

**Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene
des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg
in Zusammenarbeit mit dem
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg
Leitung: Prof. Dr. Michael Lohoff**

Toll-like-Rezeptor Expression humaner dendritischer Zellen

**Differentielle Expression von Toll-Like-Rezeptoren durch humane
myeloide dendritische Zellen und Einfluss der Expression auf die
Funktion beispielhaft an den TLR2, 3, 4 und 9**

INAUGURAL-DISSERTATION

**zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
dem Fachbereich Humanmedizin der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt**

von

Georg Till Elof Fischborn aus Köln

Marburg, 2007

**Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin der Philippsuniversität
Marburg am
gedruckt mit Genehmigung des Fachbereichs**

Dekan: Prof. Dr. med. Maisch

Referent: Prof. Dr. med. Heeg

**Koreferent: PD Dr. Ritter
Prof. Dr. Hackstein**

meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	1
1. Einleitung	3
1.1 Hintergrund	3
1.2 Dendritische Zellen	4
1.2.1 Historisches	4
1.2.2 Rolle der DZ im Immunsystem.....	4
1.2.3 Ontogenie dendritischer Zellen	5
1.2.4 Subtypen dendritischer Zellen.....	6
1.2.5 Charakteristika dendritischer Zellen.....	6
1.2.6 Pathogenerkennung durch DZ.....	9
1.3 Faktoren in der Entwicklung dendritischer Zellen.....	9
1.3.1 Endogene Faktoren	9
1.3.2 Exogene Faktoren.....	10
1.3.3 Rezeptoren exogener Faktoren (PRR)	13
1.4 Interaktionen von PAMP und dendritischen Zellen	14
2. Fragestellung	15
3. Material und Methoden	16
3.1 Probanden, Medien, Material	16
3.1.1 Probanden	16
3.1.2 Medien und Puffer.....	16
3.1.3 Material	17
3.1.4 Primer und Sonden für PCR und quantitative PCR.....	18
3.2 Methoden	19
3.2.1 Gewinn mononukleärer Zellen	19
3.2.2 Magnetassoziierte Zellsortierung (MACS)	20
3.2.3 Anzucht dendritischer Zellen.....	22
3.2.4 Ausreifung dendritischer Zellen.....	25
3.2.5 Gemischte Leukozyten-Reaktion (GLR)	25
3.2.6 Analytische Durchflusszytometrie	27
3.2.7 Enzymgekoppeltes Immunoassay (ELISA).....	30
3.2.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR).....	31
3.2.9 Ergebnisdarstellung	35
3.2.10 Sequenzierung.....	35
4. Ergebnisse	36
4.1 Generierung dendritischer Zellen	36
4.1.1 Reifemarkerexpression während der Differenzierung dendritischer Zellen	36
4.1.2 Expression zellartypischer Oberflächenantigene	37
4.1.3 Zellmorphologie	39
4.1.4 Funktionalität dendritischer Zellen	42
4.1.5 Verunreinigende Zellpopulationen (plasmazytoide DZ und B- Zellen)	43
4.2 Eigenschaften dendritischer Zellen nach TLR Stimulation	44
4.2.1 OFA nach TLR9 Stimulation	44
4.2.2 OFA-Expression nach TLR2- und TLR4-Stimulation	51
4.3 Funktionalität verschieden stimulierter Zellen	56
4.3.1 Aufnahme FITC markierter Oligodesoxynukleotide.....	56
4.3.2 Phagozytosefähigkeit.....	58

4.3.3	IL-6 und IL-12 Produktion	59
4.4	PCR-Nachweis von TLR2, 3, 4 und 9	61
4.4.1	Konventionelle PCR.....	61
4.4.2	TaqMan®-PCR von TLR2, 3, 4 und 9.....	63
4.4.3	TLR2, 3, 4 und 9 auf verschiedenen Zelltypen (rtPCR)	65
4.4.4	TLR-Expression nach verschiedenen Stimuli (rtPCR)	68
4.5	Oberflächenexpression von TLR2 und 4.....	71
4.5.1	TLR2-Expression	71
4.5.1	TLR4-Expression	72
5.	Diskussion	73
6.	Zusammenfassung.....	83
7.	Literaturverzeichnis	85
	Abbildungsverzeichnis	96
	Tabellenverzeichnis	97
	Abkürzungsverzeichnis	98
	Curriculum Vitae.....	100
	Meine akademischen Lehrer	102
	Danksagung.....	103
	Ehrenwörtliche Erklärung.....	105
	Veröffentlichungen.....	106

1. Einleitung

1.1 Hintergrund

Das Immunsystem des Menschen und allgemein das von Vertebraten ist ein komplexes Netzwerk humoraler und zellulärer Komponenten. Es erhält die Individualstruktur, indem es körperfremde Substanzen (z.B. pathogene Mikroorganismen) und anomale Körperzellen kontinuierlich eliminiert. Zu seiner Beschreibung wird es in zwei Kompartimente aufgegliedert: angeborene und erworbene (adaptive) Immunität. Die erworbene Immunantwort wird durch T- und B-Lymphozyten vermittelt und ist sowohl durch klonale Selektion als auch durch die Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses charakterisiert.

Das angeborene Immunsystem wurde früher auch als unspezifisch bezeichnet, da es bei einer breiten Anzahl Erreger aktiv wird, obwohl es körpereigene und fremde Strukturen streng unterscheidet. Es stellt eine Form der Feindabwehr dar, die in den meisten vielzelligen Organismen gefunden wird und deren Reaktionen unter anderem durch die Pathogenerkennung mit Hilfe einer Vielzahl von Rezeptoren ausgelöst werden.

Diese Rezeptoren detektieren konservierte pathogenassoziierte molekulare Strukturen (engl.: pathogen associated molecular patterns, PAMPs) und vermitteln daraufhin die entsprechende unspezifische Immunantwort. Da diese PAMPs durch spezifische Rezeptoren unterschieden werden, wird ist die angeborene Immunität in der Lage, die konsekutive adaptive Immunantwort entsprechend zu initiieren und zu modulieren ^{12,93,104}. Wichtigstes morphologisches Substrat dieser Verzahnung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem sind die immunologischen Synapsen von dendritischen Zellen (DZ) und T-Zellen.

1.2 Dendritische Zellen

1.2.1 Historisches

Die Erstbeschreibung dendritischer Zellen (DZ) erfolgte 1868 durch Langerhans (1847-1888) als ein in der Epidermis liegender Zelltyp⁷². Heute werden die von ihm beschriebenen Zellen als eine Subpopulation oder eine definierte Entwicklungsstufe der dendritischen Zellen aufgefasst⁷⁷ und nach ihrem Entdecker als Langerhans'sche Zellen der Haut bezeichnet.

Da die Langerhans'schen Zellen lange Zeit die einzige gut zugängliche Population dendritischer Zellen waren, wurden viele Charakteristika dendritischer Zellen an ihnen erkannt und beschrieben¹²⁶. Heute sind sie aufgrund ihrer Lage und den neuen Erkenntnissen über ihre Aufgaben und Funktionen wieder ein wichtiger Gegenstand aktueller Forschung geworden.

Der Begriff „dendritische Zelle“ im engeren Sinne als eine Klasse professionell antigenpräsentierender Zellen wurde erst 1973 von Steinmann et al. geprägt, aufgrund der Morphologie aus peripheren Lymphorganen isolierten, murinen Zellen. Diese erinnerten ihn an bestimmte neuronale Zellen, so genannte „dendritische Zellen“. Die Bezeichnung bezog sich damals ausschließlich auf das Erscheinungsbild dieser murinen Zellen, nicht auf ihre Eigenschaften¹²³. Es waren nämlich die funktionellen Eigenschaften dieser neuen Zellgruppe, die sie so fundamental von allen anderen unterschieden: Dendritische Zellen sind als einziger Zelltyp dazu in der Lage, naive T-Zellen zu aktivieren¹²⁴.

