einem synergistischen Effekt mit einem starken M2-Phänotyp, nicht jedoch zu funktioneller Synergie führte, wobei Dex dominierend auftrat.

*In vivo* waren die kombiniert behandelten Makrophagen nicht in der Lage ein systemisch vorliegendes inflammatorisches Geschehen wie die aGvHD positiv zu beeinflussen. Auf der anderen Seite zeigte sich der negative Einfluss von

M0-Makrophagen auf den Ausgang der aGvHD. Dies beweist wie sehr der Phänotyp von Makrophagen von der Umgebung abhängt und wie essentiell er für den Ausgang einer Erkrankung ist. Inwieweit es möglich ist BMDMs mit einem stabilen Phänotyp zu erzeugen, z. B. durch genetische Manipulation, wäre in weiteren Experimenten zu untersuchen.

### **5.3. Wirkung von IL-6-Neutralisierung auf den Verlauf der aGvHD in GR<sup>dim</sup>-Empfängermäusen**

Die Modulation der Immunantwort durch körpereigene (endogene) Glukokortikoide ist ein wichtiger Bestandteil zur Regulation der Entzündung. Dabei wirken die Glukokortikoide über den GR. Dieser ist nach Bindung der Glukokortikoide in der Lage entweder als Dimer oder als Monomer in den Kern zu wandern und dort die Transkription der Zielgene positiv oder negativ zu beeinflussen. Bindet der GR als Dimer, so spricht man von Transaktivierung, liegt er als Monomer vor, ist von Transrepression die Rede (Reichardt and Schütz, 1998). Auch in der aGvHD-Therapie finden Glukokortikoide als *First-line*-Therapie Anwendung (Garnett et al., 2013). Sie wirken sowohl auf T-Zellen (Ashwell et al., 2000; Coutinho and Chapman, 2011; Schleimer et al., 1984) als auch auf APZs (Moser et al., 1995; Mosser and Edwards, 2008), die ihrerseits maßgeblich an der aGvHD beteiligt sind. Daten unserer Arbeitsgruppe zeigten, dass die Wirkung endogener Glukokortikoide essentiell für den Verlauf der aGvHD war (Theiss-Suennemann, 2012; Theiss-Suennemann et al., 2015). Bei GR<sup>dim</sup>-Empfängermäusen, in denen die aGvHD mit WT-T-Zellen induziert wurde, nahm die aGvHD einen schwereren Verlauf als bei den WT-Empfängern. Nähere Untersuchungen zeigten, dass dieser Zustand sowohl mit einem Anstieg an IL-6 sowie MCP-1 im Serum als auch mit einer Absenkung der Körpertemperatur und der Blutglukose in der frühen Phase der aGvHD begleitet war. Zudem fanden sich hinsichtlich der Infiltration von Immunzellen und bezüglich der Gewebeschädigung keine Unterschiede zwischen WT- und GR<sup>dim</sup>-Empfängertieren (Theiss-Suennemann, 2012). Diese Daten liefern Hinweise für die Wichtigkeit der Wirkung endogener GKs bei der Regulation der aGvHD und indizieren, dass IL-6 eine wichtige Rolle dabei spielen könnte.

Im Rahmen dieser Arbeit ließ sich durch eine Verminderung von IL-6 mittels eines neutralisierenden Antikörpers in der frühen Phase der aGvHD, insbesondere bei

GR<sup>dim</sup>-Mäusen, aber auch bei den WT-Mäusen, ein positiver Effekt auf den Krankheitsverlauf erzielen. In gleicher Weise normalisierten sich auch Körpertemperatur und Blutglukosespiegel nach anti-IL-6-Therapie annähernd auf das Niveau der WT-Tiere. Damit bestätigen unsere Daten die Hypothese, dass die vermehrte Produktion von IL-6, ausgelöst durch die gestörte GR-Signalkaskade, sowohl die aGvHD als auch den Metabolismus beeinflusst. Zytokine wie IL-6 sind bei der aGvHD von großer Bedeutung. So konnte bereits zuvor gezeigt werden, dass die Blockierung des IL-6-Signalweges mit einer Verbesserung der aGvHD einherging (Chen et al., 2009; Tawara et al., 2011). IL-6 bedingt dabei unter anderem durch einen Anstieg an Th1- und Th17-Zellen eine pro-inflammatorische Immunantwort (Chen et al., 2009) (Kimura and Kishimoto, 2010; Korn et al., 2008). Die Literatur beschreibt darüber hinaus eine erhöhte Sekretion von IL-6 bei GR<sup>dim</sup>-Mäusen mit Sepsis, was einen möglichen Einfluss von IL-6 bei einer gestörten GR-Signalkaskade unterstützt (Kleiman et al., 2012). Bei der Sepsis ist die unkontrollierte Produktion von Zytokinen für die Entstehung des Krankheitsbildes wichtig. Hierbei kommt es zu einem sogenannten Zytokinsturm, der mit einer veränderten Thermoregulation (Hyper- oder Hypothermie) verbunden ist, zu Kreislaufstörungen führt und ein Multiorganversagen zur Folge haben kann (Tisoncik et al., 2012). Eine bestehende Sepsis kann sowohl durch Fieber als auch durch Hypothermie charakterisiert sein, wobei eine hypothermische Sepsis mit einer verschlechterten Krankheitsprognose assoziiert ist (Remick and Xia, 2006). Auch bei der aGvHD kommt es zu Entzündungsreaktionen im gesamten Körper, was durch die systemische Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen bedingt ist (Antin and Ferrara, 1992).

Auffällig bei den an aGvHD erkrankten GR<sup>dim</sup>-Empfängermäusen war der starke Abfall der Temperatur sowie des Blutglukosespiegels. Beide Werte ließen sich durch Applikation des anti-IL-6-Antikörpers annähernd auf das Niveau der WT-Empfängertiere anheben. Dies deutet darauf hin, dass endogene Glukokortikoide nicht nur für die Regulation der Zytokinexpression, sondern auch für die des Energiestoffwechsels verantwortlich sind. Für die beobachtete Hypothermie und Hypoglykämie kommen drei Ursachen in Frage. Zum einen könnte es direkt die Folge der starken Produktion von Zytokinen wie beispielsweise IL-6 sein. Es ist bekannt, dass die unkontrollierte Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine während der Sepsis zu einem verstärkten katabolischen Metabolismus führt

(Silverman et al., 2013). Dieses ist beispielsweise mit einem erhöhten Verbrauch an Glukose in Leber, Milz, Ileum und Lunge assoziiert (Strassmann et al., 1993). Die Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine während der aGvHD kann eine verringerte Nahrungszufuhr (Anorexie) induzieren, die dann einen schlechten Allgemeinzustand der Mäuse bedingt und mit einer Hypothermie und Hypoglykämie einhergeht (Silverman et al., 2013). Weiterhin wurde gezeigt, dass eine erhöhte Expression von IL-6 mit metabolischen Veränderungen wie einer Hypoglykämie einhergeht. Dies würde erklären, weshalb die Behandlung mit dem anti-IL-6-Antikörper positive Effekte hat, da sie den Glukosespiegel wieder auf den Normwert bringt (Strassmann et al., 1993). Zudem geht eine vermehrte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen mit einer verstärkten Vasodilatation einher, was zu einer vermehrten Wärmeabgabe führt (Sprague and Khalil, 2009) und dadurch die Hypothermie verstärken könnte. Der Anstieg an IL-6 könnte auch auf eine erhöhte Sensitivität gegenüber TNF $\alpha$  hindeuten. So konnte gezeigt werden, dass die Injektion mit TNF $\alpha$  zu einer verstärkten Produktion von IL-6 führte. TNF $\alpha$  ist bekannt für die Initiierung von Hypothermie (Vandevyver et al., 2012b). Es wäre vorstellbar, dass die GR<sup>dim</sup>-Mäuse nicht in der Lage sind, die durch TNF $\alpha$  induzierte Hypothermie zu beeinflussen.

Eine mögliche weitere Ursache für die starke Hypothermie der GR<sup>dim</sup>-Mäuse nach der aGvHD-Induktion könnte ein verringerter Leptinspiegel und die daraus resultierende fehlende Wirkung des Leptins sein. Es ist beschrieben, dass es bei LPS-induzierter Sepsis in GR<sup>dim</sup>-Mäusen ebenfalls zu einer Hypothermie kommt, die von einer verringerten Leptinkonzentration begleitet ist (Kleiman et al., 2012). Leptin ist ein Peptidhormon, das unter anderem von Adipozyten produziert wird und für die Energiehomöostase durch Regulation des Appetits verantwortlich ist (Park and Seo, 2012; Yadav et al., 2009). Die Expression von Leptin wird über Transaktivierung des GR induziert (De Vos et al., 1998). Transaktivierung bedarf der Dimerisierung des GR (Dahlman-Wright et al., 1991). Daher wäre eine verstärkte Hypothermie mit einer Reduktion an Leptin bei den GR<sup>dim</sup>-Mäusen zu erklären. Weiterhin aktiviert Leptin die HPA-Achse (Costa et al., 1997) und ist somit wichtig für die Rekonvaleszenz von LPS-induzierter Hypothermie, da es die Produktion sowie die hypothermale Wirkung von TNF $\alpha$  inhibiert (Steiner and Romanovsky, 2007). Zudem ist Leptin in der Lage die pro-inflammatorische Signalkaskade (NF $\kappa$ B) im Gehirn zu hemmen (Steiner and Romanovsky, 2007). Die neuronale NF $\kappa$ B-Aktivität spielt eine wichtige Rolle bei der

Thermoregulation sowie für das Überleben bei der Sepsis (Juttler et al., 2007). Eine gestörte Thermoregulation ausgelöst durch eine verstärkte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wobei diese nicht mehr durch Leptin beeinflusst wird, könnte zur Entstehung der Hypothermie beitragen. Ebenso ist bekannt, dass Leptin die Thermogenese direkt fördert (Steiner and Romanovsky, 2007), so dass eine zu geringe Wärmebildung auch zu einer Hypothermie führen könnte.

Eine letzte Ursache könnte direkt im Genotyp begründet sein. Es ist beschrieben, dass sich GR<sup>dim</sup>-Mäuse durch eine beeinträchtigte Glukoneogenese auszeichnen, was auf der reduzierten Aktivierung des Sympatikus beruht (Silverman et al., 2013). So kann es durch den erhöhten Energieverbrauch sowie die verminderte Bereitstellung von Glukose zu vermehrter Gewichtsabnahme kommen. Daneben sind die GR<sup>dim</sup>-Mäuse auch durch ein reduziertes Bewegungsverhalten charakterisiert, was dazu führen könnte, dass sie schlechter Wärme durch Bewegung produzieren können. Die Kombination aus verminderter Glukoneogenese und erhöhtem Glukoseverbrauch könnte zur Hypoglykämie führen, die eine Hypothermie zur Folge hätte.

Durch den Einsatz von anti-IL-6 war es möglich, sowohl den Blutzuckerspiegel als auch die Körpertemperatur auf das Niveau der WT-Mäuse anzuheben. IL-6 spielt beim Glukose- und Lipidmetabolismus in der Leber eine Rolle und ist in der Lage im Gehirn die HPA-Achse zu aktivieren (Mauer et al., 2015). Die Literatur beschreibt, dass eine Inhibierung des GR in der Leber zu einer verminderten Glukoseausschüttung und zu einem verstärkten Glukoseverbrauch führt (Zinker et al., 2007). Bei GR<sup>dim</sup>-Mäusen ist das durch Aktivierung der HPA-Achse produzierte Corticosteron in der Lage nur über Transrepression zu wirken (Vandevyver et al., 2013). Es ist gezeigt, dass es in GR<sup>dim</sup>-Mäusen möglich ist pro-inflammatorische Zytokine durch therapeutische Dex-Gabe zu unterdrücken, nicht jedoch durch endogene Glukokortikoide (Reichardt et al., 2001). Somit könnte das vermehrt produzierte IL-6 mitverantwortlich für die Erhöhung des Energieverbrauchs sein. Die Depletion an IL-6 könnte somit zu einer Verringerung des Energieverbrauchs führen, damit diese wieder für die Thermoregulation zur Verfügung steht. Es wird berichtet, dass eine GR-Dimerisierung für die Thermoregulation, die durch Entzündungen ausgelöst wird, notwendig ist (Silverman et al., 2013). Ebenso könnte der durch die anti-IL-6-Therapie erreichte verbesserte Allgemeinzustand zu einer erhöhten Nahrungsaufnahme und damit mehr Energie führen. Es ist also zu erkennen, dass

der GR durch seine den Metabolismus regulierenden Eigenschaften mitverantwortlich für die Regulation und Rekonvaleszenz bei inflammatorischen Erkrankungen ist.

#### **5.4. Rolle des GR in myeloiden Empfängerzellen bei der Kontrolle der aGvHD**

Die aus den anti-IL-6-Experimenten gewonnenen Daten zeigten, dass der Anstieg an IL-6 für die Verschlechterung des Krankheitsverlaufs der aGvHD bei den GR<sup>dim</sup>-Empfängermäusen verantwortlich war. Somit sprechen unsere Daten dafür, dass die endogenen Glukokortikoide nicht in der Lage waren supprimierend auf die Expression von IL-6 einzuwirken. Daten von J. Theiss-Sünnemann lassen darauf schließen, dass für die vermehrte Produktion von IL-6 die Empfängerzellen zuständig sind, da ein Anstieg von IL-6 bei der Transplantation von GR<sup>dim</sup>-T-Zellen in WT-Empfängermäuse nicht zu beobachten war (Theiss-Sünnemann, 2012). IL-6 kann von vielen Zellen produziert werden, einerseits von hämatopoetischen Zellen wie Monozyten oder Makrophagen, andererseits aber auch von nicht-hämatopoetischen Zellen, wie Adipozyten, Hepatozyten oder auch Endothelzellen im Gehirn, Fibroblasten, Muskelzellen oder Neuronen (Hamzic et al., 2013). Zur Klärung, welche dieser unterschiedlichen Zelltypen für die IL-6-Produktion und somit für die verstärkte aGvHD-Symptomatik verantwortlich ist, wurde die Rolle der myeloiden Zellen untersucht. Dafür wurden Mäuse genutzt, in denen ein spezifischer GR-Knockout mittels Cre-loxP-Technologie erzeugt wurde. Diese Mäuse wiesen eine Defizienz des GR in den myeloiden Zellen auf (GR<sup>lysM</sup>) (Clausen et al., 1999). Die Ergebnisse bestätigen, dass die aGvHD bei GR<sup>lysM</sup>-Empfängermäusen eine schwerere Verlaufsform aufweist und mit einer erhöhten Mortalität einhergeht als bei den GR<sup>dim</sup>-Mäusen. Die GR-Defizienz in den myeloiden Zellen hat zur Folge, dass dort weder Transaktivierung noch Transrepression durch den GR stattfinden kann. Die Experimente von Bhattacharyya et al. bestätigen diese Daten. Sie beobachteten nach LPS-Injektion in GR<sup>lysM</sup>- und WT-Mäuse eine erhöhte Mortalität der GR<sup>lysM</sup>-Tiere, die mit einer vermehrten Zytokinproduktion, wie IL-6 und TNF $\alpha$ , einherging. Der Anstieg an endogenen Glukokortikoiden in beiden Genotypen (GR<sup>lysM</sup>, WT) hatte bewiesen, dass die fehlende Repression der Zytokinexpression den Anstieg der pro-inflammatorischen Zytokine zur Folge hatte. Ursächlich für die Erhöhung der Zytokine soll die Aktivierung der p38-MAPKinase gewesen sein.