1.2.2 Rolle der DZ im Immunsystem

Dendritische Zellen, T- und B-Zellen sind die maßgeblich an der adaptiven Immunantwort beteiligten Zellen. T- und B-Zellen fungieren als Haupteffektorzellen, deren Funktion aber von DZ beeinflusst wird^{9,124}. DZ erkennen angreifende Pathogene differentiell, aktivieren die adaptive Immunantwort und lenken sie in eine gezielte Richtung^{16,26,38}. Hierzu nehmen Vorläuferzellen von DZ in der Peripherie Antigene auf und prozessieren diese, wandern mit ihnen in die lymphatischen Organe, exprimieren kostimulatorische Moleküle, sezernieren Zytokine und initiieren so die primäre adaptive Immunantwort.

1.2.3 Ontogenie dendritischer Zellen

Das heutzutage gültige Modell der *in vivo* Entwicklung dendritischer Zellen beschreibt ihren Ursprung in den CD34⁺ hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks, von dem aus sie sich durch das Blut in die entsprechenden nicht-lymphatischen Organe ausbreiten. Hier entwickeln sie sich zur Gruppe der organständigen dendritischen Zellen, beispielsweise Langerhans'schen Zellen der Haut oder Monozyten. An diesem Punkt ihrer Entwicklung verfügen DZ über ausgeprägte Fähigkeiten zur Antigenaufnahme und -verarbeitung. Während der Prozessierung des Antigens bewegen sich die unreifen dendritischen Zellen dann zu höher gelegenen Lymphstationen (z.B. Lymphknoten). Auf dem Weg dorthin unterliegen sie dem Einfluss unspezifischer Entzündungsreize, z.B. in Form von Zytokinen (z.B.: TNF, GM-CSF, IL-4) oder Bakterienprodukten (z.B. LPS, LTA), was zu einem radikalen Wandel ihrer Fähigkeiten führt. Diese Entwicklung wird als „Reifungsprozess“ bezeichnet und umfasst den Verlust der Phagozytoseaktivität bei gleichzeitigem Gewinn der Fähigkeit zur Antigenpräsentation. Diese Entwicklung spiegelt sich auch an einer Veränderung der Oberflächenmolekülkonstellation wider, die nun eine starke Aktivierung von Memory- und naiven T-Zellen ermöglicht.

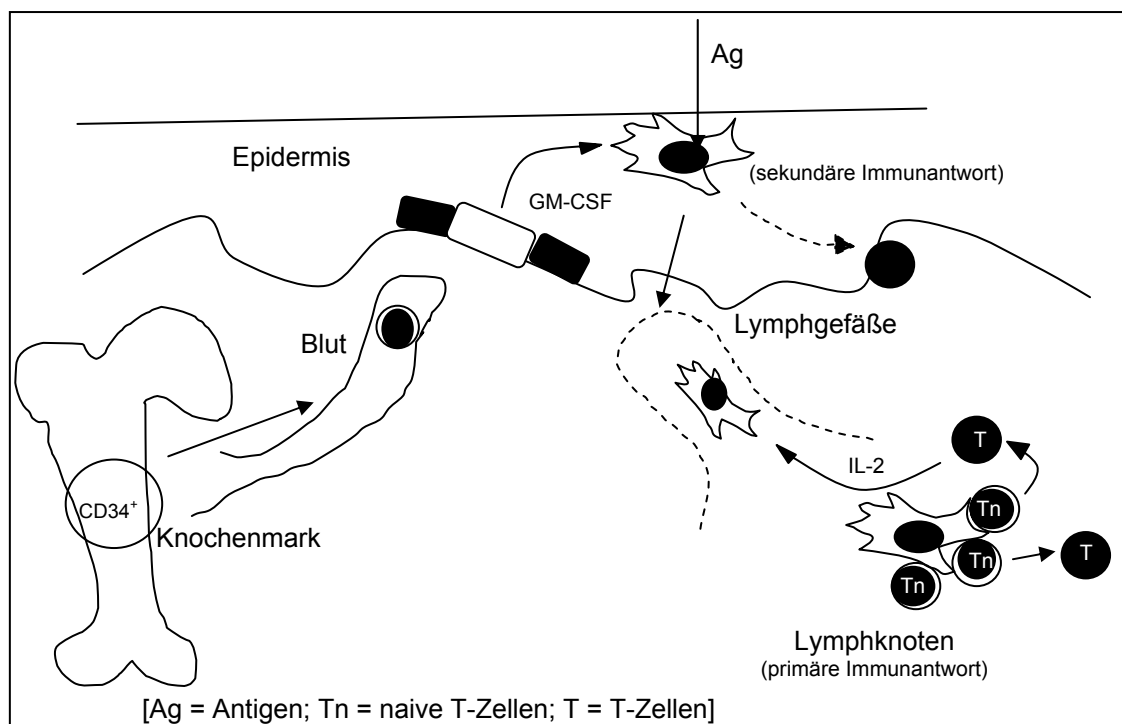


Abbildung 1: Schema der DZ Entwicklung (nach Bieber, T et al. ¹⁰¹)

Ein möglicher erneuter, der Ausreifung folgender, Verlust dieser Moleküle wird als Zustand der „überreifen“ dendritischen Zellen bezeichnet. Das darauf folgende Schicksal der dendritischen Zellen liegt zu einem Teil in einer persistierenden, die Immunantwort unterhaltenden Langlebigkeit^{60,94}, zum anderen höchstwahrscheinlich in einem apoptoseähnlichen Prozess mit kontrolliertem, selbständigen Abbau der Zellen.

1.2.4 Subtypen dendritischer Zellen

Obwohl alle dendritischen Vorläuferzellen von CD34⁺ Stammzellen abstammen, werden myeloide von lymphozytoiden (Synonym: plasmazytoide) dendritischen Zellen unterschieden. Lymphoide Vorläuferzellen sind durch die hohe Expression des Oberflächenantigens CD7 und die niedrige Expression von CD4 gekennzeichnet. Diese Zellen können sich zu B-, NK- und T-Zellen oder über eine weitere Vorläuferzelle (CD44, CD25 und c-kit-Ligand positiv) zu dendritischen Zellen entwickeln¹¹⁰. Diese lymphoiden dendritischen Zellen unterscheiden sich nicht nur in der Entwicklung von den in dieser Arbeit eingesetzten myeloiden, sondern auch in der Oberflächenmolekülexpression und im Spektrum der sezernierten Moleküle. Plasmazytoide DZ produzieren als Leitzytokin Interferon alpha (IFN α) und sind CD123⁺, CD11c⁻, myeloide hingegen produzieren IL-12 und sind CD11⁺¹²².

1.2.5 Charakteristika dendritischer Zellen

1.2.5.1 Oberflächenmoleküle dendritischer Zellen und ihrer Vorläufer

Humane dendritische Zellen exprimieren kein gleichzeitig spezifisches und sensitives Oberflächenmolekül. Stattdessen treten je nach Art ihrer Generierung und ihres Entwicklungsstandes wechselnd verschiedene Kombinationen von Oberflächenmolekülen auf.

Im Einklang mit der gängigen Literatur sind zur Identifikation des Subtypen der in dieser Arbeit verwandten dendritischen Zellen die Oberflächenantigene (OFA) CD1a, CD14, CD80, CD83 und CD86 nachzuweisen, sowie die HLA-ABC- und HLA-DR-Moleküle¹⁰⁶. Zum Nachweis von Verunreinigungen wurden die OFA BDCA2 und BDCA4 (plasmazytoide DZ) und CD19 (B-Zellen) verwandt.

Tabelle 1: OFA myeloider antigenpräsentierender Zellen

OFA	Charakteristika
CD14	<ul style="list-style-type: none"> - Glukosyl-Phosphatidyl-Inositol verankertes Molekül ohne intrazelluläre Domäne - LPS interagiert mit LPS-bindendem-Protein (LBP), das an den Monozyten-Makrophagen-spezifischen Oberflächenrezeptor CD14 bindet und diesen aktiviert - Alternativ kann LBP-LPS auch von löslichen CD14-Varianten erkannt werden, die nicht-myeloide Zellen aktivieren ^{39,91,117,130,132,145}
CD1a	<ul style="list-style-type: none"> - allgemein als Marker für myeloide dendritische Zellen anerkannt - das Fehlen von CD1a schließt das Vorliegen von DZ aber nicht aus - die CD1-Proteinfamilie ist mit den MHC Molekülen verwandt aber wird außerhalb der MHC-Genregion lokalisiert codiert - CD1-Proteine sind nicht polymorph (aber verschiedene Isotypen: a-e) - die Isotypen sind auf unterschiedlichen Zellarten verschiedener Spezies lokalisiert und nehmen im Rahmen der Antigenpräsentation unterschiedliche Aufgaben wahr ^{13,115}
CD83	<ul style="list-style-type: none"> - Marker für reife dendritische Zellen - vermutlich essentielle Rolle in der Generierung von T-Helferzellen ⁷³⁻⁷⁵

Tabelle 2: Aktivierungsmarker myeloider antigenpräsentierender Zellen

OFA	Charakteristika
CD40	<ul style="list-style-type: none"> - gehört zu der Familie der Tumor-Nekrose-Faktor-Rezeptoren (TNF-Rezeptoren) - erstmals auf B-Zellen beschrieben, auch auf Monozyten, Makrophagen und DZ nachgewiesen - bindet an den CD40-Liganden (CD154) aktivierter T-Zellen - die CD40-CD154-Interaktion induziert proinflammatorische Moleküle - beeinflusst die DZ-getriebene T-Zell-Polarisierung ^{1,9,76,86,107,121}
CD80 und CD86	<ul style="list-style-type: none"> - kostimulatorische Moleküle - B7.1 (CD80) und B7.2 (CD86) - B7 spielt eine wichtige Rolle in der T-Zell-Aktivierung - binden u.a. an CD28- und CTLA4-Moleküle auf der T-Zelle ^{1,45,76,107,121}
HLA	<ul style="list-style-type: none"> - HLA(human leucocyte antigen)-Moleküle gehören zu der Gruppe der MHC (major histocompatibility complex)-Moleküle - jedes Lebewesen kennzeichnet sich durch spezifische MHC-Moleküle - zwei Klassen: MHC-I (Mensch: HLA-A, B und C) und MHC-II (Mensch: HLA-DP, DQ und DR): <ul style="list-style-type: none"> - MHC-Klasse-I- Moleküle finden sich auf allen Zellen eines Organismus - MHC-Klasse-II-Moleküle finden sich auf der Oberfläche von Makrophagen, DZ, BZ und aktivierten TZ - auf DZ sind MHC-Moleküle 10 bis 100 mal stärker exprimiert als auf anderen Antigen-präsentierenden Zellen ^{21,55,56}

Tabelle 3: charakterisierende OFA anderer Zelltypen

OFA	Charakteristika
BDCA2	<ul style="list-style-type: none"> - Typ II C-Typ Lectin exprimiert auf plasmazytoiden DZ (pDZ) - internalisiert Antigene zur Präsentation für T-Zellen - Signale via BDCA2 spielen wahrscheinlich eine Rolle im Wechsel von IFNα-kontrollierten zu IL-12-kontrollierten Immunantworten - verhindert wahrscheinlich die Sekretion von IFN-α durch pDZ und fördert gleichzeitig die Produktion von IL-12 p70 ^{14,34-36}
BDCA4 / Neuropilin- 1 (NP-1)	<ul style="list-style-type: none"> - neuronaler Rezeptor für Axonwachstumsfaktoren der Klasse-3 Semaphorin-Subfamilie - auf endothelialen Zellen und Tumorzellen als Rezeptor für „vascular endothelial growth factor (VEGF-A)“ - in Blut- und Knochenmarkzellen BDCA-4/NP-1 ausschließlich auf pDZ ^{14,34-36}
CD19	<ul style="list-style-type: none"> - nur auf B-Zellen - im Komplex mit CD21 Signalregulator des B-Zell-Antigenrezeptors (BCR) - Rolle in der Entwicklung/ Unterdrückung von Autoimmunprozessen ^{32,42,114}

1.2.5.2 Zytokine

Zytokine sind biologische Mediatorstoffe, die interzelluläre Signale von Leukozyten vermitteln und auf verschiedene Zielzellen pleiotrop wirken.

1.2.5.2.1 Interleukin 6 (IL-6)

IL-6 wird von vielen verschiedenen Zellen, besonders von stimulierten Makrophagen, sezerniert und gehört zu den physiologischen Mediatoren der „Akuten-Phase-Reaktion“. IL-6 ist ein pleiotropes Zytokin mit einer großen Bandbreite biologischer Funktionen. Es differenziert B-Zellen zu immunglobulinsezernierenden Plasmazellen ⁵¹, es wirkt auf die T-Zell-Differenzierung, aktiviert Makrophagen und NK-Zellen und induziert die Produktion von Akut-Phase-Proteinen durch Hepatozyten ^{43,83,85,98}. Allerdings besitzt IL-6 auch antiinflammatorische Eigenschaften ⁶⁷.

1.2.5.2.2 Interleukin 12 (IL-12)

IL-12 wird hauptsächlich von DZ sezerniert. Es aktiviert NK-Zellen und induziert die Entwicklung von T_H1-Zellen und ist somit ein Schlüssel-Zytokin bei der Aktivierung der zellulären Immunität ^{22,37,65}.

1.2.6 Pathogenerkennung durch DZ

Reaktionen des angeborenen Immunsystems werden ausgelöst durch die Erkennung von Pathogenen, für die eine Vielzahl von Rezeptoren existieren. Einige dieser Rezeptoren erkennen konservierte molekulare Muster, die bestimmten Gruppen von Mikroorganismen gemein sind, so genannte PAMPs. Diese strukturspezifische Erkennung erlaubt dem angeborenen Immunsystem im Allgemeinen und den dendritischen Zellen im Speziellen, nicht nur die Anwesenheit eines Pathogens aufzuspüren, sondern auch den Typ des infizierenden Mikroorganismus einzuordnen und dadurch eine gezielte Immunantwort zu induzieren. Die PAMP erkennenden Rezeptoren werden in der Familie der pattern recognition receptors (PRR) zusammengefasst.

Diese Rezeptoren sind strukturell und funktionell sehr heterogene Proteine. Sie wirken unter anderem mittels membranständiger Signalübertragung, Phagozytose, Sekretion bestimmter Proteine oder durch intrazelluläre Erkennungsstrukturen⁸⁸. Als eine bahnbrechende Erkenntnis gilt die Entdeckung der Toll-like-Rezeptoren (TLR), da sie sehr differenziert mikrobielle Strukturen erkennen und dies in zelluläre Signale umwandeln^{3,127}.

1.3 Faktoren in der Entwicklung dendritischer Zellen

1.3.1 Endogene Faktoren

Unterschiedliche Faktoren und Kombinationen dieser Faktoren bewirken sowohl die Differenzierung in verschiedene Subtypen dendritischer Zellen als auch eine Regulation der unterschiedlichen Funktionen dieser Zellen. Im Folgenden soll genauer auf GM-CSF und IL-4 eingegangen werden, die entsprechend dem modifizierten Protokoll von Romani et al.¹¹² zur Generierung von DZ aus Monozyten in dieser Arbeit Verwendung fanden.