Glukokortikoide können diese Aktivierung mittels MAPKinase phosphatase-1 (MKP-1) unterdrücken (Bhattacharyya et al., 2007). Es gibt Hinweise darauf, dass die Aktivierung der p38-MAPKinase auch bei der aGvHD eine Rolle spielen könnte (Zhang et al., 2013). Auch zeigten Lim et al., dass Peritonealmakrophagen aus Mäusen, die einer Adrenalectomie unterzogen wurden, sowohl vor als auch nach LPS- und IFN $\gamma$ -Stimulation mehr iNOS und damit mehr NO als auch TNF $\alpha$  exprimierten (Lim et al., 2007). Das lässt darauf schließen, dass das Fehlen der Regulation mittels GR in den myeloiden Zellen zu stärker aktivierten Zellen führt und diese mehr pro-inflammatorische Zytokine produzieren [persönliche Korrespondenz Holger Reichardt]. Eine Prä-Aktivierung der GR-defizienten Makrophagen würde demnach zu einem M1-ähnlichen Phänotyp führen. Diese Makrophagen sezernieren zahlreiche pro-inflammatorische Zytokine und sind in der Lage durch die Produktion von NO das Gewebe zu schädigen (Abramson et al., 2001; Martinez and Gordon, 2014; Sica and Mantovani, 2012). Außerdem ist es ihnen möglich durch Induktion der Expression co-stimulatorischer Moleküle sowie von MHCs T-Zellen stärker zu aktivieren, die dann in die Zielorgane einwandern und diese schädigen, was die starke aGvHD mitverursachen würde. Zusätzlich zu den Zytokinen ist auch die Expression von Chemokinen durch den GR reguliert (Coutinho and Chapman, 2011). Es wäre denkbar, dass GR-defiziente Makrophagen mehr Chemokine sezernieren, da deren Expression durch die endogenen Glukokortikoide nicht mehr unterdrückt wird. Dies könnte mehr inflammatorische Monozyten anlocken. Daten von Tuckermann et al. unterstützen diese Hypothese. Sie zeigten, dass BMDMs aus GR<sup>dim</sup>-Mäusen nach LPS-Stimulation neben mehr pro-inflammatorischen Zytokinen auch mehr MCP-1 sezernierten, was darauf hindeutet, dass die Chemokin-Regulation von Glukokortikoiden abhängig ist (Tuckermann et al., 2007). Dies bestätigen auch Daten von J. Theiss-Sünnenmann, die ebenfalls einen Anstieg an MCP-1 im Serum von GR<sup>dim</sup>-Mäusen nach aGvHD-Induktion feststellte (Theiss-Sünnenmann, 2012). MCP-1 ist ein Chemokin, das für die Infiltration von Monozyten sorgt (Deshmane et al., 2009).

Die Kurzzeitversuche zeigten bei den GR<sup>lysm</sup>-Empfängern, im Gegensatz zu den GR<sup>dim</sup>-Empfängern, dass die Körpertemperatur im Vergleich zu den WT-Mäusen nicht erniedrigt und der Blutglukosespiegel erhöht war. Bei den GR<sup>flox</sup>-Mäusen bedingte die aGvHD eine leichte Hypoglykämie, was auf die verminderte Nahrungszufuhr zurückzuführen ist. Damit assoziiert war eine leichte Hypothermie.

Die vorherrschenden Entzündungsreaktionen während der aGvHD gehen mit einem Anstieg an Corticosteron, (durch Stimulation der HPA-Achse) einher (You-Ten et al., 1995). Dieses ist in der Lage den Sympatikus zu aktivieren, was beispielsweise zu einer vermehrten Glukoneogenese in der Leber und damit zu einem Anstieg des Blutzuckerspiegels führt (McKay LI, 2003). Zusätzlicher Stress kann diesen Effekt verstärken.

Diese Daten liefern Hinweise, dass die Modulation der myeloiden Zellen durch endogene Glukokortikoide essentiell für den Ausgang der aGvHD ist. Die aGvHD bei GR<sup>lysM</sup>-Mäusen war mit einem veränderten Energieverbrauch assoziiert, doch scheint dieser nicht im Zusammenhang mit der Erkrankung zu stehen. Weitere Analysen sind notwendig um klären zu können, welche weiteren Faktoren zum Entstehen dieser fulminanten aGvHD führen.

### **5.5. CD8<sup>+</sup>-Donor-T-Zellen als essentielles Target von Glukokortikoiden bei der aGvHD**

Neben den APZs sind die T-Zellen bei der aGvHD von größter Bedeutung und ihre Modulation durch Glukokortikoide ist essentiell. Es sind sowohl CD4<sup>+</sup>-T-Zellen, die durch ihre Zytokinproduktion zur aGvHD beitragen, als auch CD8<sup>+</sup>-T-Zellen, die mittels zytotoxischer Aktivität (Granzym/Perforin sowie Fas-FasL) für die Gewebeschädigung verantwortlich sind, beteiligt. Dabei werden T-Zellen durch allogene MHC-Moleküle aktiviert, proliferieren und migrieren in die Zielorgane wie Darm, Haut oder Lunge (Reddy and Ferrara, 2003). Glukokortikoide können die T-Zellen vielfach beeinflussen, z. B. Apoptose induzieren (Herold et al., 2006), die zytotoxische Aktivität inhibieren (Schleimer et al., 1984) oder die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine unterdrücken (Ashwell et al., 2000). Jedoch ist unklar, welche dieser Mechanismen bei der Kontrolle der aGvHD entscheidend sind. Daten von Theiss-Sünnemann et al. zeigten, dass in einem totalen *mismatch*-Modell eine GR-Defizienz in den C57BL/6 transplantierten T-Zellen in BALB/c WT-Empfängern zu einer fulminanten aGvHD führte. Diese war begleitet von einer verstärkten Mortalität und einem höheren histopathologischen Score im Darm, der sich durch eine größere Gewebeerstörung äußerte. Außerdem war eine erhöhte Produktion pro-inflammatorischer Zytokine wie auch zytotoxischer Moleküle (Granzym, Perforin) zu beobachten. Jedoch war kein Unterschied bei der Anzahl in die Zielorgane infiltrierender CD3<sup>+</sup>-Zellen zu erkennen, unabhängig davon, ob der

GR exprimiert wurde oder nicht. Zudem war es nicht möglich das Krankheitsbild oder die hohe Mortalität durch die Gabe von therapeutischen Glukokortikoiden in Form von Dex positiv zu beeinflussen. Es zeigte sich eine Repression der Zytokine IL-2, IL-17A und IFN $\gamma$ , jedoch nicht der zytotoxischen Moleküle, was den Schluss zulässt, dass nicht der massive Anstieg an Zytokinen durch die CD4<sup>+</sup>-T-Zellen sondern vielmehr die CD8<sup>+</sup>-T-Zellen für das Krankheitsbild verantwortlich sind (Theiss-Suennemann, 2012; Theiss-Suennemann et al., 2015). Es konnte gezeigt werden, dass die GR-defizienten T-Zellen *per se* nicht mehr Zytokine sezernierten. Dies belegen die Ergebnisse von *in vitro* mit ConA stimulierten GR-defizienten T-Zellen im Vergleich mit GR-exprimierenden T-Zellen (Theiss-Suennemann et al., 2015). Daher ist die verstärkte Zytokinproduktion durch die aGvHD bedingt. Histologische Untersuchungen im Darm von an aGvHD erkrankten Mäusen haben gezeigt, dass es zur verstärkten Infiltration von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen bei den mit GR-defizienten T-Zellen transplantierten Mäusen kam (Theiss-Suennemann et al., 2015). Die vermehrte Expression von zytotoxischen Molekülen lässt auf eine verstärkte zytotoxische Aktivität schließen. Die Daten des durchgeführten Chrom-Tests mit *in vivo* generierten alloreaktiven T-Zellen bestätigen, dass sich GR-defiziente T-Zellen in der aGvHD durch eine verstärkte zytotoxische Aktivität auszeichnen, die sich auch durch Dex nicht reprimieren ließ (Theiss-Suennemann et al., 2015). Die Wichtigkeit der Regulation von CD8<sup>+</sup>-T-Zellen durch Glukokortikoide in der aGvHD belegen auch Ergebnisse eines CD8-abhängigen aGvHD-Modells, eines auf einem unterschiedlichen MHC-I basierenden Modells. Dabei zeigte sich nach Transplantation von C57BL/6 GR-defizienten T-Zellen in B6.bm1 Mäuse (C57BL/6 mit verändertem MHC-I) eine ebenso außergewöhnlich starke aGvHD, jedoch ohne die verstärkte Expression von Zytokinen (Theiss-Suennemann et al., 2015). Diese Daten deuten darauf hin, dass die Regulation von zytotoxischen T-Zellen für die Kontrolle der aGvHD durch endogene Glukokortikoide essentiell ist.

## 5.6. Ausblick

Die in dieser Arbeit beschriebenen Versuche belegen, dass die gewählte Strategie zur Therapie der aGvHD mittels *ex vivo* generierter und polarisierter BMDMs nicht erfolgreich war. Dies war der Fall obgleich die von uns genutzten BMDMs *in vitro* einen starken M2-Phänotyp zeigten und somit potentiell therapeutisch wirksam

hätten sein sollen. Das Fehlen eines positiven Behandlungseffektes begründet sich möglicherweise auf dem Verlust der M2-Polarisation *in vivo* durch das Vorhandensein einer pro-inflammatorischen Umgebung sowie die Proliferation der Makrophagen ausgelöst durch sezerniertes M-CSF. Im Gegensatz zu BMDMs ist bei Milz- oder Peritonealmakrophagen eine höhere Stabilität der M2-Polarisation beschrieben worden (Wang et al., 2013a). Diese Makrophagen gelten als ausgereifter als jene aus dem Knochenmark generierten. Andererseits ist der Einsatz von Makrophagen anderer Herkunft wie Milz oder Peritoneum aus klinischer Sicht schwierig, da zum einen die Zahl dieser Makrophagen niedrig ist, und zum anderen diese nur durch invasive Verfahren gewonnen werden können. Eine weitere Quelle für Makrophagen im Menschen stellen peripheren Blutmonozyten (PBMZ) dar. Es gibt Protokolle, die zur Gewinnung von scheinbar stabilen M2-Makrophagen aus Monozyten führen (Mia et al., 2014). Weiterhin wurde gezeigt, dass aus PBMZs generierte regulatorische Makrophagen therapeutisch wirksam sein können (Hutchinson et al., 2011; Hutchinson et al., 2012). Es gibt jedoch auch Beispiele eines positiven Effektes von M2-Makrophagen aus dem Knochenmark, unter anderem die Therapie des Typ1 Diabetes in der Maus (Parsa et al., 2012). Ziel müsste es somit sein, durch Variation der Quelle der Makrophagen oder deren Behandlung einen stabileren M2-Phänotyp zu erzielen, der auch *in vivo* unter stark pro-inflammatorischen Bedingungen erhalten bleibt. Ob und inwiefern sich die Stabilität durch Anwendung anderer Differenzierungs- und Polarisationsprotokolle verbessern lässt, müssen weitere Experimente zeigen.

Eine Beispiel für eine Möglichkeit, die Polarisation der Makrophagen zu stabilisieren, wäre die Blockierung des CD115-vermittelten Signalweges durch Applikation des Kinaseinhibitors GW2580 (Conway et al., 2005). Die Auswirkung von GW2580 auf die M2-Polarisation von Makrophagen ist jedoch strittig (Haegel et al., 2013) (Cao et al., 2014). Eine andere Möglichkeit wäre, durch Modulation verschiedener Signalwegen eine Repolarisation in M1-Richtung zu verhindern, um auf diesem Weg die M2-Polarisation aufrecht zu erhalten. Dies könnte zum Beispiel durch Makrophagen-spezifisches *Gene targeting* mittels miRNAs erreicht werden (Graff et al., 2012; Liu and Abraham, 2013; Squadrito et al., 2013). Weiterhin denkbar wäre eine Makrophagen-spezifische Therapie durch Einsatz von Liposomen für den Transfer anti-inflammatorischer Substanzen zur Aufrechterhaltung der M2-Polarisation (Jain et al., 2013).

Die *in vivo* Experimente zur aGvHD in GR<sup>dim</sup>- und GR<sup>lysM</sup>-Empfängermäusen verdeutlichen die Notwendigkeit der Regulation der aGvHD durch endogene GKs. Die Effekte einer fehlenden GK-Wirkung führen zu einer unkontrollierten Zytokinproduktion sowie einem veränderten Energiestoffwechsel, was sich durch Applikation von anti-IL-6 oder Dex normalisieren lässt. Dies deutet darauf hin, dass der GR möglicherweise auch durch die Regulation des Metabolismus Einfluss auf die aGvHD nimmt. Damit stellt der Energiestoffwechsel ein weiteres bislang wenig beachtetes Ziel bei der Therapie der aGvHD dar. Interessanterweise waren metabolische Effekte bei GR<sup>lysM</sup>-Empfängermäusen scheinbar nicht von Bedeutung. Es bleibt somit zu klären, ob die fulminante aGvHD in diesen Mäusen ebenfalls durch Zytokine bedingt ist oder ob andere Faktoren eine Rolle spielen. Nebenwirkungen könnten zum Beispiel durch eine gezieltere GK-Therapie mittels Einsatz von in Liposomen verpackter GKs verringert und somit die Behandlung der aGvHD optimiert werden. Dieser Ansatz wurde in ersten Experimenten in der Therapie der EAE bereits erfolgreich getestet (Schweingruber et al., 2011) und könnte in ähnlicher Weise auch für die aGvHD eingesetzt werden.

## 6. Bibliographie

Abramson, S.B., Amin, A.R., Clancy, R.M., and Attur, M. (2001). The role of nitric oxide in tissue destruction. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* 15, 831-845.

Adcock, I.M., and Caramori, G. (2001). Cross-talk between pro-inflammatory transcription factors and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol* 79, 376-384.

Aderem, A., and Underhill, D.M. (1999). MECHANISMS OF PHAGOCYTOSIS IN MACROPHAGES. *Annual Review of Immunology* 17, 593-623.

Alangari, A.A. (2010). Genomic and non-genomic actions of glucocorticoids in asthma. *Annals of Thoracic Medicine* 5, 133-139.

Amos, T.A.S., and Gordon, M.Y. (1995). Sources of human hematopoietic stem cells for transplantation—a review. *Cell Transplantation* 4, 547-569.

Antin, J.H., and Ferrara, J.L. (1992). Cytokine dysregulation and acute graft-versus-host disease. *Blood* 80, 2964-2968.

Arango Duque, G., and Descoteaux, A. (2014). Macrophage Cytokines: Involvement in Immunity and Infectious Diseases. *Frontiers in Immunology* 5, 491.

Ashwell, J.D., Lu, F.W., and Vacchio, M.S. (2000). Glucocorticoids in T cell development and function. *Annu Rev Immunol* 18, 309-345.

Ayroldi, E., and Riccardi, C. (2009). Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ): a new important mediator of glucocorticoid action. *The FASEB Journal* 23, 3649-3658.

Bamberger, C.M., Bamberger, A.M., de Castro, M., and Chrousos, G.P. (1995). Glucocorticoid receptor beta, a potential endogenous inhibitor of glucocorticoid action in humans. *J Clin Invest* 95, 2435-2441.

Barnes, D.W.H., Corp, M.J., Loutit, J.F., and Neal, F.E. (1956). Treatment of Murine Leukaemia with X Rays and Homologous Bone Marrow. *British Medical Journal* 2, 626-627.

Barnes, P.J. (2011). Glucocorticosteroids: current and future directions. *Br J Pharmacol* 163, 29-43.

Barnes, P.J., and Adcock, I.M. (2009). Glucocorticoid resistance in inflammatory diseases. *Lancet* 373, 1905-1917.

Barreda, D.R., Hanington, P.C., and Belosevic, M. (2004). Regulation of myeloid development and function by colony stimulating factors. *Dev Comp Immunol* 28, 509-554.

Baschant, U., Frappart, L., Rauchhaus, U., Bruns, L., Reichardt, H.M., Kamradt, T., Bräuer, R., and Tuckermann, J.P. (2011). Glucocorticoid therapy of antigen-induced arthritis depends on the dimerized glucocorticoid receptor in T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, 19317-19322.

Beilhack, A., Schulz, S., Baker, J., Beilhack, G.F., Nishimura, R., Baker, E.M., Landan, G., Herman, E.I., Butcher, E.C., Contag, C.H., *et al.* (2008). Prevention of acute graft-versus-host disease by blocking T-cell entry to secondary lymphoid organs. *Blood* 111, 2919-2928.

Bennett, G.D., and Kay, M.M. (1981). Homeostatic removal of senescent murine erythrocytes by splenic macrophages. *Exp Hematol* 9, 297-307.