1.3.1.1 Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (GM-CSF)

GM-CSF ist ein Protein, das für Wachstum und Entwicklung der Vorläuferzellen von Granulozyten und Makrophagen aus Stammzellen verantwortlich ist. Es stimuliert Myeloblasten und Monoblasten und ist mit an der Differenzierung dieser beteiligt. GM-CSF wird von Fibroblasten, Zellen der glatten Muskulatur, bronchialen Epithelzellen und Monozyten sezerniert und bewirkt an den

Zielzellen (Monozyten, eosinophile Leukozyten, myeloide Vorläuferzellen) neben der Differenzierung auch Aktivierung, Proliferation und verlängertes Überleben, wirkt somit proinflammatorisch ¹⁴⁶.

1.3.1.2 Interleukin 4 (IL-4)

IL-4 ist ein Zytokin, welches unter anderem von Mastzellen, basophilen Granulozyten und T-Zellen produziert wird. Im Rahmen der T-Zell-Polarisierung ist es das Leit-Zytokin der T_H2-Antwort, polarisiert selbst Richtung T_H2 ¹²⁵ und supprimiert die T_H1-Bildung ⁴⁸. Es ist maßgeblich an der Etablierung und Aufrechterhaltung von Allergien beteiligt ³¹.

1.3.2 Exogene Faktoren

Neben den endogenen Faktoren beeinflussen exogene Faktoren wie pathogenassoziierte molekulare Muster (PAMPs) die Entwicklung dendritischer Zellen ⁵⁷. PAMP ist ein Sammelbegriff für molekulare Strukturen, die nur von mikrobiellen Pathogenen produziert werden und nicht von Wirtsorganismen. Ein Beispiel hierfür ist das Lipopolysaccharid (LPS) welches nur von Bakterien, nicht aber von eukaryoten Wirten hergestellt wird. Jedes PAMP repräsentiert jeweils eine große Gruppe von Mikroorganismen: Alle Bakterien besitzen Peptidoglykan und Lipoproteine und beide Moleküle sind essentiell für diese Organismen. Sie kennzeichnen ihre Träger als eindringende Pathogene und sind ein molekularer Stempel jeweils einer bestimmten Mikroorganismuskategorie. Zum Beispiel ist LPS das generelle Muster von gramnegativen Bakterien, LTA das von grampositiven, Lipoarabinomannan ist das Muster von Mykobakterien, Mannan das von Pilzen. Erkennung dieser PAMPs ist also nicht nur ein Zeichen der Anwesenheit eines Pathogens, sondern enthält zusätzlich die Information über den Typ des eingedrungenen Organismus. Durch diese Eigenschaft kann das angeborene Immunsystem den effizientesten Abwehrmechanismus wählen, der ihm gegen die jeweilige Pathogenklasse zur Verfügung steht.

Aufgrund dieser Erkennung wählen DZ eine Verteidigungsstrategie und leiten diese ein ^{12,16,33,38}. Wie und mit welchen Mustererkennungsrezeptoren humane DZ zwischen den verschiedenen Pathogenklassen zu differenzieren vermögen sowie die Effekte bestimmter Pathogene auf DZ soll in dieser Arbeit untersucht

werden. Die in der vorliegenden Arbeit verwendeten PAMPs LPS, LTA und CpG-ODN sollen im Folgenden näher betrachtet werden:

1.3.2.1 Lipopolysaccharid (LPS)

Lipopolysaccharide sind der essentielle Hauptbestandteil der äußersten Zellwandschicht gramnegativer Bakterien. Diese Zellwand besteht aus einer Doppelmembran: der inneren Phospholipidschicht mit anliegender mono- oder oligomolekularen Mureinschicht und der äußeren Membran aus Lipopolysacchariden.

Lipopolysaccharide sind spezifisch für das jeweilige Bakterium. Sie bestehen aus mehreren Regionen, die als O-Antigen, Kernpolysaccharid und Lipid A bezeichnet werden. Das Kernpolysaccharid ist mit seinem LPS-spezifischen Zucker lebenswichtig für den Mikroorganismus. Das hydrophobe Lipid A ist der Bestandteil, der pathologisch wirkt. Es ist fest in der Zellmembran verankert und wird erst nach dem Tod der Zelle freigesetzt. Für den menschlichen Organismus ist es ein extrem aktives exogenes Pyrogen und verursacht toxische Schäden. Hierüber aktiviert LPS Makrophagen und andere Zellen des Immunsystems. Innerhalb von wenigen Stunden werden von diesen Zytokine freigesetzt, die zum einen lokal wirken können, um typische Entzündungszeichen wie Rötung, Schwellung und Schmerz auszulösen, zum anderen systemisch wirken können und beispielsweise Fieber und Schüttelfrost auslösen^{19,40}.

1.3.2.2 Lipoteichonsäure (lipoteichoic acid = LTA)

Lipoteichonsäure ist der hauptimmunmodulatorische Bestandteil grampositiver Bakterien. Diese besitzen eine mehrschichtige Peptidoglykanschicht, die bis zu 40-mal dicker ist als die innere Mureinschicht gramnegativer Bakterien. Eine äußere Membran, die der Peptidoglykanschicht aufgelagert wäre, kommt bei grampositiven Bakterien nicht vor. Die Membran von grampositiven Bakterien besteht etwa zu 20 bis 30 % aus Teichonsäuren. Sie setzen sich aus langen Glycerol- und Ribitolmolekülen zu Ketten zusammen, die mit dem Peptidoglykangerüst kovalent verknüpft werden. Werden diese Ketten mit Lipiden verestert, entstehen Lipoteichonsäuren (LTA), die das gesamte Molekül in der Lipidschicht der Membran verankern. LTA wird während des

Zellwachstums freigesetzt ⁴⁰ und ist ein Molekül, das bei Kontakt des menschlichen Organismus mit grampositiven Bakterien Abwehrreaktionen hervorruft, indem es im menschlichen Organismus als exogenes Pyrogen wirkt, verbunden mit der Sekretion verschiedener Zytokine ¹¹⁶.

Immer wieder wurden kontroverse Ergebnisse bei den durch LTA induzierten Effekten gefunden, die auf Verunreinigungen des verwendeten LTA mit geringen Mengen von LPS zurückzuführen sind ⁹⁶. Unterschiedliche Extraktionsprotokolle waren Ursache dieser Verunreinigung, durch Zusatz von Butanol konnte hochreines LTA mit eigener biologischer Aktivität gewonnen werden ⁷¹. Dank der freundlichen Unterstützung von T. Hartung, Konstanz, wurde in dieser Arbeit ein solches, hochreines LTA verwendet.

1.3.2.3 CpG-Oligodesoxynukleotide

Auch bakterielle DNA wirkt als PAMP, wobei die essentielle Wirkkomponente ein Palindrom mit zentralem CpG-Motiv ist ^{87,134}. CpG kennzeichnet eine bestimmte Reihenfolge zweier Basen, nämlich Cytosin (C) und Guanin (G). Das „p“ stand ursprünglich für eine Phosphoester-Verknüpfung dieser beiden Basen, doch heute benutzt man sowohl Phosphoester- als auch Phosphothioat-Oligonukleotide.

Bakterielle DNA wird vom menschlichen Organismus als fremd erkannt, da sie sich von menschlicher DNA in zwei Punkten unterscheidet: Erstens kommt aufgrund der so genannten CG-Suppression das Dinukleotid CG im menschlichen Erbgut seltener vor (Bakterien: 1/16) ^{28,139}, zweitens findet man mehr als 95% dieser CG beim Menschen in methyliertem Zustand, während bakterielle CG-Motive vorwiegend unmethyliert sind ²⁴.

Diese CpG-Sequenz kann auch synthetisch hergestellt werden. Artifizielle CpG-ODN mit der Sequenz 5'-R-R-CpG-Y-Y-3' (R = Purin; Y = Pyrimidin) stimulieren ebenfalls Zellen des Immunsystems ^{24,28,139}. Diese CpG-ODN können unterschiedlich modifiziert werden. Die häufigste Modifikation ist die Einfügung eines Sulfat-Atoms, so dass ein Phosphothioat-Rückgrat entsteht (PTO-ODN). PTO-ODN sind stabiler und resistenter gegen Nukleasen. Eine weitere Modifikation gilt als herkömmlicher Phosphodiester, PO genannt. Heeg et al. beschrieben einen unabhängigen Effekt des PTO-Rückgrates ^{30,149}, weshalb in dieser Arbeit immer auch ODN mit PO-Rückgrat als Kontrollen herangezogen

wurden. Des Weiteren wurden ODN mit aufgehobenem CG-Motiv als Kontrollen eingesetzt (sogenannte GC-Kontrollen).

1.3.3 Rezeptoren exogener Faktoren (PRR)

Die Gruppe der PAMP einen drei Charakteristika: (i) Sie werden üblicherweise von Mikroorganismen und nicht von Wirtszellen exprimiert; (ii) sie variieren nur geringfügig innerhalb der Mikroorganismen einer Klasse; (iii) und ihre Expression ist essentiell für das Überleben der Mikroorganismen. Diese Eigenschaften machen PAMP zu idealen Erkennungsstrukturen des angeborenen Immunsystems und seiner Rezeptoren. Die Liste der Moleküle von Säugetieren die als Rezeptoren von PAMPs funktionieren wird von sezernierten PRRs (LPS bindendes Protein = LBP), über zellständige PRRs (CD14, Scavenger- oder Mannose-Rezeptoren) bis zu intrazellulären PRRs (dsRNA-aktivierte Protein-Kinase) immer größer. Von herausragender Bedeutung sind die Toll-Like-Rezeptoren ⁶⁶, die ursprünglich in Fruchtfliegen der Gattung *Drosophila* beschrieben wurden und somit in der Evolution hoch konservierte PRRs sind. Sie unterscheiden zwischen unterschiedlichen Pathogenen und induzieren daraufhin eine adäquate antimikrobielle Antwort des Immunsystems ⁴.

Die TLR-Familie besteht zurzeit aus 11 Mitgliedern, wobei fast jedem Rezeptor eine bestimmte Rolle in der Erkennung mikrobieller Strukturen zugewiesen werden konnte. Toll-like-Rezeptoren sind Transmembranproteine, die eine extrazelluläre Domäne, die aus Leuzin-reichen Wiederholungen besteht, und eine zytoplasmatische Domäne besitzen, die aufgrund ihrer Homologie zum IL-1-Rezeptor als TIR- (Toll/IL-1-Rezeptor) Domäne bezeichnet wird ^{4,141}. Nach Aktivierung von TLRs lagert sich das Adapterprotein MyD88 an ^{53,82,141}, und aktiviert den MAP-Kinasen-Signalweg und damit NF-κB-Transkriptionsfaktoren ^{17,18,25,89}.

Allerdings nutzen nicht alle Signaltransduktionswege der TLRs ausschließlich das Adapterprotein MyD88. Es existieren parallel auch MyD88-unabhängige Wege, die für einzelne TLRs spezifisch sein können und möglicherweise die unterschiedliche Immunbiologie verschiedener TLRs erklären ⁹⁹.

Als Teil des angeborenen Immunsystems induzieren TLRs nach Erkennung mikrobieller Komponenten die Expression zahlreicher Gene, die u.a. für

inflammatorische Zytokine, Chemokine und antimikrobielle Peptide kodieren und deren Funktion in einer schnellen Infektionsabwehr liegt ¹⁵. Doch TLRs spielen darüber hinaus eine zentrale Rolle bei der Verknüpfung des angeborenen mit dem erworbenen Immunsystem, indem sie die Aktivierung und Reifung dendritischer Zellen bewirken ^{4,141}.

Tabelle 4: Erkennung mikrobieller Komponenten durch TLR ^{3,127}

TLR	Spezifität
TLR2	Lipoteichonsäure (LTA), Peptidoglykan
TLR3	dsRNA
TLR4	Lipopolysaccharid (LPS), Hitzeschockproteine, Hyaluronsäurefragmente
TLR5	Bakterielles Flagellin
TLR9	Bakterielle DNA (CpG-ODN)

1.4 Interaktionen von PAMP und dendritischen Zellen

Obwohl durch Arbeiten in der Maus und in Zelllinien viel über die Erkennungsstrategien und Expressionsmuster von TLRs bekannt ist, ist die Datenlage für menschliche Zellen nicht abschließend geklärt. Insbesondere die differentielle Erkennung von PAMPs, wie in der Maus von Dalpke et al beschrieben ⁵ sind für humane Zellen noch unklar. Auch der Einfluss der dargestellten exogenen und endogenen Faktoren auf die TLR-Expression von DZ ist nach wie vor nur wenig untersucht.

2. Fragestellung

Aus dem Dargestellten ergaben sich folgende Fragestellungen:

Verändert sich die TLR-Expression während der Entwicklung von humanen Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen und wie beeinflussen PAMPs die weitere Entwicklung zur reifen dendritischen Zelle?

Unterscheiden sich diese Ergebnisse von den in murinen Systemen beschriebenen Sachverhalten und wenn ja wie?

Zur Beantwortung dieser Fragen wurden folgende Teilaspekte untersucht:

1. Expression von Toll-like-Rezeptoren während der Entwicklung von CD14⁺ Monozyten zu unreifen, myeloiden DZ
2. Beeinflussung der TLR-Expression myeloider DZ durch:
 - a) endogenen Stimuli (GM-CSF)
 - b) exogenen Stimuli (LTA , LPS und CpG-ODN)
3. Reaktion myeloider DZ auf Stimulation mit TLR-spezifischen Liganden (LPS, LTA und ODN) mit und ohne endogene Vorstimulation (GM-CSF) anhand der:
 - a) Oberflächenmolekülexpression
 - b) Stimulationsfähigkeit in der GLR
 - c) Produktion von IL-6 und IL-12

3. Material und Methoden

3.1 Probanden, Medien, Material

3.1.1 Probanden

3.1.1.1 Gewinn monozytärer Zellen

Es wurde bei gesunden, freiwilligen, erwachsenen Probanden in gängiger Venenpunktionstechnik mit Hilfe einer Einwegkanüle und einer Einwegspritze peripheres, venöses Blut entnommen.

3.1.1.2 Gewinn von Nabelschnurblut

Das Nabelschnurblut stammte von Neugeborenen die im Augusta-Krankenhaus und im Elisabeth-Hospital in Bochum geboren wurden. Ausschlusskriterien waren Frühgeburtlichkeit, Schwangerschaftskomplikationen, sowie eine bekannte Hepatitis- oder HIV-Infektion der Mutter; hierdurch sollten Unreife, Defekte und Voraktivierung bzw. Transformierung des Immunsystems ausgeschlossen werden. Je 42,5ml Blut wurden 7,5ml Citrat-Phosphat-Dextrose Puffer zugegeben. Der Puffer war je 50ml mit 1ml HEPES, 1ml Penicillin/Streptomycin und 1ml Amphotericin B, versetzt. Das Nabelschnurblut sowie daraus isolierte Zellen waren eine freundliche Überlassung von U. Schauer, Bochum.