- Benoit, M., Desnues, B., and Mege, J.-L. (2008). Macrophage Polarization in Bacterial Infections. *The Journal of Immunology* *181*, 3733-3739.
- Beres, A., Komorowski, R., Mihara, M., and Drobyski, W.R. (2011). Instability of Foxp3 Expression Limits the Ability of Induced Regulatory T Cells to Mitigate Graft versus Host Disease. *Clinical Cancer Research* *17*, 3969-3983.
- Beres, A.J., and Drobyski, W.R. (2013). The Role of Regulatory T Cells in the Biology of Graft Versus Host Disease. *Frontiers in Immunology* *4*.
- Berrebi, D., Bruscoli, S., Cohen, N., Foussat, A., Migliorati, G., Bouchet-Delbos, L., Maillot, M.-C., Portier, A., Couderc, J., Galanaud, P., *et al.* (2002). Synthesis of glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ) by macrophages: an anti-inflammatory and immunosuppressive mechanism shared by glucocorticoids and IL-10. *Blood* *101*, 729-738.
- Bhattacharyya, S., Brown, D.E., Brewer, J.A., Vogt, S.K., and Muglia, L.J. (2007). Macrophage glucocorticoid receptors regulate Toll-like receptor 4-mediated inflammatory responses by selective inhibition of p38 MAP kinase. *Blood* *109*, 4313-4319.
- Billingham, R.E. (1966). The biology of graft-versus-host reactions. *Harvey Lect* *62*, 21-78.
- Bingisser, R.M., Tilbrook, P.A., Holt, P.G., and Kees, U.R. (1998). Macrophage-Derived Nitric Oxide Regulates T Cell Activation via Reversible Disruption of the Jak3/STAT5 Signaling Pathway. *The Journal of Immunology* *160*, 5729-5734.
- Biola, A., Andreau, K., David, M., Sturm, M., Haake, M., Bertoglio, J., and Pallardy, M. (2000). The glucocorticoid receptor and STAT6 physically and functionally interact in T-lymphocytes. *FEBS Lett* *487*, 229-233.
- Blazar, B.R., Murphy, W.J., and Abedi, M. (2012). Advances in graft-versus-host disease biology and therapy. *Nat Rev Immunol* *12*, 443-458.
- Bleakley, M., and Riddell, S.R. (2004). Molecules and mechanisms of the graft-versus-leukaemia effect. *Nat Rev Cancer* *4*, 371-380.
- Bledsoe, R.K., Montana, V.G., Stanley, T.B., Delves, C.J., Apolito, C.J., McKee, D.D., Consler, T.G., Parks, D.J., Stewart, E.L., Willson, T.M., *et al.* (2002). Crystal Structure of the Glucocorticoid Receptor Ligand Binding Domain Reveals a Novel Mode of Receptor Dimerization and Coactivator Recognition. *Cell* *110*, 93-105.
- Bogie, J.F.J., Stinissen, P., and Hendriks, J.J.A. (2014). Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis. *Acta Neuropathologica* *128*, 191-213.
- Brancato, S.K., and Albina, J.E. (2011). Wound macrophages as key regulators of repair: origin, phenotype, and function. *Am J Pathol* *178*, 19-25.
- Brem, A.S. (2012). Targeting activated mineralocorticoid receptor: Occam's razor revisited. *Kidney Int* *82*, 619-620.
- Brewer, J.A., Khor, B., Vogt, S.K., Muglia, L.M., Fujiwara, H., Haegele, K.E., Sleckman, B.P., and Muglia, L.J. (2003). T-cell glucocorticoid receptor is required to suppress COX-2-mediated lethal immune activation. *Nat Med* *9*, 1318-1322.
- Brück, W., Sommermeier, N., Bergmann, M., Zettl, U., Goebel, H.H., Kretschmar, H.A., and Lassmann, H. (1996). Macrophages in Multiple Sclerosis. *Immunobiology* *195*, 588-600.

- Bruner, R.J., and Farag, S.S. (2003). Monoclonal antibodies for the prevention and treatment of graft-versus-host disease. *Seminars in Oncology* 30, 509-519.
- Brunstein, C.G., Miller, J.S., Cao, Q., McKenna, D.H., Hippen, K.L., Curtsinger, J., Defor, T., Levine, B.L., June, C.H., Rubinstein, P., *et al.* (2011). Infusion of ex vivo expanded T regulatory cells in adults transplanted with umbilical cord blood: safety profile and detection kinetics. *Blood* 117, 1061-1070.
- Buechler, C., Ritter, M., Orsó, E., Langmann, T., Klucken, J., and Schmitz, G. (2000). Regulation of scavenger receptor CD163 expression in human monocytes and macrophages by pro- and antiinflammatory stimuli. *Journal of Leukocyte Biology* 67, 97-103.
- Cao, Q., Wang, Y., Zheng, D., Sun, Y., Wang, C., Wang, X.M., Lee, V.W.S., Wang, Y., Zheng, G., Tan, T.K., *et al.* (2014). Failed renoprotection by alternatively activated bone marrow macrophages is due to a proliferation-dependent phenotype switch in vivo. *Kidney Int* 85, 794-806.
- Cao, Q., Wang, Y., Zheng, D., Sun, Y., Wang, Y., Lee, V.W.S., Zheng, G., Tan, T.K., Ince, J., Alexander, S.I., *et al.* (2010). IL-10/TGF- $\beta$ -Modified Macrophages Induce Regulatory T Cells and Protect against Adriamycin Nephrosis. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN* 21, 933-942.
- Carlson, M.J., West, M.L., Coghill, J.M., Panoskaltsis-Mortari, A., Blazar, B.R., and Serody, J.S. (2009). In vitro-differentiated TH17 cells mediate lethal acute graft-versus-host disease with severe cutaneous and pulmonary pathologic manifestations. *Blood* 113, 1365-1374.
- Castor, M.G.M., Pinho, V., and Teixeira, M.M. (2012). The Role of Chemokines in Mediating Graft Versus Host Disease: Opportunities for Novel Therapeutics. *Frontiers in Pharmacology* 3, 23.
- Catley, M.C. (2007). Dissociated Steroids. *The Scientific World JOURNAL* 7, 421-430.
- Chan, G.W., Gorgun, G., Miller, K.B., and Foss, F.M. (2003). Persistence of host dendritic cells after transplantation is associated with graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 9, 170-176.
- Chang, C.-C., Satwani, P., Oberfield, N., Vlad, G., Simpson, L.L., and Cairo, M.S. (2005). Increased induction of allogeneic-specific cord blood CD4+CD25+ regulatory T (Treg) cells: A comparative study of naïve and antigenic-specific cord blood Treg cells. *Experimental Hematology* 33, 1508-1520.
- Charmandari, E., Kino, T., Souvatzoglou, E., Vottero, A., Bhattacharyya, N., and Chrousos, G.P. (2004). Natural glucocorticoid receptor mutants causing generalized glucocorticoid resistance: molecular genotype, genetic transmission, and clinical phenotype. *J Clin Endocrinol Metab* 89, 1939-1949.
- Chazaud, B. (2014). Macrophages: Supportive cells for tissue repair and regeneration. *Immunobiology* 219, 172-178.
- Chen, H.L., and Li, L.R. (2012). Glucocorticoid receptor gene polymorphisms and glucocorticoid resistance in inflammatory bowel disease: a meta-analysis. *Dig Dis Sci* 57, 3065-3075.
- Chen, X., Das, R., Komorowski, R., Beres, A., Hessner, M.J., Mihara, M., and Drobyski, W.R. (2009). Blockade of interleukin-6 signaling augments regulatory T-cell reconstitution and attenuates the severity of graft-versus-host disease. *Blood* 114, 891-900.

Choi, S.W., and Reddy, P. (2014). Current and emerging strategies for the prevention of graft versus host disease. *Nature reviews Clinical oncology* 11, 536-547.

Chrousos, G.P., and Kino, T. (2005). Intracellular Glucocorticoid Signaling: A Formerly Simple System Turns Stochastic. *Science Signaling* 2005, pe48-pe48.

Clark, A.R. (2007). Anti-inflammatory functions of glucocorticoid-induced genes. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275, 79-97.

Clausen, B.E., Burkhardt, C., Reith, W., Renkawitz, R., and Forster, I. (1999). Conditional gene targeting in macrophages and granulocytes using LysMcre mice. *Transgenic Res* 8, 265-277.

Clayburgh, D.R., Shen, L., and Turner, J.R. (2004). A porous defense: the leaky epithelial barrier in intestinal disease. *Lab Invest* 84, 282-291.

Conway, J.G., McDonald, B., Parham, J., Keith, B., Rusnak, D.W., Shaw, E., Jansen, M., Lin, P., Payne, A., Crosby, R.M., *et al.* (2005). Inhibition of colony-stimulating-factor-1 signaling in vivo with the orally bioavailable cFMS kinase inhibitor GW2580. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 16078-16083.

Cooke, K.R., Hill, G.R., Crawford, J.M., Bungard, D., Brinson, Y.S., Delmonte, J., Jr., and Ferrara, J.L. (1998). Tumor necrosis factor- alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease. *The Journal of Clinical Investigation* 102, 1882-1891.

Copelan, E.A. (2006). Hematopoietic Stem-Cell Transplantation. *New England Journal of Medicine* 354, 1813-1826.

Corna, G., Campana, L., Pignatti, E., Castiglioni, A., Tagliafico, E., Bosurgi, L., Campanella, A., Brunelli, S., Manfredi, A.A., Apostoli, P., *et al.* (2010). Polarization dictates iron handling by inflammatory and alternatively activated macrophages. *Haematologica* 95, 1814-1822.

Costa, A., Poma, A., Martignoni, E., Nappi, G., Ur, E., and Grossman, A. (1997). Stimulation of corticotrophin-releasing hormone release by the obese (ob) gene product, leptin, from hypothalamic explants. *Neuroreport* 8, 1131-1134.

Coutinho, A.E., and Chapman, K.E. (2011). The anti-inflammatory and immunosuppressive effects of glucocorticoids, recent developments and mechanistic insights. *Molecular and Cellular Endocrinology* 335, 2-13.

Couturier, M., Lamarthee, B., Arbez, J., Renauld, J.C., Bossard, C., Malard, F., Bonnefoy, F., Mohty, M., Perruche, S., Tiberghien, P., *et al.* (2013). IL-22 deficiency in donor T cells attenuates murine acute graft-versus-host disease mortality while sparing the graft-versus-leukemia effect. *Leukemia* 27, 1527-1537.

Curtsinger, J.M., Schmidt, C.S., Mondino, A., Lins, D.C., Kedl, R.M., Jenkins, M.K., and Mescher, M.F. (1999). Inflammatory cytokines provide a third signal for activation of naive CD4+ and CD8+ T cells. *J Immunol* 162, 3256-3262.

D'Aveni, M., Rossignol, J., Coman, T., Sivakumaran, S., Henderson, S., Manzo, T., Santos e Sousa, P., Bruneau, J., Fouquet, G., Zavala, F., *et al.* (2015). G-CSF mobilizes CD34+ regulatory monocytes that inhibit graft-versus-host disease. *Science Translational Medicine* 7, 281ra242-281ra242.

- Dahlman-Wright, K., Wright, A., Gustafsson, J.A., and Carlstedt-Duke, J. (1991). Interaction of the glucocorticoid receptor DNA-binding domain with DNA as a dimer is mediated by a short segment of five amino acids. *J Biol Chem* 266, 3107-3112.
- Dausset, J. (1958). Iso-leuko-antibodies. *Acta Haematol* 20, 156-166.
- Davies, L.C., Jenkins, S.J., Allen, J.E., and Taylor, P.R. (2013). Tissue-resident macrophages. *Nat Immunol* 14, 986-995.
- Davis, M.J., Tsang, T.M., Qiu, Y., Dayrit, J.K., Freij, J.B., Huffnagle, G.B., and Olszewski, M.A. (2013). Macrophage M1/M2 polarization dynamically adapts to changes in cytokine microenvironments in *Cryptococcus neoformans* infection. *MBio* 4, e00264-00213.
- De Bosscher, K., Vanden Berghe, W., and Haegeman, G. (2003). The Interplay between the Glucocorticoid Receptor and Nuclear Factor- $\kappa$ B or Activator Protein-1: Molecular Mechanisms for Gene Repression. *Endocrine Reviews* 24, 488-522.
- de Jong, E.C., Vieira, P.L., Kalinski, P., and Kapsenberg, M.L. (1999). Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3. *Journal of Leukocyte Biology* 66, 201-204.
- De Kloet, E.R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M.S., and Joëls, M. (1997). Glucocorticoid Feedback Resistance. *Trends in Endocrinology & Metabolism* 8, 26-33.
- de Miguel, F., Lee, S., Onate, S., and Gao, A. (2003). Stat3 enhances transactivation of steroid hormone receptors. *Nuclear Receptor* 1, 3.
- De Vos, P., Lefebvre, A.M., Shriver, I., Fruchart, J.C., and Auwerx, J. (1998). Glucocorticoids induce the expression of the leptin gene through a non-classical mechanism of transcriptional activation. *Eur J Biochem* 253, 619-626.
- Deeg, H.J. (2007). How I treat refractory acute GVHD. *Blood* 109, 4119-4126.
- DeLuca, D.S., Eiz-Vesper, B., Ladas, N., Khattab, B.A.-M., and Blasczyk, R. (2009). High-throughput minor histocompatibility antigen prediction. *Bioinformatics* 25, 2411-2417.
- Deshmane, S.L., Kremlev, S., Amini, S., and Sawaya, B.E. (2009). Monocyte Chemoattractant Protein-1 (MCP-1): An Overview. *Journal of Interferon & Cytokine Research* 29, 313-326.
- Di Ianni, M., Falzetti, F., Carotti, A., Terenzi, A., Castellino, F., Bonifacio, E., Del Papa, B., Zei, T., Ostini, R.I., Cecchini, D., *et al.* (2011). Tregs prevent GVHD and promote immune reconstitution in HLA-haploidentical transplantation. *Blood* 117, 3921-3928.
- Di Marco, B., Massetti, M., Bruscoli, S., Macchiarulo, A., Di Virgilio, R., Velardi, E., Donato, V., Migliorati, G., and Riccardi, C. (2007). Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF- $\kappa$ B interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic Acids Res* 35, 517-528.
- Di Rosa, M., Radomski, M., Carnuccio, R., and Moncada, S. (1990). Glucocorticoids inhibit the induction of nitric oxide synthase in macrophages. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 172, 1246-1252.
- Ding, A.H., Nathan, C.F., and Stuehr, D.J. (1988). Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages. Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. *The Journal of Immunology* 141, 2407-2412.

Ding, L., Linsley, P.S., Huang, L.Y., Germain, R.N., and Shevach, E.M. (1993). IL-10 inhibits macrophage costimulatory activity by selectively inhibiting the up-regulation of B7 expression. *J Immunol* *151*, 1224-1234.

Duffner, U.A., Maeda, Y., Cooke, K.R., Reddy, P., Ordemann, R., Liu, C., Ferrara, J.L., and Teshima, T. (2004). Host dendritic cells alone are sufficient to initiate acute graft-versus-host disease. *J Immunol* *172*, 7393-7398.

Duncan, D.D., and Swain, S.L. (1994). Role of antigen-presenting cells in the polarized development of helper T cell subsets: evidence for differential cytokine production by Th0 cells in response to antigen presentation by B cells and macrophages. *European Journal of Immunology* *24*, 2506-2514.

Dutt, S., Baker, J., Kohrt, H.E., Kambham, N., Sanyal, M., Negrin, R.S., and Strober, S. (2011). CD8(+)CD44(hi) but not CD4(+)CD44(hi) memory T cells mediate potent graft antilymphoma activity without GVHD. *Blood* *117*, 3230-3239.

Dzierzak-Mietla, M., Markiewicz, M., Siekiera, U., Mizia, S., Koclega, A., Zielinska, P., Sobczyk-Kruszelnicka, M., and Kyrz-Krzemien, S. (2012). Occurrence and Impact of Minor Histocompatibility Antigens' Disparities on Outcomes of Hematopoietic Stem Cell Transplantation from HLA-Matched Sibling Donors. *Bone Marrow Research* *2012*, 12.

Edinger, M., and Hoffmann, P. (2011). Regulatory T cells in stem cell transplantation: strategies and first clinical experiences. *Current Opinion in Immunology* *23*, 679-684.

Edinger, M., Hoffmann, P., Ermann, J., Drago, K., Fathman, C.G., Strober, S., and Negrin, R.S. (2003). CD4+CD25+ regulatory T cells preserve graft-versus-tumor activity while inhibiting graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *Nat Med* *9*, 1144-1150.

Elenkov, I.J. (2004). Glucocorticoids and the Th1/Th2 balance. *Ann N Y Acad Sci* *1024*, 138-146.

Ermann, J., Hoffmann, P., Edinger, M., Dutt, S., Blankenberg, F.G., Higgins, J.P., Negrin, R.S., Fathman, C.G., and Strober, S. (2005). Only the CD62L+ subpopulation of CD4+CD25+ regulatory T cells protects from lethal acute GVHD. *Blood* *105*, 2220-2226.

Espinoza-Jiménez, A., Peón, A.N., and Terrazas, L.I. (2012). Alternatively Activated Macrophages in Types 1 and 2 Diabetes. *Mediators of Inflammation* *2012*, 1-10.