3.1.2 Medien und Puffer

3.1.2.1 Click/ RPMI

Als Kulturmedium wurde Click/RPMI-Medium verwendet. Das Trockenpulver wurde gemäß der Angaben des Herstellers in 9,16l Aqua ad injectabilia gelöst und anschließend mit 100U/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 23,83g HEPES und 11,76g HCO₃⁻ versetzt. Nach der Einstellung des pH-Werts auf 7,2 erfolgte die Sterilfiltration (Whatman Filter, Porengröße 2µm) und Lagerung bei 4°C. Vor Gebrauch wurde das Medium mit folgenden Komponenten versetzt:

- L-Glutamin: 1% Endkonzentration im gebrauchsfertigen Medium

- inaktiviertes (56°C für 60min) fetales Kälberserum (FCS): 10% Endkonzentration in der Gebrauchslösung

3.1.2.2 PBS-Puffer (Phosphate buffered saline)

Instamed PBS (Seromed, Biochrom KG, Berlin) wurde in 9,16l Aqua dest. gelöst (pH-Wert 7,2). Nach Sterilfiltration (Whatman Filter, Porengröße 2µm) wurde das PBS bei 4°C gelagert.

3.1.3 Material

Tabelle 5: eingesetzte Materialien

Material	Firma, Ort
15ml Gefäß mit Schraubverschluss	Greiner Bio-one GmbH, Solingen
20ml Spritze	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
50ml Gefäß mit Schraubverschluss	Greiner Bio-one GmbH, Solingen
60ml Spritze	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
ABI PRISM® 7700	Applied Biosystems, Foster City, CA USA
Aceton	Merck, Darmstadt
Amphotericin B	Merck, Darmstadt
Annexin-V-Fluos	Boehringer, Mannheim
Antibiotika (Penicillin G, Streptomycin)	Biochrom AG, Berlin
Anti-CD14 ⁺ MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Aqua ad injectabilia	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Biocoll Separating Solution (Ficoll)	Biochrom AG, Berlin
Density 1.077	
BSA	Merck, Darmstadt
Citrat-Phosphat-Dextrose-Puffer	Biochrom AG, Berlin
Cycler, Mastercycler® Gradient	Eppendorf, Hamburg
Brefeldin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Brutschrank (CO ₂ -Inkubator)	Heraeus, Hanau
Chamberslides	NUNC, Rochester, NY USA
Click/RPMI Medium	Biochrom AG, Berlin
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
ELISA-Set (IL6 und IL12p40)	Becton Dickinson, Heidelberg
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
FACS	DAKO, Hamburg
FcR-Blocking-Reagent (human IgG)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
FCS (fetales Kälberserum)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
HEPES	Biochrom AG, Berlin
(CD45 RAO)	
High Pure RNA Isolation Kit	Roche, Mannheim
Kanüle, steril	Becton Dickinson, Heidelberg
Kodan farblos	Schülke & May, Norderstedt
Latex Beads	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Leukomax (hGM-CSF)	Novartis, Essex, UK
L-Glutamin	Biochrom KG, Berlin
Liquemin N 25000 (Heparin)	Roche, Mannheim
hochreines LPS	Freundliche Überlassung von H. Heine, Borstel
hochreine LTA	Freundliche Überlassung von T. Hartung, Konstanz
Mikroskop	Leica Mikrosysteme Vertrieb GmbH, Bensheim
MRX Microplate Reader	Dynatech, Denkendorf
Natriumazid	Merck, Darmstadt

Material	Firma, Ort
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt
PBS w/o Ca ²⁺ , Mg ²⁺ (human PBS)	Biochrom AG, Berlin
PCR Core Reagent Kits (PCR Kit)	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Phalloidin	Merck, Darmstadt
Pipetten, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen, verschiedene Größen	Eppendorf, Hamburg
Polystyrenrundbodenröhrchen, 12x55mm	Falcon, Sarstedt
qPCR MasterMix Plus Low ROX	Eurogentec Deutschland, Köln
rekombinantes humanes IL4	Tebu-Bio, Offenbach
Saponin	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Senkbodenlochplatte, 12 Löcher	Greiner Bio-one GmbH, Solingen
Senkbodenlochplatte, 24 Löcher	Greiner Bio-one GmbH, Solingen
Senkbodenlochplatte, 96 Löcher	Greiner Bio-one GmbH, Solingen
Sigma Fast™ OPD Tablet Set	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
TaqMan Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
TBE Puffer	Merck, Darmstadt
αTLR2, muriner antihumaner TLR2-Antikörper ^{41,79,97}	Freundliche Überlassung von T. Espevik, Trondheim, Norwegen
αTLR4, antihumaner TLR4-Antikörper von der Ziege ^{97,143}	Freundliche Überlassung von T. Espevik, Trondheim, Norwegen
TopCount NXT Microplate Reader	Fa. Packard, Dreieich
Triton-X	Merck, Darmstadt
Trypanblau	Sigma-Aldrich, Taufkirchen bei München
Venofix 21G	B.Braun Melsungen AG, Melsungen
Vortex	IKA Labortechnik, Staufen
Sterilfilter (Porengröße 0,2µm)	Sartorius, Göttingen
Zentrifuge groß	Kendro Laboratory Products, Osterode
Zentrifuge klein	Heraeus, Hanau

3.1.4 Primer und Sonden für PCR und quantitative PCR

Die verwendeten Primer und die Sonden lieferte Eurogentec. S.A, Seraing, Belgium.

Sequenzen:

hTLR2

Primer vorwärts: 5' CCT GTG TGA CTC TCC ATC CCA 3'

Primer rückwärts: 5' AAC AGA GCA CAG CAC ATG CC-3'

Sonde: 5' CCA GCA GGT TCA GGA TGT CCG CC-3'

hTLR3

Primer vorwärts: 5' TTG CAC GTG TGA AAG TAT TGC C-3'

Primer rückwärts: 5' GGA ACC CAT GAT AGT GAG GTG G-3'

Sonde: 5' ACG AGA CCC ATA CCA ACA TCC CTG AGC-3'

hTLR4

Primer vorwärts: 5' CCA GAG CCG CTG GTG TAT CT-3'

Primer rückwärts: 5' AGA AGG CGG TAC AGC TCC AC-3'

Sonde: 5' ATT GTC CTG CAG AAG GTG GAG AAG ACC C-3'

hTLR9

Primer vorwärts: 5' CCA CCC TGG AAG AGC TAA ACC-3'

Primer rückwärts: 5' GCC GTC CAT GAA TAG GAA GC-3'

Sonde: 5' CCC AAA TCC CTC ATA TCC CTG TCC CTC-3'

hGAPDH

Primer vorwärts: 5' ACG GAT TTG GTC GTA TTG GGC 3'

Primer rückwärts: 5' ACG GTG CCA TGG AAT TTG 3'

Sonde: 5' CCT GGT CAC CAG GGC TGC TTT TAA 3'

3.2 Methoden

3.2.1 Gewinn mononukleärer Zellen

Je 60ml Blut wurde den Probanden entnommen und zur Antikoagulation mit 5000IE Heparin versetzt. Je 10ml Blut wurden mit 20ml PBS in 50ml Gefäße mit Schraubverschluss gegeben und gemischt.

Das verdünnte Blut wurde mit 15ml Ficoll-Lösung (Biocoll Separating Solution) unterschichtet und 20 Minuten bei 485g ohne Bremse zentrifugiert. Die PBMC (Peripheral Blood Mononuclear Cells) der Interphase im entstandenen Gradienten wurden mit einer Pipette abgenommen und mit PBS zweimal zehn Minuten bei 350g und einmal 15min bei 300g in jeweils 50ml PBS gewaschen. Nach dem zweiten Waschschrift wurde eine Probe von 10 μ l entnommen, mit 90 μ l Trypanblau-Lösung gefärbt und die Zellzahl in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

3.2.2 Magnetassoziierte Zellsortierung (MACS)

3.2.2.1 Grundlagen der Magnet assoziierten Zellsortierung

Mit der Magnet-assoziierten Zellsortierung wurde eine Technik zur Zellisolation verwendet, mit der schon kleinste Zellmengen aus heterogenen Zellpopulationen isoliert werden konnten. Hierbei wurde zum einen die Lebensfähigkeit der Zellen kaum beeinträchtigt, zum anderen war die Reinheit der gewonnenen Fraktionen sehr hoch.