Eswarappa, S.M., Pareek, V., and Chakravorty, D. (2008). Role of actin cytoskeleton in LPS-induced NF-kappaB activation and nitric oxide production in murine macrophages. *Innate Immun* *14*, 309-318.

Fabrick, B.O., van Bruggen, R., Deng, D.M., Ligtenberg, A.J., Nazmi, K., Schornagel, K., Vloet, R.P., Dijkstra, C.D., and van den Berg, T.K. (2009). The macrophage scavenger receptor CD163 functions as an innate immune sensor for bacteria. *Blood* *113*, 887-892.

Fang, F.C. (2012). Antimicrobial actions of nitric oxide. *Nitric Oxide* *27*, Supplement, S10.

Ferrante, C.J., and Leibovich, S.J. (2012). Regulation of Macrophage Polarization and Wound Healing. *Advances in Wound Care* *1*, 10-16.

Ferrara, J.L. (1993). Cytokine dysregulation as a mechanism of graft versus host disease. *Curr Opin Immunol* *5*, 794-799.

- Ferrara, J.L.M. (2000). Pathogenesis of Acute Graft-Versus-Host Disease: Cytokines and Cellular Effectors. *Journal of Hematotherapy & Stem Cell Research* 9, 299-306.
- Ferrara, J.L.M., Cooke, K.R., and Deeg, H.J. (2004). *Graft vs. Host Disease, Vol 3rd* (Taylor and Francis Inc.).
- Ferrara, J.L.M., Levine, J.E., Reddy, P., and Holler, E. (2009). Graft-versus-Host Disease. *Lancet* 373, 1550-1561.
- Ferreira, R., and Bernardino, L. (2015). Dual role of microglia in health and disease: pushing the balance toward repair. *Frontiers in Cellular Neuroscience* 9, 51.
- Frankenberger, M., Haussinger, K., and Ziegler-Heitbrock, L. (2005). Liposomal methylprednisolone differentially regulates the expression of TNF and IL-10 in human alveolar macrophages. *Int Immunopharmacol* 5, 289-299.
- Fu, J., Wang, D., Yu, Y., Heinrichs, J., Wu, Y., Schutt, S., Kaosaard, K., Liu, C., Haarberg, K., Bastian, D., *et al.* (2015). T-bet is critical for the development of acute graft-versus-host disease through controlling T cell differentiation and function. *J Immunol* 194, 388-397.
- Fujiwara, N., and Kobayashi, K. (2005). Macrophages in inflammation. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy* 4, 281-286.
- Funder, J.W. (2005). Mineralocorticoid receptors: distribution and activation. *Heart Fail Rev* 10, 15-22.
- Gabrilovich, D.I., and Nagaraj, S. (2009). Myeloid-derived suppressor cells as regulators of the immune system. *Nat Rev Immunol* 9, 162-174.
- Galigniana, M.D., Piwien-Pilipuk, G., and Assreuy, J. (1999). Inhibition of glucocorticoid receptor binding by nitric oxide. *Mol Pharmacol* 55, 317-323.
- Garnett, C., Apperley, J.F., and Pavlu, J. (2013). Treatment and management of graft-versus-host disease: improving response and survival. *Ther Adv Hematol* 4, 366-378.
- Giles, K.M., Ross, K., Rossi, A.G., Hotchin, N.A., Haslett, C., and Dransfield, I. (2001). Glucocorticoid augmentation of macrophage capacity for phagocytosis of apoptotic cells is associated with reduced p130Cas expression, loss of paxillin/pyk2 phosphorylation, and high levels of active Rac. *J Immunol* 167, 976-986.
- Gillett, A., Marta, M., Jin, T., Tuncel, J., Leclerc, P., Nohra, R., Lange, S., Holmdahl, R., Olsson, T., Harris, R.A., *et al.* (2010). TNF production in macrophages is genetically determined and regulates inflammatory disease in rats. *J Immunol* 185, 442-450.
- Gillis, S., Crabtree, G.R., and Smith, K.A. (1979). Glucocorticoid-induced inhibition of T cell growth factor production. I. The effect on mitogen-induced lymphocyte proliferation. *J Immunol* 123, 1624-1631.
- Ginhoux, F., and Jung, S. (2014). Monocytes and macrophages: developmental pathways and tissue homeostasis. *Nat Rev Immunol* 14, 392-404.
- Glass, C.K., and Saijo, K. (2010). Nuclear receptor transrepression pathways that regulate inflammation in macrophages and T cells. *Nat Rev Immunol* 10, 365-376.
- Goleva, E., Martin, R.J., and Leung, D.Y.M. (2004). Combination of IL-2 and IL-4 inhibits glucocorticoid receptor alpha (GCR-alpha) nuclear translocation in peripheral blood

mononuclear cells (PBMC) and this effect is reversed by gamma interferon. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 113, S93.

Gordon, S. (2003). Alternative activation of macrophages. *Nat Rev Immunol* 3, 23-35.

Gordon, S., and Martinez, F.O. (2010). Alternative Activation of Macrophages: Mechanism and Functions. *Immunity* 32, 593-604.

Gordon, S., Pluddemann, A., and Martinez Estrada, F. (2014). Macrophage heterogeneity in tissues: phenotypic diversity and functions. *Immunol Rev* 262, 36-55.

Gordon, S., and Taylor, P.R. (2005). Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 5, 953-964.

Gorer, P.A. (1936). The detection of a hereditary antigenic difference in the blood of mice by means of human group a serum. *Journ of Genetics* 32, 17-31.

Gorer, P.A., Lyman, S., and Snell, G.D. (1948). Studies on the Genetic and Antigenic Basis of Tumour Transplantation. Linkage between a Histocompatibility Gene and 'Fused' in Mice. *Proceedings of the Royal Society of London B: Biological Sciences* 135, 499-505.

Goulmy, E., Schipper, R., Pool, J., Blokland, E., Falkenburg, J.H., Vossen, J., Gratwohl, A., Vogelsang, G.B., van Houwelingen, H.C., and van Rood, J.J. (1996). Mismatches of minor histocompatibility antigens between HLA-identical donors and recipients and the development of graft-versus-host disease after bone marrow transplantation. *N Engl J Med* 334, 281-285.

Graff, J.W., Dickson, A.M., Clay, G., McCaffrey, A.P., and Wilson, M.E. (2012). Identifying Functional MicroRNAs in Macrophages with Polarized Phenotypes. *Journal of Biological Chemistry* 287, 21816-21825.

Gratchev, A., Kzhyshkowska, J., Utikal, J., and Goerdts, S. (2005). Interleukin-4 and Dexamethasone Counterregulate Extracellular Matrix Remodelling and Phagocytosis in Type-2 Macrophages. *Scandinavian Journal of Immunology* 61, 10-17.

Gu, H., Marth, J., Orban, P., Mossmann, H., and Rajewsky, K. (1994). Deletion of a DNA polymerase beta gene segment in T cells using cell type-specific gene targeting. *Science* 265, 103-106.

Gui, T., Shimokado, A., Sun, Y., Akasaka, T., and Muragaki, Y. (2012). Diverse Roles of Macrophages in Atherosclerosis: From Inflammatory Biology to Biomarker Discovery. *Mediators of Inflammation* 2012, 1-14.

Haase, D., Starke, M., Puan, K.J., Lai, T.S., and Rotzschke, O. (2012). Immune modulation of inflammatory conditions: regulatory T cells for treatment of GvHD. *Immunol Res* 53, 200-212.

Haegel, H., Thioudellet, C., Hallet, R., Geist, M., Menguy, T., Le Pogam, F., Marchand, J.B., Toh, M.L., Duong, V., Calcei, A., *et al.* (2013). A unique anti-CD115 monoclonal antibody which inhibits osteolysis and skews human monocyte differentiation from M2-polarized macrophages toward dendritic cells. *MAbs* 5, 736-747.

Halliwell, B. (2006). Phagocyte-derived reactive species: salvation or suicide? *Trends in Biochemical Sciences* 31, 509-515.

Hamzic, N., Tang, Y., Eskilsson, A., Kugelberg, U., Ruud, J., Jonsson, J.I., Blomqvist, A., and Nilsberth, C. (2013). Interleukin-6 primarily produced by non-hematopoietic cells mediates the lipopolysaccharide-induced febrile response. *Brain Behav Immun* 33, 123-130.

Haniffa, M., Ginhoux, F., Wang, X.-N., Bigley, V., Abel, M., Dimmick, I., Bullock, S., Grisotto, M., Booth, T., Taub, P., *et al.* (2009). Differential rates of replacement of human dermal dendritic cells and macrophages during hematopoietic stem cell transplantation. *The Journal of Experimental Medicine* 206, 371-385.

Heasman, S.J., Giles, K.M., Rossi, A.G., Allen, J.E., Haslett, C., and Dransfield, I. (2004). Interferon  $\gamma$  suppresses glucocorticoid augmentation of macrophage clearance of apoptotic cells. *European Journal of Immunology* 34, 1752-1761.

Herold, M.J., McPherson, K.G., and Reichardt, H.M. (2006). Glucocorticoids in T cell apoptosis and function. *Cell Mol Life Sci* 63, 60-72.

Highfill, S.L., Rodriguez, P.C., Zhou, Q., Goetz, C.A., Koehn, B.H., Veenstra, R., Taylor, P.A., Panoskaltis-Mortari, A., Serody, J.S., Munn, D.H., *et al.* (2010). Bone marrow myeloid-derived suppressor cells (MDSCs) inhibit graft-versus-host disease (GVHD) via an arginase-1-dependent mechanism that is up-regulated by interleukin-13. *Blood* 116, 5738-5747.

Hill, G.R., Crawford, J.M., Cooke, K.R., Brinson, Y.S., Pan, L., and Ferrara, J.L.M. (1997). Total Body Irradiation and Acute Graft-Versus-Host Disease: The Role of Gastrointestinal Damage and Inflammatory Cytokines. *Blood* 90, 3204-3213.

Hill, G.R., and Ferrara, J.L.M. (2000). The primacy of the gastrointestinal tract as a target organ of acute graft-versus-host disease: rationale for the use of cytokine shields in allogeneic bone marrow transplantation. *Blood* 95, 2754-2759.

Hinds, T.D., Jr., Ramakrishnan, S., Cash, H.A., Stechschulte, L.A., Heinrich, G., Najjar, S.M., and Sanchez, E.R. (2010). Discovery of glucocorticoid receptor-beta in mice with a role in metabolism. *Mol Endocrinol* 24, 1715-1727.

Ho, V.T., and Soiffer, R.J. (2001). The history and future of T-cell depletion as graft-versus-host disease prophylaxis for allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *Blood* 98, 3192-3204.

Hochreiter-Hufford, A., and Ravichandran, K.S. (2013). Clearing the Dead: Apoptotic Cell Sensing, Recognition, Engulfment, and Digestion. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 5.

Hoechst, B., Voigtlaender, T., Ormandy, L., Gamrekashvili, J., Zhao, F., Wedemeyer, H., Lehner, F., Manns, M.P., Greten, T.F., and Korangy, F. (2009). Myeloid derived suppressor cells inhibit natural killer cells in patients with hepatocellular carcinoma via the NKp30 receptor. *Hepatology* 50, 799-807.

Hoffmann, P., Ermann, J., Edinger, M., Fathman, C.G., and Strober, S. (2002). Donor-type CD4+CD25+ Regulatory T Cells Suppress Lethal Acute Graft-Versus-Host Disease after Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *The Journal of Experimental Medicine* 196, 389-399.

Holler, E., Landfried, K., Meier, J., Hausmann, M., and Rogler, G. (2010). The Role of Bacteria and Pattern Recognition Receptors in GvHD. *International Journal of Inflammation* 2010.

Holowiecki, J. (2008). Indications for hematopoietic stem cell transplantation. *Pol Arch Med Wewn* 118, 658-663.

- Hori, S., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2003). Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 299, 1057-1061.
- Huber, S., Hoffmann, R., Muskens, F., and Voehringer, D. (2010). Alternatively activated macrophages inhibit T-cell proliferation by Stat6-dependent expression of PD-L2. *Blood* 116, 3311-3320.
- Hübner, S., and Tuckermann, J. (2012). Molecular mechanisms of the glucocorticoid receptor in steroid therapy – lessons from transgenic mice. *BioMolecular Concepts* 3.
- Hunter, M.M., Wang, A., Parhar, K.S., Johnston, M.J., Van Rooijen, N., Beck, P.L., and McKay, D.M. (2010). In vitro-derived alternatively activated macrophages reduce colonic inflammation in mice. *Gastroenterology* 138, 1395-1405.
- Hutchinson, J., Riquelme, P., Geissler, E., and Fändrich, F. (2011). Human Regulatory Macrophages. In *Suppression and Regulation of Immune Responses*, M.C. Cuturi, and I. Anegón, eds. (Humana Press), pp. 181-192.
- Hutchinson, J.A., Riquelme, P., and Geissler, E.K. (2012). Human regulatory macrophages as a cell-based medicinal product. *Curr Opin Organ Transplant* 17, 48-54.
- Iclozan, C., Yu, Y., Liu, C., Liang, Y., Yi, T., Anasetti, C., and Yu, X.Z. (2010). T helper17 cells are sufficient but not necessary to induce acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant* 16, 170-178.
- Irusen, E., Matthews, J.G., Takahashi, A., Barnes, P.J., Chung, K.F., and Adcock, I.M. (2002). p38 Mitogen-activated protein kinase-induced glucocorticoid receptor phosphorylation reduces its activity: role in steroid-insensitive asthma. *J Allergy Clin Immunol* 109, 649-657.
- Ismaili, N., and Garabedian, M.J. (2004). Modulation of glucocorticoid receptor function via phosphorylation. *Ann N Y Acad Sci* 1024, 86-101.
- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The Orphan Nuclear Receptor ROR $\gamma$ t Directs the Differentiation Program of Proinflammatory IL-17+ T Helper Cells. *Cell* 126, 1121-1133.
- Jacobsohn, D.A., and Vogelsang, G.B. (2007). Acute graft versus host disease. *Orphanet Journal of Rare Diseases* 2, 35-35.
- Jain, N.K., Mishra, V., and Mehra, N.K. (2013). Targeted drug delivery to macrophages. *Expert Opin Drug Deliv* 10, 353-367.
- Jaksch, M., Remberger, M., and Mattsson, J. (2005). Increased gene expression of chemokine receptors is correlated with acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 11, 280-287.
- Janikashvili, N., Trad, M., Gautheron, A., Samson, M., Lamarthee, B., Bonnefoy, F., Lemaire-Ewing, S., Ciudad, M., Rekhviashvili, K., Seaphanh, F., *et al.* (2015). Human monocyte-derived suppressor cells control graft-versus-host disease by inducing regulatory forkhead box protein 3-positive CD8 T lymphocytes. *J Allergy Clin Immunol*.
- Jansen, J. (2005). The First Successful Allogeneic Bone-Marrow Transplant: Georges Mathé. *Transfusion Medicine Reviews* 19, 246-248.
- Jiang, C.L., Liu, L., and Tasker, J.G. (2014). Why do we need nongenomic glucocorticoid mechanisms? *Front Neuroendocrinol* 35, 72-75.

- Joo, Y.-D., Lee, S.-M., Lee, S.-W., Lee, W.-S., Lee, S.-M., Park, J.-K., Choi, I.-W., Park, S.-G., Choi, I., and Seo, S.-K. (2009). Granulocyte colony-stimulating factor-induced immature myeloid cells inhibit acute graft-versus-host disease lethality through an indoleamine dioxygenase-independent mechanism. *Immunology* 128, e632-e640.
- Ju, J.-M., Lee, H., Oh, K., Lee, D.-S., and Choi, E.Y. (2014). Kinetics of IFN- $\gamma$  and IL-17 Production by CD4 and CD8 T Cells during Acute Graft-versus-Host Disease. *Immune Network* 14, 89-99.
- Ju, X.P., Xu, B., Xiao, Z.P., Li, J.Y., Chen, L., Lu, S.Q., and Huang, Z.X. (2005). Cytokine expression during acute graft-versus-host disease after allogeneic peripheral stem cell transplantation. *Bone Marrow Transplant* 35, 1179-1186.
- Juttler, E., Inta, I., Eigler, V., Herrmann, O., Maegele, I., Maser-Gluth, C., and Schwaninger, M. (2007). Neuronal NF-kappaB influences thermoregulation and survival in a sepsis model. *J Neuroimmunol* 189, 41-49.
- Kam, J.C., Szeffler, S.J., Surs, W., Sher, E.R., and Leung, D.Y. (1993). Combination IL-2 and IL-4 reduces glucocorticoid receptor-binding affinity and T cell response to glucocorticoids. *J Immunol* 151, 3460-3466.
- Kanda, J. (2013). Effect of HLA mismatch on acute graft-versus-host disease. *Int J Hematol* 98, 300-308.
- Kassel, O., Sancono, A., Krätzschar, J., Kreft, B., Stassen, M., and Cato, A.C.B. (2001). Glucocorticoids inhibit MAP kinase via increased expression and decreased degradation of MKP-1. *The EMBO Journal* 20, 7108-7116.
- Kerrigan, A.M., and Brown, G.D. (2009). C-type lectins and phagocytosis. *Immunobiology* 214, 562-575.
- Kimura, A., and Kishimoto, T. (2010). IL-6: Regulator of Treg/Th17 balance. *European Journal of Immunology* 40, 1830-1835.
- Kleiman, A., Hubner, S., Rodriguez Parkitna, J.M., Neumann, A., Hofer, S., Weigand, M.A., Bauer, M., Schmid, W., Schutz, G., Libert, C., *et al.* (2012). Glucocorticoid receptor dimerization is required for survival in septic shock via suppression of interleukin-1 in macrophages. *FASEB J* 26, 722-729.
- Kleiman, A., and Tuckermann, J.P. (2007). Glucocorticoid receptor action in beneficial and side effects of steroid therapy: Lessons from conditional knockout mice. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275, 98-108.
- Koenecke, C., Czeloth, N., Bubke, A., Schmitz, S., Kissenpfennig, A., Malissen, B., Huehn, J., Ganser, A., Förster, R., and Prinz, I. (2009). Alloantigen-specific de novo-induced Foxp3+ Treg revert in vivo and do not protect from experimental GVHD. *European Journal of Immunology* 39, 3091-3096.
- Kolb, H.J. (2008). Graft-versus-leukemia effects of transplantation and donor lymphocytes. *Blood* 112, 4371-4383.
- Korn, T., Mitsdoerffer, M., Croxford, A.L., Awasthi, A., Dardalhon, V.A., Galileos, G., Vollmar, P., Stritesky, G.L., Kaplan, M.H., Waisman, A., *et al.* (2008). IL-6 controls Th17 immunity in vivo by inhibiting the conversion of conventional T cells into Foxp3+ regulatory T cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105, 18460-18465.

- Kowal, K., Silver, R., Slawinska, E., Bielecki, M., Chyczewski, L., and Kowal-Bielecka, O. (2011). CD163 and its role in inflammation. *Folia Histochem Cytobiol* *49*, 365-374.
- Krause, S.W., Kreutz, M., and Andreesen, R. (1996). Differential effects of cell adherence on LPS-stimulated cytokine production by human monocytes and macrophages. *Immunobiology* *196*, 522-534.
- Kumar, R., and Calhoun, W.J. (2008). Differential regulation of the transcriptional activity of the glucocorticoid receptor through site-specific phosphorylation. *Biologics* *2*, 845-854.
- Kunewick, O.J., Kociban, D.L., Machen, L.L., and Buffo, M.J. (1993). Effect of donor and recipient gender disparities on fatal graft-vs.-host disease in a mouse model for major histocompatibility complex-matched unrelated-donor bone marrow transplantation. *Exp Hematol* *21*, 1570-1576.
- Lankester, A.C., Visser, L.F., Hartwig, N.G., Bredius, R.G., Gaspar, H.B., van der Burg, M., van Tol, M.J., Gross, T.G., and Egeler, R.M. (2005). Allogeneic stem cell transplantation in X-linked lymphoproliferative disease: two cases in one family and review of the literature. *Bone Marrow Transplant* *36*, 99-105.
- Lawrence, T., and Natoli, G. (2011a). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nature Reviews Immunology* *11*, 750-761.
- Lawrence, T., and Natoli, G. (2011b). Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. *Nat Rev Immunol* *11*, 750-761.
- Lech, M., and Anders, H.-J. (2013). Macrophages and fibrosis: How resident and infiltrating mononuclear phagocytes orchestrate all phases of tissue injury and repair. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* *1832*, 989-997.
- Leporatti, S., Gerth, A., Köhler, G., Kohlstrunk, B., Hauschildt, S., and Donath, E. (2006). Elasticity and adhesion of resting and lipopolysaccharide-stimulated macrophages. *FEBS Letters* *580*, 450-454.
- Lewis-Tuffin, L.J., and Cidlowski, J.A. (2006). The physiology of human glucocorticoid receptor beta (hGRbeta) and glucocorticoid resistance. *Ann N Y Acad Sci* *1069*, 1-9.
- Li, Y.H., Brauner, A., Jonsson, B., Van der Ploeg, I., Soder, O., Holst, M., Jensen, J.S., Lagercrantz, H., and Tullus, K. (2001). Inhibition of macrophage proinflammatory cytokine expression by steroids and recombinant IL-10. *Biol Neonate* *80*, 124-132.
- Lim, H.-Y., Müller, N., Herold, M.J., van den Brandt, J., and Reichardt, H.M. (2007). Glucocorticoids exert opposing effects on macrophage function dependent on their concentration. *Immunology* *122*, 47-53.
- Liu, G., and Abraham, E. (2013). MicroRNAs in immune response and macrophage polarization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* *33*, 170-177.
- Liu, Y.C., Zou, X.B., Chai, Y.F., and Yao, Y.M. (2014). Macrophage polarization in inflammatory diseases. *Int J Biol Sci* *10*, 520-529.
- Liu, Z., Yuan, X., Luo, Y., He, Y., Jiang, Y., Chen, Z.K., and Sun, E. (2009). Evaluating the effects of immunosuppressants on human immunity using cytokine profiles of whole blood. *Cytokine* *45*, 141-147.

- Lösel, R.M., Falkenstein, E., Feuring, M., Schultz, A., Tillmann, H.-C., Rossol-Haseroth, K., and Wehling, M. (2003). Nongenomic Steroid Action: Controversies, Questions, and Answers. *Physiological Reviews* 83, 965-1016.
- Lu, S.Y., Liu, K.Y., Liu, D.H., Xu, L.P., and Huang, X.J. (2011). High frequencies of CD62L(+) naive regulatory T cells in allografts are associated with a low risk of acute graft-versus-host disease following unmanipulated allogeneic haematopoietic stem cell transplantation. *Clin Exp Immunol* 165, 264-277.
- Lu, Y.C., Yeh, W.C., and Ohashi, P.S. (2008). LPS/TLR4 signal transduction pathway. *Cytokine* 42, 145-151.
- Lumeng, C.N., Deyoung, S.M., and Saltiel, A.R. (2007). Macrophages block insulin action in adipocytes by altering expression of signaling and glucose transport proteins. *American journal of physiology Endocrinology and metabolism* 292, E166-E174.
- Lv, M., Zhao, X.-S., Hu, Y., Chang, Y.-J., Zhao, X.-Y., Kong, Y., Zhang, X.-H., Xu, L.-P., Liu, K.-Y., and Huang, X.-J. (2015). Monocytic and promyelocytic myeloid-derived suppressor cells may contribute to G-CSF-induced immune tolerance in haplo-identical allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *American Journal of Hematology* 90, E9-E16.
- Ma, S.-F., Chen, Y.-J., Zhang, J.-X., Shen, L., Wang, R., Zhou, J.-S., Hu, J.-G., and Lü, H.-Z. (2015). Adoptive transfer of M2 macrophages promotes locomotor recovery in adult rats after spinal cord injury. *Brain, Behavior, and Immunity* 45, 157-170.
- Manenschijn, L., van den Akker, E.L., Lamberts, S.W., and van Rossum, E.F. (2009). Clinical features associated with glucocorticoid receptor polymorphisms. An overview. *Ann N Y Acad Sci* 1179, 179-198.
- Mantovani, A., Biswas, S.K., Galdiero, M.R., Sica, A., and Locati, M. (2013). Macrophage plasticity and polarization in tissue repair and remodelling. *J Pathol* 229, 176-185.
- Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25, 677-686.
- Mapara, M.Y., Leng, C., Kim, Y.-M., Bronson, R., Lokshin, A., Luster, A., and Sykes, M. (2006). Expression of Chemokines in GVHD Target Organs Is Influenced by Conditioning and Genetic Factors and Amplified by GVHR. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 12, 623-634.
- Marmont, A.M., Horowitz, M.M., Gale, R.P., Sobocinski, K., Ash, R.C., van Bekkum, D.W., Champlin, R.E., Dicke, K.A., Goldman, J.M., Good, R.A., *et al.* (1991). T-cell depletion of HLA-identical transplants in leukemia. *Blood* 78, 2120-2130.
- Martin-Fontecha, A., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2009). Dendritic cell migration to peripheral lymph nodes. *Handb Exp Pharmacol*, 31-49.
- Martinez, F.O., and Gordon, S. (2014). The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000Prime Reports* 6, 13.
- Martinez, F.O., Helming, L., and Gordon, S. (2009). Alternative Activation of Macrophages: An Immunologic Functional Perspective. *Annual Review of Immunology* 27, 451-483.
- Matsumoto, M., and Seya, T. (2008). TLR3: Interferon induction by double-stranded RNA including poly(I:C). *Advanced Drug Delivery Reviews* 60, 805-812.

- Mauer, J., Denson, J.L., and Brüning, J.C. (2015). Versatile functions for IL-6 in metabolism and cancer. *Trends in Immunology* 36, 92-101.
- McColl, A., Bournazos, S., Franz, S., Perretti, M., Morgan, B.P., Haslett, C., and Dransfield, I. (2009). Glucocorticoids induce protein S-dependent phagocytosis of apoptotic neutrophils by human macrophages. *J Immunol* 183, 2167-2175.
- McColl, A., Michlewska, S., Dransfield, I., and Rossi, A.G. (2007). Effects of glucocorticoids on apoptosis and clearance of apoptotic cells. *ScientificWorldJournal* 7, 1165-1181.
- McKay LI, C.J. (2003). Physiologic and Pharmacologic Effects of Corticosteroids. In *Holland-Frei Cancer Medicine 6th Edition*, D. Kufe, R. Pollock, and R. Weichselbaum, eds. (BC Decker).
- McWhorter, F.Y., Wang, T., Nguyen, P., Chung, T., and Liu, W.F. (2013). Modulation of macrophage phenotype by cell shape. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110, 17253-17258.
- Mellman, I., Turley, S.J., and Steinman, R.M. (1998). Antigen processing for amateurs and professionals. *Trends in Cell Biology* 8, 231-237.
- Merad, M., Hoffmann, P., Ranheim, E., Slaymaker, S., Manz, M.G., Lira, S.A., Charo, I., Cook, D.N., Weissman, I.L., Strober, S., *et al.* (2004). Depletion of host Langerhans cells before transplantation of donor alloreactive T cells prevents skin graft-versus-host disease. *Nat Med* 10, 510-517.
- Messina, C., Faraci, M., de Fazio, V., Dini, G., Calo, M.P., and Calore, E. (2008). Prevention and treatment of acute GvHD. *Bone Marrow Transplant* 41, S65-S70.
- Mia, S., Warnecke, A., Zhang, X.M., Malmstrom, V., and Harris, R.A. (2014). An optimized protocol for human M2 macrophages using M-CSF and IL-4/IL-10/TGF-beta yields a dominant immunosuppressive phenotype. *Scand J Immunol* 79, 305-314.
- Miller, A.H., Spencer, R.L., Pearce, B.D., Pisell, T.L., Azrieli, Y., Tanapat, P., Moday, H., Rhee, R., and McEwen, B.S. (1998). Glucocorticoid receptors are differentially expressed in the cells and tissues of the immune system. *Cell Immunol* 186, 45-54.
- Mills, K.H.G. (2004). Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* 4, 841-855.
- Mizel, S.B., Honko, A.N., Moors, M.A., Smith, P.S., and West, A.P. (2003). Induction of Macrophage Nitric Oxide Production by Gram-Negative Flagellin Involves Signaling Via Heteromeric Toll-Like Receptor 5/Toll-Like Receptor 4 Complexes. *The Journal of Immunology* 170, 6217-6223.
- Mizgerd, J.P., Spieker, M.R., and Doerschuk, C.M. (2001). Early response cytokines and innate immunity: essential roles for TNF receptor 1 and type I IL-1 receptor during *Escherichia coli* pneumonia in mice. *J Immunol* 166, 4042-4048.
- Moore, K.J., Sheedy, F.J., and Fisher, E.A. (2013). Macrophages in atherosclerosis: a dynamic balance. *Nature Reviews Immunology* 13, 709-721.
- Moore, Kathryn J., and Tabas, I. (2011). Macrophages in the Pathogenesis of Atherosclerosis. *Cell* 145, 341-355.
- Morishima, Y., Kawase, T., Malkki, M., Morishima, S., Spellman, S., Kashiwase, K., Kato, S., Cesbron, A., Tiercy, J.-M., Senitzer, D., *et al.* (2013). Significance of Ethnicity in the Risk of Acute Graft-versus-Host Disease and Leukemia Relapse after Unrelated Donor

Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 19, 1197-1203.

Moser, M., De Smedt, T., Sornasse, T., Tielemans, F., Chentoufi, A.A., Muraille, E., Van Mechelen, M., Urbain, J., and Leo, O. (1995). Glucocorticoids down-regulate dendritic cell function in vitro and in vivo. *Eur J Immunol* 25, 2818-2824.

Mosser, D.M., and Edwards, J.P. (2008). Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature Reviews Immunology* 8, 958-969.

Muller, N., Fischer, H.J., Tischner, D., van den Brandt, J., and Reichardt, H.M. (2013). Glucocorticoids induce effector T cell depolarization via ERM proteins, thereby impeding migration and APC conjugation. *J Immunol* 190, 4360-4370.

Munder, M., Eichmann, K., Moran, J.M., Centeno, F., Soler, G., and Modolell, M. (1999). Th1/Th2-regulated expression of arginase isoforms in murine macrophages and dendritic cells. *J Immunol* 163, 3771-3777.

Murphy Kenneth M., T.P., Walport Mark (2009). *Janeway Immunologie, Vol 7* (Spektrum Akademischer Verlag).

Murray, P.J., Allen, J.E., Biswas, S.K., Fisher, E.A., Gilroy, D.W., Goerdts, S., Gordon, S., Hamilton, J.A., Ivashkiv, L.B., Lawrence, T., *et al.* (2014). Macrophage activation and polarization: nomenclature and experimental guidelines. *Immunity* 41, 14-20.

Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011a). Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *Journal of Leukocyte Biology* 89, 557-563.

Murray, P.J., and Wynn, T.A. (2011b). Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature Reviews Immunology* 11, 723-737.

Nair, M.G., Gallagher, I.J., Taylor, M.D., Loke, P.n., Coulson, P.S., Wilson, R.A., Maizels, R.M., and Allen, J.E. (2005). Chitinase and Fizz Family Members Are a Generalized Feature of Nematode Infection with Selective Upregulation of Ym1 and Fizz1 by Antigen-Presenting Cells. *Infection and Immunity* 73, 385-394.

Naito, M., Hasegawa, G., Ebe, Y., and Yamamoto, T. (2004). Differentiation and function of Kupffer cells. *Med Electron Microsc* 37, 16-28.

Nelson, G., Wilde, G.J., Spiller, D.G., Kennedy, S.M., Ray, D.W., Sullivan, E., Unitt, J.F., and White, M.R. (2003). NF-kappaB signalling is inhibited by glucocorticoid receptor and STAT6 via distinct mechanisms. *J Cell Sci* 116, 2495-2503.

Nestel, F.P., Price, K.S., Seemayer, T.A., and Lapp, W.S. (1992). Macrophage priming and lipopolysaccharide-triggered release of tumor necrosis factor alpha during graft-versus-host disease. *J Exp Med* 175, 405-413.

Newton, R. (2000). Molecular mechanisms of glucocorticoid action: what is important? *Thorax* 55, 603-613.

Niedbala, W., Cai, B., and Liew, F.Y. (2006). Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Annals of the Rheumatic Diseases* 65, iii37-iii40.

Northrop, J.P., Crabtree, G.R., and Mattila, P.S. (1992). Negative regulation of interleukin 2 transcription by the glucocorticoid receptor. *The Journal of Experimental Medicine* 175, 1235-1245.