Die zu selektionierenden Zellen wurden mit spezifischen, paramagnetischen Antikörpern, so genannten MACS-MicroBeads, markiert und über eine Separierungssäule gegeben, die sich in einem permanenten Magnetfeld befand. Die magnetisch markierten Zellen blieben an der Säule haften, die unmarkierten nicht. Nach Entfernen der Separierungssäule aus dem Magnetfeld wurden die an ihr verbliebenen Zellen eluiert und in einem 15ml Röhrchen mit Schraubverschluss aufgefangen.

3.2.2.2 Super-Paramagnetische Antikörper (MACS-MicroBeads)

Es wurden sehr kleine (Durchmesser ca. 50nm), aus Eisenoxid und Polysacchariden bestehende, hochspezifische Antikörper verwendet, die sich in der Kultur zersetzten und weder Funktion noch Überlebensfähigkeit der Zellen beeinflussten. Die gegen CD14 eingesetzten MicroBeads waren mit superparamagnetischen Micro-Beads konjugierte Antikörper des Typs Maus-IgG2a.

3.2.2.3 Separierungseinheit

Die Separierungseinheit bildeten ein starker Dauermagnet an einem Ständer und eine Separierungssäule. Die Separierungssäule bestand aus einem ferromagnetischen Gerüst mit räumlich kleinen strukturellen Einheiten in einem Plastiktrichter. Alle verwendeten Separierungssäulen waren steril verpackte Einwegartikel. Aus dem Einbringen der Säule in das Magnetfeld des Dauermagneten resultieren sehr starke, räumlich sehr kleine Magnetfelder. In unmittelbarer Nähe der so konstruierten Säule wurden 10000-mal stärkere Felder erzeugt, als dies in üblichen geometrischen Strukturen möglich wäre. Nach Entfernen der Säule aus dem Magnetfeld erfolgte durch diese Struktur

eine schnelle Entmagnetisierung der Antikörper, so dass eine zügige Eluation der Zellen aus der Säule möglich war, ohne ihnen Schaden zuzufügen (Abb. 2).

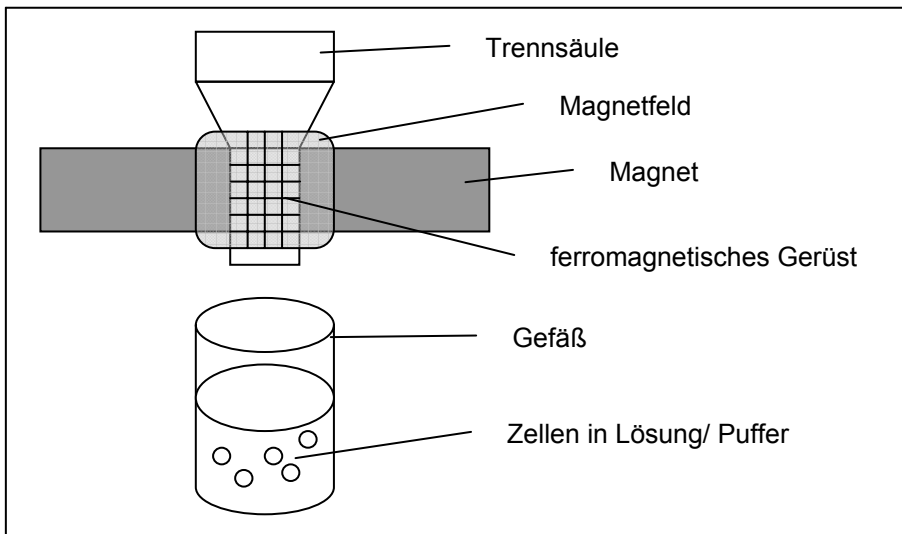


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Separierungseinheit

3.2.2.4 Selektionsstrategien

Die MACS bietet prinzipiell zwei Möglichkeiten zur Zellisolierung: entweder die positive oder die negative Selektion (Depletion). Bei der positiven Selektion wurden gegen bestimmte Oberflächenmoleküle der Zielzellen gerichtete Antikörper verwendet, so dass diese Zellen auf der Säule verblieben und nach Entnahme der Säule aus dem Magnetfeld eluiert und genutzt werden konnten. Bei der Depletion wurden alle Zellen außer den Zielzellen markiert und die Unmarkierten aufgefangen, nachdem sie die Säule passiert hatten.

3.2.2.5 Markierungsmöglichkeiten

Zellen konnten direkt, das heißt mit einem hochspezifischen, paramagnetisch gekoppelten Antikörper gegen die zu erkennende Antigenstruktur der Zielzelle, oder indirekt markiert werden. Bei der indirekten Markierung wurde zuerst ein primärer, ungekoppelter Antikörper gegen die zu erkennende Zielstruktur verwandt und danach in einem zweiten Schritt ein sekundärer, für die magnetassoziierte Zellsortierung ein paramagnetisch gekoppelter Antikörper eingesetzt, der gegen die Fc-Struktur des primären Antikörpers gerichtet war (Abb. 3).

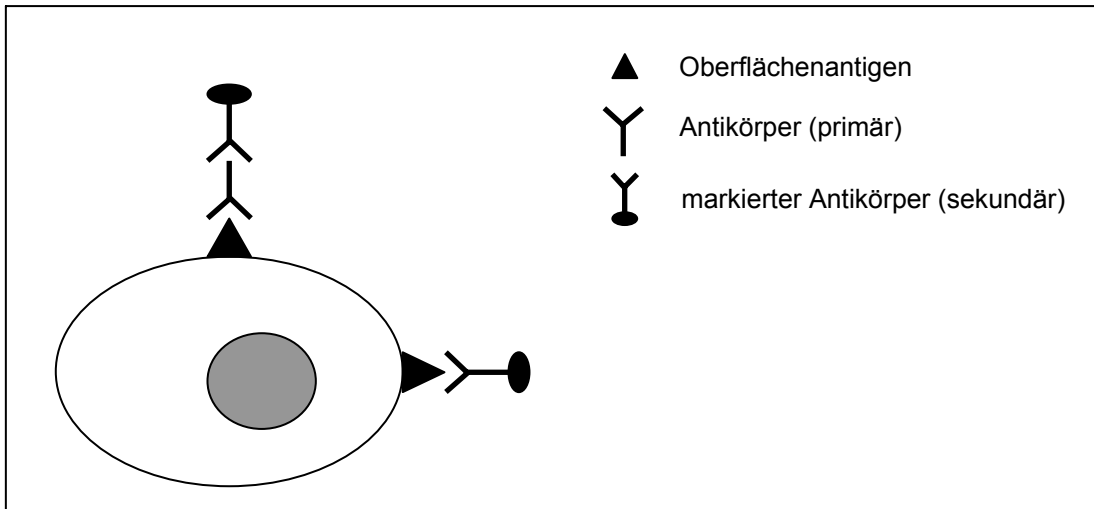


Abbildung 3: Schematische Darstellung der Markierungsmöglichkeiten von Zellen

direkte Markierung mit einem markierten Antikörper [Bsp.: paramagnetisch markiert (MACSMicroBeads) oder Fluoreszenz-markiert (Immunfluoreszenz; FACS)] spezifisch gegen ein bestimmtes Oberflächenantigen gerichtet; indirekte Markierung mit einem markierten Antikörper (s.o.) gegen die Fc-Struktur eines spezifischen Antikörpers gerichtet

3.2.2.6 Inkubation

Die Antikörpermengen wurden in Vorexperimenten ermittelt. Als Bezugskonzentration galten hierbei 1×10^7 Zellen pro 80 μ l Puffer, zu denen dann 20 μ l Antikörper gegeben wurden. Die Inkubationen erfolgten für 15min bei 4°C. Der jeweils günstigste Puffer (PBS bei Bedarf mit 0,1M EDTA-Zusatz) wurde in Vorexperimenten ermittelt. Zwischen den Inkubationen erfolgten entsprechende Waschschriffe bei 4°C 10min mit 350g.