- Olefsky, J.M., and Glass, C.K. (2010). Macrophages, Inflammation, and Insulin Resistance. *Annual Review of Physiology* 72, 219-246.
- Ostrand-Rosenberg, S., and Sinha, P. (2009). Myeloid-Derived Suppressor Cells: Linking Inflammation and Cancer. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)* 182, 4499-4506.
- Pace, T.W., Hu, F., and Miller, A.H. (2007). Cytokine-effects on glucocorticoid receptor function: relevance to glucocorticoid resistance and the pathophysiology and treatment of major depression. *Brain Behav Immun* 21, 9-19.
- Park, M., and Seo, J.J. (2012). Role of HLA in Hematopoietic Stem Cell Transplantation. *Bone Marrow Research* 2012, 7.
- Parsa, R., Andresen, P., Gillett, A., Mia, S., Zhang, X.-M., Mayans, S., Holmberg, D., and Harris, R.A. (2012). Adoptive Transfer of Immunomodulatory M2 Macrophages Prevents Type 1 Diabetes in NOD Mice. *Diabetes* 61, 2881-2892.
- Passweg, J.R., Halter, J., Bucher, C., Gerull, S., Heim, D., Rovo, A., Buser, A., Stern, M., and Tichelli, A. (2012). Hematopoietic stem cell transplantation: a review and recommendations for follow-up care for the general practitioner. *Swiss Med Wkly* 142, w13696.
- Paul, W.E., and Seder, R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell* 76, 241-251.
- Pauleau, A.L., Rutschman, R., Lang, R., Pernis, A., Watowich, S.S., and Murray, P.J. (2004). Enhancer-mediated control of macrophage-specific arginase I expression. *J Immunol* 172, 7565-7573.
- Penack, O., Holler, E., and van den Brink, M.R. (2010). Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors. *Blood* 115, 1865-1872.
- Perdiguer, E.G., Klapproth, K., Schulz, C., Busch, K., Azzoni, E., Crozet, L., Garner, H., Trouillet, C., de Bruijn, M.F., Geissmann, F., *et al.* (2014). Tissue-resident macrophages originate from yolk-sac-derived erythro-myeloid progenitors. *Nature advance online publication*.
- Perry, A.R., and Linch, D.C. (1996). The history of bone-marrow transplantation. *Blood Rev* 10, 215-219.
- Pithadia, A.B., and Jain, S. (2011). Treatment of inflammatory bowel disease (IBD). *Pharmacological Reports* 63, 629-642.
- Pollard, J.W. (2009). Trophic macrophages in development and disease. *Nat Rev Immunol* 9, 259-270.
- Praloran, V., Raventos-Suarez, C., Bartocci, A., Lucas, J., Stanley, E.R., and Gibbons, J.J. (1990). Alterations in the expression of colony-stimulating factor-1 and its receptor during an acute graft-vs-host reaction in mice. *The Journal of Immunology* 145, 3256-3261.
- Pujols, L., Mullol, J., Roca-Ferrer, J., Torrego, A., Xaubet, A., Cidlowski, J.A., and Picado, C. (2002). Expression of glucocorticoid receptor  $\alpha$ - and  $\beta$ -isoforms in human cells and tissues. *American Journal of Physiology - Cell Physiology* 283, C1324-C1331.
- Raes, G., Van den Bergh, R., De Baetselier, P., and Ghassabeh, G.H. (2005). Arginase-1 and Ym1 Are Markers for Murine, but Not Human, Alternatively Activated Myeloid Cells. *The Journal of Immunology* 174, 6561-6562.

- Ramadan, A., and Paczesny, S. (2015). Various forms of tissue damage and danger signals following hematopoietic stem cell transplantation. *Frontiers in Immunology* 6.
- Rath, M., Müller, I., Kropf, P., Closs, E.I., and Munder, M. (2014). Metabolism via arginase or nitric oxide synthase: two competing arginine pathways in macrophages. *Frontiers in Immunology* 5.
- Rauch, A., Seitz, S., Baschant, U., Schilling, A.F., Illing, A., Stride, B., Kirilov, M., Mandic, V., Takacz, A., Schmidt-Ullrich, R., *et al.* (2010). Glucocorticoids suppress bone formation by attenuating osteoblast differentiation via the monomeric glucocorticoid receptor. *Cell Metab* 11, 517-531.
- Rea, D., van Kooten, C., van Meijgaarden, K.E., Ottenhoff, T.H., Melief, C.J., and Offringa, R. (2000). Glucocorticoids transform CD40-triggering of dendritic cells into an alternative activation pathway resulting in antigen-presenting cells that secrete IL-10. *Blood* 95, 3162-3167.
- Reddy, P. (2003). Pathophysiology of acute graft-versus-host disease. *Hematol Oncol* 21, 149-161.
- Reddy, P., and Ferrara, J.L. (2003). Immunobiology of acute graft-versus-host disease. *Blood Rev* 17, 187-194.
- Redondo, J.M., Fresno, M., and Lopez-Rivas, A. (1988). Inhibition of interleukin 2-induced proliferation of cloned murine T cells by glucocorticoids. Possible involvement of an inhibitory protein. *Eur J Immunol* 18, 1555-1559.
- Refojo, D., Liberman, A.C., Holsboer, F., and Arzt, E. (2001). Transcription factor-mediated molecular mechanisms involved in the functional cross-talk between cytokines and glucocorticoids. *Immunol Cell Biol* 79, 385-394.
- Reichardt, H.M., Gold, R., and Luhder, F. (2006). Glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Expert Rev Neurother* 6, 1657-1670.
- Reichardt, H.M., Kaestner, K.H., Tuckermann, J., Kretz, O., Wessely, O., Bock, R., Gass, P., Schmid, W., Herrlich, P., Angel, P., *et al.* (1998). DNA Binding of the Glucocorticoid Receptor Is Not Essential for Survival. *Cell* 93, 531-541.
- Reichardt, H.M., and Schütz, G. (1998). Glucocorticoid signalling—multiple variations of a common theme. *Molecular and Cellular Endocrinology* 146, 1-6.
- Reichardt, H.M., Tuckermann, J.P., Göttlicher, M., Vujic, M., Weih, F., Angel, P., Herrlich, P., and Schütz, G. (2001). Repression of inflammatory responses in the absence of DNA binding by the glucocorticoid receptor. *The EMBO Journal* 20, 7168-7173.
- Remick, D.G., and Xia, H. (2006). Hypothermia and sepsis. *Front Biosci* 11, 1006-1013.
- Rhen, T., and Cidlowski, J.A. (2005). Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *New England Journal of Medicine* 353, 1711-1723.
- Riquelme, P., Geissler, E.K., and Hutchinson, J.A. (2012). Alternative approaches to myeloid suppressor cell therapy in transplantation: comparing regulatory macrophages to tolerogenic DCs and MDSCs. *Transplant Res* 1, 17.
- Roifman, C.M., Fischer, A., Notarangelo, L.D., de la Morena, M.T., and Seger, R.A. (2010). Indications for hemopoietic stem cell transplantation. *Immunol Allergy Clin North Am* 30, 261-262.

- Rook, G.A.W., and Lightman, S. (1997). *Steroid Hormones and the T Cell Cytokine Profile*, Vol 1st (Springer).
- Rosborough, B.R., Raich-Regue, D., Turnquist, H.R., and Thomson, A.W. (2014). Regulatory myeloid cells in transplantation. *Transplantation* 97, 367-379.
- Rosewicz, S., McDonald, A.R., Maddux, B.A., Goldfine, I.D., Miesfeld, R.L., and Logsdon, C.D. (1988). Mechanism of glucocorticoid receptor down-regulation by glucocorticoids. *J Biol Chem* 263, 2581-2584.
- Rözer, T. (2015). Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators of Inflammation* 2015, 16.
- Rozkova, D., Horvath, R., Bartunkova, J., and Spisek, R. (2006). Glucocorticoids severely impair differentiation and antigen presenting function of dendritic cells despite upregulation of Toll-like receptors. *Clin Immunol* 120, 260-271.
- Rudick, R.A., Carpenter, C.S., Cookfair, D.L., Tuohy, V.K., and Ransohoff, R.M. (1993). In vitro and in vivo inhibition of mitogen-driven T-cell activation by recombinant interferon beta. *Neurology* 43, 2080-2087.
- Saag, K. (2002). Glucocorticoid use in rheumatoid arthritis. *Curr Rheumatol Rep* 4, 218-225.
- Sakaguchi, S., Sakaguchi, N., Asano, M., Itoh, M., and Toda, M. (1995). Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 155, 1151-1164.
- Sakata, N., Yasui, M., Okamura, T., Inoue, M., Yumura-Yagi, K., and Kawa, K. (2001). Kinetics of plasma cytokines after hematopoietic stem cell transplantation from unrelated donors: the ratio of plasma IL-10/sTNFR level as a potential prognostic marker in severe acute graft-versus-host disease. *Bone Marrow Transplant* 27, 1153-1161.
- Sapolsky, R.M., Romero, L.M., and Munck, A.U. (2000). How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions. *Endocrine Reviews* 21, 55-89.
- Sato, K. (2003). Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells. *Blood* 101, 3581-3589.
- Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109, 228-234.
- Schaaf, M.J.M., and Cidlowski, J.A. (2002). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and resistance. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* 83, 37-48.
- Schäcke, H., Docke, W.D., and Asadullah, K. (2002). Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther* 96, 23-43.
- Schäcke, H., Schottelius, A., Döcke, W.-D., Strehlke, P., Jaroch, S., Schmees, N., Rehwinkel, H., Hennekes, H., and Asadullah, K. (2004). Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 227-232.

Schäcke, H., Schottelius, A., Docke, W.D., Strehlke, P., Jaroch, S., Schmees, N., Rehwinkel, H., Hennekes, H., and Asadullah, K. (2003). Dissociation of transactivation from transrepression by a selective glucocorticoid receptor agonist leads to separation of therapeutic effects from side effects. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101, 227-232.

Schaer, D.J., Boretti, F.S., Hongegger, A., Poehler, D., Linnscheid, P., Staeger, H., Müller, C., Schoedon, G., and Schaffner, A. (2001). Molecular cloning and characterization of the mouse CD163 homologue, a highly glucocorticoid-inducible member of the scavenger receptor cysteine-rich family. *Immunogenetics* 53, 170-177.

Schaer, D.J., Boretti, F.S., Schoedon, G., and Schaffner, A. (2002). Induction of the CD163-dependent haemoglobin uptake by macrophages as a novel anti-inflammatory action of glucocorticoids. *British Journal of Haematology* 119, 239-243.

Schaffner, A., and Schaffner, T. (1987). Glucocorticoid-induced impairment of macrophage antimicrobial activity: mechanisms and dependence on the state of activation. *Rev Infect Dis* 9 Suppl 5, S620-629.

Schleimer, R.P., Jacques, A., Shin, H.S., Lichtenstein, L.M., and Plaut, M. (1984). Inhibition of T cell-mediated cytotoxicity by anti-inflammatory steroids. *J Immunol* 132, 266-271.

Schmaltz, C., Alpdogan, O., Horndasch, K.J., Muriglan, S.J., Kappel, B.J., Teshima, T., Ferrara, J.L.M., Burakoff, S.J., and van den Brink, M.R.M. (2001). Differential use of Fas ligand and perforin cytotoxic pathways by donor T cells in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia effect. *Blood* 97, 2886-2895.

Schweingruber, N., Haine, A., Tiede, K., Karabinskaya, A., van den Brandt, J., Wust, S., Metselaar, J.M., Gold, R., Tuckermann, J.P., Reichardt, H.M., *et al.* (2011). Liposomal encapsulation of glucocorticoids alters their mode of action in the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 187, 4310-4318.

Scroggins, S.M., Olivier, A.K., Meyerholz, D.K., and Schlueter, A.J. (2013). Characterization of Regulatory Dendritic Cells That Mitigate Acute Graft-versus-Host Disease in Older Mice Following Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *PLoS ONE* 8, e75158.

Sharpe, A.H., and Freeman, G.J. (2002). The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol* 2, 116-126.

Shlomchik, W.D. (2007). Graft-versus-host disease. *Nat Rev Immunol* 7, 340-352.

Shlomchik, W.D., Couzens, M.S., Tang, C.B., McNiff, J., Robert, M.E., Liu, J., Shlomchik, M.J., and Emerson, S.G. (1999). Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells. *Science* 285, 412-415.

Sica, A., and Mantovani, A. (2012). Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation* 122, 787-795.

Sidoroff, M., and Kolho, K.L. (2012). Glucocorticoid sensitivity in inflammatory bowel disease. *Ann Med* 44, 578-587.

Silva, I.A., Olkiewicz, K., Askew, D., Fisher, J.M., Chaudhary, M.N., Vannella, K.M., Deurloo, D.T., Choi, S.W., Pierce, E.M., Clouthier, S.G., *et al.* (2010). Secondary lymphoid organs contribute to, but are not required for the induction of graft-versus-host responses following allogeneic bone marrow transplantation: a shifting paradigm for T cell allo-activation. *Biol Blood Marrow Transplant* 16, 598-611.

- Silverman, M.N., Mukhopadhyay, P., Belyavskaya, E., Tonelli, L.H., Revenis, B.D., Doran, J.H., Ballard, B.E., Tam, J., Pacher, P., and Sternberg, E.M. (2013). Glucocorticoid receptor dimerization is required for proper recovery of LPS-induced inflammation, sickness behavior and metabolism in mice. *Mol Psychiatry* 18, 1006-1017.
- Sinha, P., Clements, V.K., Bunt, S.K., Albelda, S.M., and Ostrand-Rosenberg, S. (2007). Cross-talk between myeloid-derived suppressor cells and macrophages subverts tumor immunity toward a type 2 response. *J Immunol* 179, 977-983.
- Slatter, M.A., and Cant, A.J. (2011). Hematopoietic stem cell transplantation for primary immunodeficiency diseases. *Ann N Y Acad Sci* 1238, 122-131.
- Smith, A.R., and Wagner, J.E. (2009). Alternative haematopoietic stem cell sources for transplantation: place of umbilical cord blood. *Br J Haematol* 147, 246-261.
- Snell, G.D. (1948). Methods for the study of histocompatibility genes. *J Genet* 49, 87-108.
- Splettstoesser, W.D., and Schuff-Werner, P. (2002). Oxidative stress in phagocytes—"The enemy within". *Microscopy Research and Technique* 57, 441-455.
- Sprague, A.H., and Khalil, R.A. (2009). Inflammatory Cytokines in Vascular Dysfunction and Vascular Disease. *Biochemical pharmacology* 78, 539-552.
- Sprent, J. (1995). Antigen-Presenting Cells: Professionals and amateurs. *Current Biology* 5, 1095-1097.
- Squadrito, M.L., Etzrodt, M., De Palma, M., and Pittet, M.J. (2013). MicroRNA-mediated control of macrophages and its implications for cancer. *Trends in Immunology* 34, 350-359.
- Stahn, C., Löwenberg, M., Hommes, D.W., and Buttgereit, F. (2007). Molecular mechanisms of glucocorticoid action and selective glucocorticoid receptor agonists. *Molecular and Cellular Endocrinology* 275, 71-78.
- Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992). Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *The Journal of Experimental Medicine* 176, 287-292.
- Steiner, A.A., and Romanovsky, A.A. (2007). Leptin: at the crossroads of energy balance and systemic inflammation. *Progress in lipid research* 46, 89-107.
- Stellato, C. (2004). Post-transcriptional and Nongenomic Effects of Glucocorticoids. *Proceedings of the American Thoracic Society* 1, 255-263.
- Stout, R.D., Jiang, C., Matta, B., Tietzel, I., Watkins, S.K., and Suttles, J. (2005). Macrophages Sequentially Change Their Functional Phenotype in Response to Changes in Microenvironmental Influences. *The Journal of Immunology* 175, 342-349.
- Strasser, A. (2005). The role of BH3-only proteins in the immune system. *Nat Rev Immunol* 5, 189-200.
- Strassmann, G., Fong, M., Windsor, S., and Neta, R. (1993). The role of interleukin-6 in lipopolysaccharide-induced weight loss, hypoglycemia and fibrinogen production, in vivo. *Cytokine* 5, 285-290.
- Szabo, S.J., Kim, S.T., Costa, G.L., Zhang, X., Fathman, C.G., and Glimcher, L.H. (2000). A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. *Cell* 100, 655-669.

Szanto, A., Balint, B.L., Nagy, Z.S., Barta, E., Dezso, B., Pap, A., Szeles, L., Poliska, S., Oros, M., Evans, R.M., *et al.* (2010). STAT6 Transcription Factor Is a Facilitator of the Nuclear Receptor PPAR $\gamma$ -Regulated Gene Expression in Macrophages and Dendritic Cells. *Immunity* 33, 699-712.

Szatmáry, Z., Garabedian, M.J., and Vilček, J. (2004). Inhibition of Glucocorticoid Receptor-mediated Transcriptional Activation by p38 Mitogen-activated Protein (MAP) Kinase. *Journal of Biological Chemistry* 279, 43708-43715.

Tarique, A.A., Logan, J., Thomas, E., Holt, P.G., Sly, P.D., and Fantino, E. (2015). Phenotypic, Functional and Plasticity Features of Classical and Alternatively Activated Human Macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*.

Tawara, I., Koyama, M., Liu, C., Toubai, T., Thomas, D., Evers, R., Chockley, P., Nieves, E., Sun, Y., Lowler, K.P., *et al.* (2011). Interleukin-6 Modulates Graft-versus-Host Responses after Experimental Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Clinical Cancer Research* 17, 77-88.

Taylor, P.A., Lees, C.J., and Blazar, B.R. (2002). The infusion of ex vivo activated and expanded CD4+CD25+ immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality. *Blood* 99, 3493-3499.

Taylor, P.R., Martinez-Pomares, L., Stacey, M., Lin, H.H., Brown, G.D., and Gordon, S. (2004). MACROPHAGE RECEPTORS AND IMMUNE RECOGNITION. *Annual Review of Immunology* 23, 901-944.

Teshima, T. (2011). Th1 and Th17 join forces for acute GVHD. *Blood* 118, 4765-4767.

Theiss-Suennemann, J. (2012). Molecular and cellular mechanisms of glucocorticoids in the treatment of acute graft-versus-host disease (<http://hdl.handle.net/11858/00-1735-0000D-F0C8-B>). In *Zelluläre und Molekulare Immunologie* (Göttingen, Georg-August-Universität).

Theiss-Suennemann, J., Jörß, K., Messmann, J.J., Reichardt, S.D., Montes-Cobos, E., Lühder, F., Tuckermann, J.P., Awolff, H., Dressel, R., Gröne, H.-J., *et al.* (2015). Glucocorticoids attenuate acute graft-versus-host disease by suppressing the cytotoxic capacity of CD8+ T cells. *The Journal of Pathology* 235, 646-655.

Tisoncik, J.R., Korth, M.J., Simmons, C.P., Farrar, J., Martin, T.R., and Katze, M.G. (2012). Into the Eye of the Cytokine Storm. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 76, 16-32.

Trapani, J.A., and Smyth, M.J. (2002). Functional significance of the perforin/granzyme cell death pathway. *Nat Rev Immunol* 2, 735-747.

Truitt, R.L., and Atasoylu, A.A. (1991). Contribution of CD4+ and CD8+ T cells to graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia reactivity after transplantation of MHC-compatible bone marrow. *Bone Marrow Transplant* 8, 51-58.

Trzonkowski, P., Bieniaszewska, M., Juścińska, J., Dobyszuk, A., Krzystyniak, A., Marek, N., Myśliwska, J., and Hellmann, A. (2009). First-in-man clinical results of the treatment of patients with graft versus host disease with human ex vivo expanded CD4+CD25+CD127- T regulatory cells. *Clinical Immunology* 133, 22-26.

Tsukada, N., Kobata, T., Aizawa, Y., Yagita, H., and Okumura, K. (1999). Graft-Versus-Leukemia Effect and Graft-Versus-Host Disease Can Be Differentiated by Cytotoxic Mechanisms in a Murine Model of Allogeneic Bone Marrow Transplantation. *Blood* 93, 2738-2747.

- Tuckermann, J.P., Kleiman, A., McPherson, K.G., and Reichardt, H.M. (2005). Molecular mechanisms of glucocorticoids in the control of inflammation and lymphocyte apoptosis. *Crit Rev Clin Lab Sci* 42, 71-104.
- Tuckermann, J.P., Kleiman, A., Moriggl, R., Spanbroek, R., Neumann, A., Illing, A., Clausen, B.E., Stride, B., Förster, I., Habenicht, A.J.R., *et al.* (2007). Macrophages and neutrophils are the targets for immune suppression by glucocorticoids in contact allergy. *Journal of Clinical Investigation* 117, 1381-1390.
- Tuckermann, J.P., Reichardt, H.M., Arribas, R., Richter, K.H., Schutz, G., and Angel, P. (1999). The DNA binding-independent function of the glucocorticoid receptor mediates repression of AP-1-dependent genes in skin. *J Cell Biol* 147, 1365-1370.
- Tugal, D., Liao, X., and Jain, M.K. (2013). Transcriptional Control of Macrophage Polarization. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology* 33, 1135-1144.
- Turnbull, A.V., and Rivier, C.L. (1999). Regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis by cytokines: actions and mechanisms of action. *Physiol Rev* 79, 1-71.
- Tyteca, D., Nishino, T., Debaix, H., Van Der Smissen, P., N'Kuli, F., Hoffmann, D., Cnops, Y., Rabolli, V., van Loo, G., Beyaert, R., *et al.* (2015). Regulation of Macrophage Motility by the Water Channel Aquaporin-1: Crucial Role of M0/M2 Phenotype Switch. *PLoS ONE* 10, e0117398.
- Ukena, S.N., Velaga, S., Geffers, R., Grosse, J., Baron, U., Buchholz, S., Stadler, M., Bruder, D., Ganser, A., and Franzke, A. (2011). Human regulatory T cells in allogeneic stem cell transplantation. *Blood* 118, e82-92.
- Unanue, E.R. (1984). Antigen-Presenting Function of the Macrophage. *Annual Review of Immunology* 2, 395-428.
- Ushio, Y., Yamamoto, N., Sanchez-Bueno, A., and Yoshida, R. (1996). Failure to Reject an Allografted Tumor after Elimination of Macrophages in Mice. *Microbiology and Immunology* 40, 489-498.
- Vacchio, M.S., and Ashwell, J.D. (2000). Glucocorticoids and thymocyte development. *Seminars in Immunology* 12, 475-485.
- van de Garde, M.D.B., Martinez, F.O., Melgert, B.N., Hylkema, M.N., Jonkers, R.E., and Hamann, J. (2014). Chronic Exposure to Glucocorticoids Shapes Gene Expression and Modulates Innate and Adaptive Activation Pathways in Macrophages with Distinct Changes in Leukocyte Attraction. *The Journal of Immunology* 192, 1196-1208.
- van der Goes, A., Hoekstra, K., van den Berg, T.K., and Dijkstra, C.D. (2000). Dexamethasone promotes phagocytosis and bacterial killing by human monocytes/macrophages in vitro. *J Leukoc Biol* 67, 801-807.
- van der Meij, B.S., de Graaf, P., Wierdsma, N.J., Langius, J.A.E., Janssen, J.J.W.M., van Leeuwen, P.A.M., and Visser, O.J. (2013). Nutritional support in patients with GVHD of the digestive tract: state of the art. *Bone Marrow Transplant* 48, 474-482.
- van der Velden, V.H. (1998). Glucocorticoids: mechanisms of action and anti-inflammatory potential in asthma. *Mediators of Inflammation* 7, 229-237.
- van der Velden, W.J.F.M., Herbers, A.H.E., Feuth, T., Schaap, N.P.M., Donnelly, J.P., and Blijlevens, N.M.A. (2010). Intestinal Damage Determines the Inflammatory Response and

Early Complications in Patients Receiving Conditioning for a Stem Cell Transplantation. *PLoS ONE* 5, e15156.

van Rossum, E.F., and Lamberts, S.W. (2004). Polymorphisms in the glucocorticoid receptor gene and their associations with metabolic parameters and body composition. *Recent Prog Horm Res* 59, 333-357.

Vandevyver, S., Dejager, L., and Libert, C. (2012a). On the trail of the glucocorticoid receptor: into the nucleus and back. *Traffic* 13, 364-374.

Vandevyver, S., Dejager, L., and Libert, C. (2014). Comprehensive Overview of the Structure and Regulation of the Glucocorticoid Receptor. *Endocrine Reviews* 35, 671-693.

Vandevyver, S., Dejager, L., Tuckermann, J., and Libert, C. (2013). New insights into the anti-inflammatory mechanisms of glucocorticoids: an emerging role for glucocorticoid-receptor-mediated transactivation. *Endocrinology* 154, 993-1007.

Vandevyver, S., Dejager, L., Van Bogaert, T., Kleyman, A., Liu, Y., Tuckermann, J., and Libert, C. (2012b). Glucocorticoid receptor dimerization induces MKP1 to protect against TNF-induced inflammation. *J Clin Invest* 122, 2130-2140.

Vendramin, A., Gimondi, S., Bermema, A., Longoni, P., Rizzitano, S., Corradini, P., and Carniti, C. (2014). Graft monocytic myeloid-derived suppressor cell content predicts the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic transplantation of granulocyte colony-stimulating factor-mobilized peripheral blood stem cells. *Biol Blood Marrow Transplant* 20, 2049-2055.

Vignali, D.A.A., Collison, L.W., and Workman, C.J. (2008). How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol* 8, 523-532.

Wang, C., Yu, X., Cao, Q., Wang, Y., Zheng, G., Tan, T.K., Zhao, H., Zhao, Y., Wang, Y., and Harris, D. (2013a). Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunology* 14, 6.

Wang, D., Yu, Y., Haarberg, K., Fu, J., Kaosaard, K., Nagaraj, S., Anasetti, C., Gabrilovich, D., and Yu, X.-Z. (2013b). Dynamic Change and Impact of Myeloid-Derived Suppressor Cells in Allogeneic Bone Marrow Transplantation in Mice. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 19, 692-702.

Wang, N., Liang, H., and Zen, K. (2014). Molecular mechanisms that influence the macrophage m1-m2 polarization balance. *Front Immunol* 5, 614.

Wang, Y., Wang, Y.P., Zheng, G., Lee, V.W.S., Ouyang, L., Chang, D.H.H., Mahajan, D., Coombs, J., Wang, Y.M., Alexander, S.I., *et al.* (2007). Ex vivo programmed macrophages ameliorate experimental chronic inflammatory renal disease. *Kidney Int* 72, 290-299.

Waring, P., and Mullbacher, A. (1999). Cell death induced by the Fas/Fas ligand pathway and its role in pathology. *Immunol Cell Biol* 77, 312-317.

Weisz, A., Cicatiello, L., and Esumi, H. (1996). Regulation of the mouse inducible-type nitric oxide synthase gene promoter by interferon-gamma, bacterial lipopolysaccharide and NG-monomethyl-L-arginine. *Biochem J* 316 ( Pt 1), 209-215.

Wen, H.S., Wang, J.M., Zhou, H., Gong, S.I., Gao, L., and Wu, Y. (2013). Migration and Activation of T Cells During Development of Graft-Versus-Host Disease in a Mouse Model. *Transplantation Proceedings* 45, 713-718.

- Werner, S., and Brönnegård, M. (1996). Molecular basis of glucocorticoid-resistant syndromes. *Steroids* *61*, 216-221.
- Westin, J.R., Saliba, R.M., De Lima, M., Alousi, A., Hosing, C., Qazilbash, M.H., Khouri, I.F., Shpall, E.J., Anderlini, P., Rondon, G., *et al.* (2011). Steroid-Refractory Acute GVHD: Predictors and Outcomes. *Advances in Hematology* *2011*, 601953.
- Wing, K., Onishi, Y., Prieto-Martin, P., Yamaguchi, T., Miyara, M., Fehervari, Z., Nomura, T., and Sakaguchi, S. (2008). CTLA-4 control over Foxp3+ regulatory T cell function. *Science* *322*, 271-275.
- Wing, K., and Sakaguchi, S. (2010). Regulatory T cells exert checks and balances on self tolerance and autoimmunity. *Nat Immunol* *11*, 7-13.
- Wolf, D., Wolf, A.M., Fong, D., Rumpold, H., Strasak, A., Clausen, J., and Nachbaur, D. (2007). Regulatory T-cells in the graft and the risk of acute graft-versus-host disease after allogeneic stem cell transplantation. *Transplantation* *83*, 1107-1113.
- Wood, K.J., Bushell, A., and Hester, J. (2012). Regulatory immune cells in transplantation. *Nat Rev Immunol* *12*, 417-430.
- Wüst, S., van den Brandt, J., Tischner, D., Kleiman, A., Tuckermann, J.P., Gold, R., Lühder, F., and Reichardt, H.M. (2008). Peripheral T Cells Are the Therapeutic Targets of Glucocorticoids in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* *180*, 8434-8443.
- Wynn, T.A., Chawla, A., and Pollard, J.W. (2013). Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* *496*, 445-455.
- Yadav, V.K., Oury, F., Suda, N., Liu, Z.-W., Gao, X.-B., Confavreux, C., Klemenhagen, K.C., Tanaka, K.F., Gingrich, J.A., Guo, X.E., *et al.* (2009). A Serotonin-Dependent Mechanism Explains the Leptin Regulation of Bone Mass, Appetite, and Energy Expenditure. *Cell* *138*, 976-989.
- Yi, T., Chen, Y., Wang, L., Du, G., Huang, D., Zhao, D., Johnston, H., Young, J., Todorov, I., Umetsu, D.T., *et al.* (2009). Reciprocal differentiation and tissue-specific pathogenesis of Th1, Th2, and Th17 cells in graft-versus-host disease. *Blood* *114*, 3101-3112.
- Yi, T., Zhao, D., Lin, C.-L., Zhang, C., Chen, Y., Todorov, I., LeBon, T., Kandeel, F., Forman, S., and Zeng, D. (2008). Absence of donor Th17 leads to augmented Th1 differentiation and exacerbated acute graft-versus-host disease. *Blood* *112*, 2101-2110.
- You-Ten, K.E., Itie, A., Seemayer, T.A., Palfree, R.G., and Lapp, W.S. (1995). Increased expression of proopiomelanocortin (POMC) mRNA in adrenal glands of mice undergoing graft-versus-host disease (GVHD): association with persistent elevated plasma corticosterone levels. *Clin Exp Immunol* *102*, 596-602.
- Zanluqui, N., Wowk, P., and Pinge-Filho, P. (2015). Macrophage Polarization in Chagas Disease. *J Clin Cell Immunol* *6*, 2.
- Zen, M., Canova, M., Campana, C., Bettio, S., Nalotto, L., Rampudda, M., Ramonda, R., Iaccarino, L., and Doria, A. (2011). The kaleidoscope of glucocorticoid effects on immune system. *Autoimmunity Reviews* *10*, 305-310.
- Zhang, C.P., Li, X.C., Tang, R.X., Li, X.Y., Zheng, K.Y., and Zeng, L.Y. (2013). Effects of p38MAPK inhibitor on the occurrence of acute GVHD and intestine damage after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation in mice. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* *34*, 673-678.

- Zhang, X.-M., Lund, H., Mia, S., Parsa, R., and Harris, R.A. (2014). Adoptive transfer of cytokine-induced immunomodulatory adult microglia attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis in DBA/1 mice. *Glia* 62, 804-817.
- Zhang, Y., Louboutin, J.P., Zhu, J., Rivera, A.J., and Emerson, S.G. (2002a). Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T cell-mediated acute graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 109, 1335-1344.
- Zhang, Y., Shlomchik, W.D., Joe, G., Louboutin, J.-P., Zhu, J., Rivera, A., Giannola, D., and Emerson, S.G. (2002b). APCs in the Liver and Spleen Recruit Activated Allogeneic CD8+ T Cells to Elicit Hepatic Graft-Versus-Host Disease. *The Journal of Immunology* 169, 7111-7118.
- Zhang, Z., Jones, S., Hagood, J.S., Fuentes, N.L., and Fuller, G.M. (1997). STAT3 acts as a co-activator of glucocorticoid receptor signaling. *J Biol Chem* 272, 30607-30610.
- Zhao, K., Zhao, D., Huang, D., Song, X., Chen, C., Pan, B., Wu, Q., Cao, J., Yao, Y., Zeng, L., *et al.* (2013). The identification and characteristics of IL-22-producing T cells in acute graft-versus-host disease following allogeneic bone marrow transplantation. *Immunobiology* 218, 1505-1513.
- Zhao, K., Zhao, D., Huang, D., Yin, L., Chen, C., Pan, B., Wu, Q., Li, Z., Yao, Y., Shen, E., *et al.* (2014). Interleukin-22 aggravates murine acute graft-versus-host disease by expanding effector T cell and reducing regulatory T cell. *J Interferon Cytokine Res* 34, 707-715.
- Zheng, D., Wang, Y., Cao, Q., Lee, V.W., Zheng, G., Sun, Y., Tan, T.K., Alexander, S.I., and Harris, D.C. (2011). Transfused macrophages ameliorate pancreatic and renal injury in murine diabetes mellitus. *Nephron Exp Nephrol* 118, e87-99.
- Zheng, H., Matte-Martone, C., Jain, D., McNiff, J., and Shlomchik, W.D. (2009). Central memory CD8+ T cells induce graft-versus-host disease and mediate graft-versus-leukemia. *J Immunol* 182, 5938-5948.
- Zhou, Z., French, D.L., Ma, G., Eisenstein, S., Chen, Y., Divino, C.M., Keller, G., Chen, S.-H., and Pan, P.-Y. (2010). Development and Function of Myeloid-Derived Suppressor Cells Generated from Mouse Embryonic and Hematopoietic Stem Cells. *Stem Cells*, N/A-N/A.
- Zinker, B., Mika, A., Nguyen, P., Wilcox, D., Ohman, L., von Geldern, T.W., Opgenorth, T., and Jacobson, P. (2007). Liver-selective glucocorticoid receptor antagonism decreases glucose production and increases glucose disposal, ameliorating insulin resistance. *Metabolism* 56, 380-387.

## 7. Danksagung

An erster Stelle danke ich Herrn Prof. Reichardt für die Möglichkeit, dass ich meine Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe durchführen konnte sowie für die Unterstützung während meiner Arbeit. Des Weiteren danke ich ihm dafür, dass ich an seinem Wissen und seiner Erfahrung teilhaben konnte und die Möglichkeit hatte wissenschaftliche Ideen mit ihm zu diskutieren, was mir dabei half mich als Wissenschaftler weiterzuentwickeln. Außerdem danke ich Herrn Prof. Dobbstein und Herrn Prof. Pukrop als Teil meines Thesis-Komitees für ihre Betreuung, ihrem großen Interesse an meiner Arbeit und die Möglichkeit ihre wissenschaftliche Expertise mit mir zu teilen.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitgliedern der AG Reichardt bedanken. In erster Linie bei Frau Dr. Henrike Fischer, die durch wissenschaftliche Diskussionen und ihre Anregungen zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen hat. Zudem danke ich ihr für eine tolle gemeinsame Zeit. Weiterhin danke ich Carina, Elena und Sybille für ihre Unterstützung. Zudem möchte ich mich herzlichst bei Julian Koch und Amina Bassibas bedanken für ihre Arbeit und ihre Unterstützung sowie Ratschläge während meiner Doktorandenzeit.

Zusätzlich bedanke ich mich bei den ehemaligen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Dr. Kai Michel und Dr. Anna Karabinskaya für die gute Zusammenarbeit und die tolle gemeinsame Zeit. Ein besonderer Dank geht an Frau Dr. Jennifer Theiss-Sünnemann, die mich an den Daten ihrer intensiven Vorarbeiten und ihrer Erfahrung hat teilhaben lassen.

Ralf Dressel und Lesley Elsner danke ich für die Durchführung des Chrom-Tests. Zudem danke ich Julius Kühn, Caren Bartsch und Marcel Liebick für die Korrekturen meiner Arbeit.

Vielen Dank auch an das Studiendekanat und die Organisatoren des Promotionsstudienganges „Molekulare Medizin“ für ihre Unterstützung bei der Bewältigung bürokratischer Abläufe sowie die Finanzierung der Teilnahme an Kongressen

An dieser Stelle möchte ich auch meine vielen Versuchsmäuse nicht unerwähnt lassen, die ihr Leben für dieses Projekt und den damit verbundenen Erkenntnisgewinn gaben.

Schließlich danke ich meiner Familie, allen voran meiner Mutter, meinem Vater sowie meiner Schwester, die mich nach Kräften unterstützt und mich motiviert haben, immer mein Bestes zu geben. Sie haben immer an mich geglaubt und mich gelehrt nie aufzugeben.

Schließlich geht ein großer Dank nach Berlin an meine engsten Freunde für ihre jahrelange Unterstützung und den guten Kontakt, trotz der Entfernung. Ohne sie wäre das Projekt Doktorarbeit nicht möglich gewesen. Am Schluss geht ein großes Dankeschön an dich, Eugen, der mit mir die Hochs und Tiefs der Doktorandenzeit durchlebt hat und mir allzeit Kraft gegeben hat weiter zumachen.

## A. Anhang

### A.1. Abkürzungen

<b>µl</b>	Mikroliter
<b>7-AAD</b>	7-Aminoactinomycin
<b>ACTH</b>	adrenocorticotropes Hormon
<b>aGVHD</b>	akute <i>Graft-versus-Host disease</i>
<b>AIA</b>	Allergen-induzierte Arthritis
<b>AK</b>	Antikörper
<b>AP-1</b>	aktivierendes Protein-1
<b>APC</b>	Allophycocyanin
<b>APZ</b>	Antigenpräsentierende Zelle
<b>Arg1</b>	Arginase 1
<b>BMDM</b>	Knochenmarksmakrophagen ( <i>bone marrow derived macrophage</i> )
<b>bp</b>	Basenpaar
<b>BSA</b>	bovines Serumalbumin
<b>cDNA</b>	komplementäre ( <i>complementary</i> ) DNA
<b>CFSE</b>	Carboxyfluoresceinsuccinimidylester
<b>cGvHD</b>	chronische <i>Graft-versus-Host disease</i>
<b>CHR</b>	<i>Corticotropin releasing hormon</i>
<b>CHS</b>	Kontaktallergie ( <i>contact hypersensitivity</i> )
<b>ConA</b>	Concanavalin A
<b>CsA</b>	Ciclosporin A
<b>CT</b>	<i>Cycle Threshold</i>
<b>CTLA-4</b>	zytotoxisches ( <i>cytotoxic</i> ) T-Lymphozyten assoziiertes Antigen 4
<b>DBD</b>	DNA-Bindedomäne
<b>Dex</b>	Dexamethason
<b>DISC</b>	<i>Death inducing signal complex</i>
<b>DMEM</b>	<i>Dulbeccos modified eagle medium</i>
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure ( <i>deoxyribonucleic acid</i> )
<b>dNTP</b>	Desoxyribonukleosidtriphosphat
<b>DZ</b>	dendritische Zelle
<b>E. coli</b>	<i>Escherichia coli</i>
<b>EAE</b>	experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

<b>EDTA</b>	Ethylendiamintetraessigsäure (- <i>acid</i> )
<b>ELISA</b>	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
<b>EZM</b>	Extrazelluläre Matrix
<b>FACS</b>	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence-activated cell sorting</i> )
<b>FADD</b>	<i>Fas-Associated protein with Death Domain</i>
<b>FCS</b>	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
<b>FITC</b>	Fluoresceinisothiocyanat
<b>FoxP3</b>	<i>Forkhead-Box-Protein 3</i>
<b>FSC</b>	Vorwärtsstreulicht ( <i>forward scatter</i> )
<b>g</b>	Erdbeschleunigung
<b>g</b>	Gramm
<b>G-CSF</b>	<i>Granulocyte-Colony Stimulating Factor</i>
<b>GILZ</b>	<i>Glucocorticoid induced leucin zipper</i>
<b>GK</b>	Glukokortikoid
<b>GLUT-4</b>	Glukosetransporter 4
<b>GM-CSF</b>	<i>Granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>GR</b>	Glukokortikoidrezeptor
<b>Gr<sup>dim</sup></b>	GR-Dimerisierungsmutante
<b>GRE</b>	Glukokortikoid responsives Element
<b>GR<sup>lck</sup></b>	lck-Cre GRflox/flox, GR-Defizienz in T-Zellen
<b>GR<sup>lysM</sup></b>	lysM-Cre GRflox/flox, GR-Defizienz in myeloiden Zellen
<b>GvHD</b>	Graft-versus-Host Erkrankung ( <i>Graft-versus-Host disease</i> )
<b>GvL</b>	<i>Graft-versus-Leukemia</i>
<b>h</b>	Stunde
<b>HLA</b>	humanes Leukozytenantigen
<b>HPA</b>	Hypothalamus-Hypophysen-Nebennierenrinden-Achse ( <i>Hypothalamic-pituitary-adrenal axis</i> )
<b>HPRT</b>	Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase
<b>HRP</b>	Meerrettichperoxidase ( <i>horseradish peroxidase</i> )
<b>HSP</b>	Hitzeschockprotein ( <i>heat shock protein</i> )
<b>HSZ</b>	hämatopoetische Stammzelle
<b>HSZT</b>	hämatopoetische Stammzelltransplantation
<b>i. p.</b>	intraperitoneal
<b>i. v.</b>	intravenös
<b>ICAM-1</b>	interzelluläres ( <i>intercellular</i> ) Adhäsionsmolekül 1

<b>IFNY</b>	Interferon $\gamma$
<b>IL</b>	Interleukin
<b>iNOS</b>	induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase ( <i>inducible nitric oxide synthase</i> )
<b>IRF</b>	<i>Interferon response element</i>
<b>iTreg</b>	induzierte regulatorische T-Zelle
<b>IVC</b>	individuell belüfteter Käfig ( <i>individually ventilated cage</i> )
<b>JNK</b>	C-Jun-N-terminale Kinasen
<b>KM</b>	Knochenmark
<b>KMT</b>	Knochenmarkstransplantation
<b>l</b>	Liter
<b>LBD</b>	Ligandenbindungsdomäne
<b>LCCM</b>	<i>L cell conditioned medium</i>
<b>LPS</b>	Lipopolysaccharid
<b>MACS</b>	<i>Magnetic Activated Cell Sorting</i>
<b>MAPK</b>	Mitogen-aktivierte-Proteinkinase
<b>MCP-1</b>	Makrophagen-Chemoattraktorprotein-1
<b>M-CSF</b>	<i>Macrophage colony-stimulating factor</i>
<b>MDSC</b>	myeloiden Suppressorzellen ( <i>Myeloid-derived suppressor cells</i> )
<b>MFI</b>	<i>Mean fluorescence intensity</i>
<b>MHC</b>	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
<b>miHA<sub>g</sub></b>	<i>Minor Histocompatibility antigens</i>
<b>Min</b>	Minute
<b>MKP-1</b>	MAP-Kinase-Phosphatase-1
<b>ml</b>	Milliliter
<b>mM</b>	Millimolar
<b>MR</b>	Mineralokortikoidrezeptor
<b>MS</b>	multiple Sklerose
<b>n</b>	Anzahl der Versuchstiere
<b>NF<math>\kappa</math>B</b>	<i>Nuclear Factor kappaB</i>
<b>nm</b>	Nanometer
<b>NO</b>	Stickstoffmonoxid ( <i>nitric oxide</i> )
<b>nTreg</b>	natürliche regulatorische T-Zelle
<b>PAMP</b>	<i>Pathogen-associated molecular patterns</i>
<b>PBMZ</b>	periphere Blutmonozyten ( <i>Peripheral blood monocytes</i> )

<b>PBS</b>	phosphatgepufferte Salzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
<b>PBSC</b>	periphere Blutstammzellen ( <i>Peripheral blood stem cells</i> )
<b>PBS-T</b>	PBS-Tween
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion (Polymerase chain reaction)
<b>PE</b>	Phycoerythrin
<b>PE-Cy7</b>	PE-Cyanin7
<b>Pol</b>	Polymerase
<b>PPARY</b>	<i>Peroxisome proliferator-activated receptor <math>\gamma</math></i>
<b>PRR</b>	<i>Pattern recognition receptor</i>
<b>PS</b>	Penicillin/Streptomycin
<b>qRT-PCR</b>	quantitative Real-Time-PCR
<b>RA</b>	rheumatoide Arthritis
<b>RMZ</b>	regulatorische myeloide Zellen
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure ( <i>ribonucleic acid</i> )
<b>RORYt</b>	<i>RAR-related orphan receptor gamma t</i>
<b>ROS</b>	reaktive Sauerstoffspezies ( <i>reactive oxygen species</i> )
<b>RT</b>	Raumtemperatur
<b>SEGRA</b>	selektiver Glukokortikoidrezeptor-Agonist
<b>Sek</b>	Sekunde
<b>SEM</b>	Standardfehler (standard error of mean)
<b>siRNA</b>	<i>small interfering RNA</i>
<b>SNP</b>	<i>Single Nucleotide polymorphism</i>
<b>SPF</b>	spezifisch pathogenfrei
<b>SSC</b>	Seitwärtsstreulicht ( <i>sideward scatter</i> )
<b>STAT</b>	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
<b>T2D</b>	Typ 2 Diabetes
<b>TAE</b>	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
<b>Taq</b>	<i>Thermus aquaticus</i>
<b>T-bet</b>	<i>T-box expressed in T cells</i>
<b>TF</b>	Transkriptionsfaktor
<b>TGF<math>\beta</math></b>	<i>transforming growth factor <math>\beta</math></i>
<b>Th</b>	T-Helferzelle
<b>TLR</b>	Toll-like-Rezeptor
<b>TMB</b>	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin

<b>TNF<math>\alpha</math></b>	Tumornekrosefaktor $\alpha$
<b>Treg</b>	regulatorische T-Zelle
<b>TZR</b>	T-Zell-Rezeptor
<b>WT</b>	Wildtyp
<b>ZNS</b>	Zentralnervensystem
<b>ZTL</b>	zytotoxischer T-Lymphozyt

## A.2. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Polarisation von Makrophagen .....	6
Abb. 2: Pathogenese der aGvHD .....	14
Abb. 3: Wirkungsmechanismen von GKs über den Glukokortikoidrezeptor .....	22
Abb. 4: Morphologie polarisierter muriner BMDMs.....	62
Abb. 5: Analyse der Genexpression von M1- bzw. M2-Markern bei murinen BMDMs mittels qRT-PCR.....	66
Abb. 6: Analyse von M1- und M2-Markern von murinen BMDMs mittels FACS .....	69
Abb. 7: Phagozytose-Eigenschaften von polarisierten murinen BMDMs.....	70
Abb. 8: Adhärenz von polarisierten murinen BMDMs.....	72
Abb. 9: NO-Produktion von polarisierten murinen BMDMs .....	73
Abb. 10: Einfluss von polarisierten murinen BMDMs auf die T-Zellproliferation .....	74
Abb. 11: Einfluss von TLR-Agonisten auf polarisierte murine BMDMs .....	76
Abb. 12: Analyse der Genexpression von M1 bzw. M2-Markern bei murinen BMDMs nach IL-17 und IFN $\gamma$ -Stimulation mittels qRT-PCR .....	78
Abb. 13: Titration von M2-Makrophagen zur aGvHD-Therapie .....	80
Abb. 14: Einfluss von M2 BMDM-Applikation auf die Morbidität und die Mortalität von Mäusen nach aGvHD-Induktion .....	82
Abb. 15: Effekte von der IL-6-Neutralisierung auf die Morbidität und die Mortalität von WT- bzw. GR <sup>dim</sup> -Mäusen nach aGvHD-Induktion .....	85
Abb. 16: Effekte einer IL-6-Neutralisierung auf die Morbidität und die Mortalität von WT- bzw. GR <sup>dim</sup> -Mäusen nach aGvHD-Induktion.....	86
Abb. 17: Einfluss der GR-Defizienz in myeloiden Zellen auf die Morbidität und Mortalität von Mäusen nach aGvHD-Induktion .....	88
Abb. 18: Einfluss von GR-Defizienz in myeloiden Zellen nach aGvHD-Induktion auf Morbidität, Körpertemperatur und Blutglukosespiegel.....	89
Abb. 19: Einfluss von GR-Defizienz in T-Zellen nach aGvHD-Induktion auf die Morbidität .....	91
Abb. 20: Einfluss von GR-Defizienz in T-Zellen nach aGvHD-Induktion auf die Morbidität .....	91
Abb. 21: Expression von Zytokinen und zytotoxischen Molekülen durch <i>in vitro</i> stimulierte T-Zellen von WT- und GR <sup>lck</sup> -Mäusen .....	92
Abb. 22: Einfluss von GR-Defizienz von <i>in vivo</i> generierten alloreaktiven CD8 <sup>+</sup> -T-Lymphozyten (ZTL) auf deren Zytotoxizität .....	93

**A.3. Tabellenverzeichnis**

Tab. 1: Laborgeräte .....	34
Tab. 2: Verbrauchsmaterial .....	36
Tab. 3: Chemikalien und Reagenzien .....	38
Tab. 4: Puffer und Lösungen.....	40
Tab. 5: Medien .....	42
Tab. 6: Antikörper .....	42
Tab. 7: Oligonukleotide .....	43
Tab. 8: Kommerzielle Kits und Enzyme .....	44
Tab. 9: Software.....	45
Tab. 10: Komponenten für die c-DNA-Synthese .....	53
Tab. 11: Programm für die c-DNA-Synthese.....	53
Tab. 12: Komponenten einer PCR-Reaktion .....	54
Tab. 13: PCR-Programm .....	54
Tab. 14: Komponenten für die qRT-PCR .....	55
Tab. 15: qRT-PCR-Programm .....	55
Tab. 16: Bewertungsschema aGvHD.....	59