3.2.2.7 Verwendung der Separierungseinheit

Die mit Antikörpern beladenen Zellen wurden in einer der Zellmenge und Separierungseinheit entsprechenden Puffermenge gemäß den Herstellerangaben auf die Separierungssäule gegeben und gespült, danach wurde die Säule aus dem Magnetfeld entnommen und die gebundenen Zellen mit PBS-Puffer unter Druck aus der Säule entfernt und in einem 15ml Röhrchen mit Schraubverschluss aufgefangen.

3.2.3 Anzucht dendritischer Zellen

Die Anzucht erfolgte gemäß einem modifizierten Protokoll nach Romani et al. ⁵⁹.

3.2.3.1 Isolation von CD14⁺ Monozyten aus PBMC

Die CD14⁺ Monozyten wurden mit direkter, positiver Magnet-assoziiertes-Zell-Sortierung (MACS) gewonnen. Die Oberflächenantigen (CD14) tragenden Zellen wurden mittels eines hochspezifischen, paramagnetisch-beladenen Antikörpers gegen CD14 aus der Menge der PBMC isoliert.

Dazu wurde das PBMC-Zellpellet (siehe oben) pro 1×10^7 Zellen in 80 μ l Puffer (PBS mit 0,1M EDTA) resuspendiert, dann 10 μ l humanes FcR-Blocking-Reagens und 20 μ l anti-humane CD14⁺ MACS MicroBeads zugegeben. Darauf folgte nach kurzem Mischen mittels eines Vortex eine Inkubation von 15min bei 4°C. Anschließend wurden die Zellen in 10ml Puffer (PBS 0,1 μ M EDTA) aufgenommen und 10min bei 350g gewaschen. Danach wurden die Zellen in 2ml eisgekühltem Puffer (PBS 0,1 μ M EDTA) resuspendiert und über eine sich im Magnetfeld befindliche Separierungssäule (SuperMACS-Säule) gegeben, die zuvor gekühlt und mit 2ml eisgekühltem Puffer (s.o.) gespült worden war. Die Säule wurde fünfmal mit 1ml eiskaltem Puffer (PBS mit 0,1 μ M EDTA) gespült, um die nicht gebundenen Zellen zu eluieren, dann wurde sie aus dem Magnetfeld entfernt. Jetzt gab man 5ml eiskaltes PBS auf die Säule und drückte dies mit einem Stempel durch. Durch den Druck wurden die Zellen von der Säule entfernt und in ein 15ml-Gefäß mit Schraubverschluss gespült. Nun wurde eine Zählprobe von 10 μ l entnommen und die Zellen bei 350g 10min gewaschen. Die Zellzahl wurde in einer Neubauer-Zählkammer ermittelt. Die Zellkonzentration wurde auf 1×10^6 Zellen/ml Kulturmedium eingestellt. Die Reinheit der Sortierungen (Anteil der CD14⁺ Zellen) wurde durchflusszytometrisch vor und nach der Sortierung bestimmt.

3.2.3.2 Zellkultur

Die CD14⁺ Zellen wurden in einer Zellmenge von 1×10^6 Zellen in 1ml Kulturmedium in eine Kulturplatte mit 24 Senkbodenlöchern eingebracht und in einem mit 5% CO₂ begasten Brutschrank bei 37°C kultiviert. Zu Kulturbeginn wurden 10ng/ml GM-CSF und 500U/ml IL-4 zugesetzt.

3.2.3.3 Visuelle Nachweise

Die durchlichtmikroskopische Darstellung der angezüchteten Zellen wurde fotografisch festgehalten. Dies geschah mittels einer an ein Mikroskop

angeschlossenen digitalen Photokamera, einem Computer und spezieller Software. Die Zellen wurden in Kultur ungefärbt, in gängiger Giemsa-Technik oder mit Phalloidin gefärbt fotografiert.

3.2.3.4 Phalloidin-Färbung

Phalloidin stellt das Aktin des Zytoskeletts der Zellen fluoreszierend dar. Hierzu wurden die in Chamberslides kultivierten Zellen zweifach mit 37°C warmem PBS gewaschen, dann mit 4%PFA/PBS über 10min fixiert und dreimal 5min gewaschen. Anschließend wurden die Zellen 5min mit -20°C kaltem Aceton behandelt, erneut dreimal 5min gewaschen und mit 1%BSA/PBS 30min bei Raumtemperatur inkubiert. Hierauf folgte eine weitere Inkubation von 30min mit Phalloidin (1:100 in PBS verdünnt) bei Raumtemperatur im Dunkeln. Die Objektträger wurden zweimal in PBS und zweimal in 0,1% Triton-x 100/PBS gewaschen. Zum Abschluss der Färbung wurden sie mit destilliertem Wasser abgewaschen und fotografiert.

3.2.3.5 Durchflusszytometrische Darstellung der Oberflächenantigene

Die dargestellten Oberflächenantigene (OFA) waren charakteristische Marker für die Reife und Differenzierung der Zellen.

Aus den PBMC und den frisch isolierten CD14⁺ Monozyten wurden jeweils ca. 1-2 x 10⁵ Zellen entnommen und den Herstellerangaben folgend mit der jeweiligen Konzentration des Antikörpers inkubiert. Anschließend wurde der Überschuss der nicht gebundenen Antikörper mit je 1-2ml PBS mit Natriumazid für 10min bei 350g ausgewaschen. Für die durchflusszytometrische Messung wurden die Zellen in 1,7ml PBS mit Natriumazid aufgenommen.

Die Antikörper waren entweder mit dem Fluoreszenzfarbstoffen FITC oder PE markiert, folgende fanden bei den Messungen Verwendung:

- zur Messung der CD14⁺ Reinheit: anti-CD14
- zur Messung der Zelldifferenzierung: anti-CD1a, anti-CD83, anti-CD40, anti-CD80, anti-CD86, anti-HLA-ABC, anti-HLA-DR
- zur Messung eventuell kontaminierender Zellen: anti-BDCA-2, anti-BDCA-3, anti-BDCA-4, anti CD19

3.2.4 Ausreifung dendritischer Zellen

An Tag 6 der wie oben beschrieben angesetzten Kultur wurden die noch unreifen dendritischen Zellen weiter ausgereift. Dies geschah neben humanem GM-CSF mit LPS, LTA und verschiedenen ODN (CpG/GpC/u.a.).

Die verwendeten ODNs wurden von TIB Molbiol, Berlin, und MWG-Biotech AG, Ebersberg, in einem Synthesemaßstab von 2µmol bezogen. Das jeweilige Lyophilisat wurde in 1ml sterilem Aqua dest. für mindestens 30min unter Schütteln bei Raumtemperatur gelöst. Durch weitere Zugabe von Aqua dest. wurde eine 250µM Lösung hergestellt, die nach Sterilfiltration zu je 500µl aliquotiert und bei -20°C gelagert wurden. Für Versuche aufgetaute ODNs wurden bis zu 4 Wochen bei 4°C aufbewahrt.

Sequenzen:

2006 PTO:

5` TsCsGs TsCsGs TsTsTs TsGsTs CsGsTs TsTsTs GsTsCs GsTsTs

Es handelt sich hier um ein Oligonukleotid mit vollständiger Phosphothioat-Modifikation (PTO, markiert durch „s“) und einem immunstimulatorischen CpG-Motiv.

2006K PTO:

5` TsGsCs TsGsCs TsTsTs TsGsTs GsCsTs TsTsTs GsTsGs CsTsTs

Dieses Oligonukleotid ist ebenfalls versehen mit einer vollständigen Phosphothioat-Modifikation und besitzt kein immunstimulatorisches Motiv.

2006 PO:

5` TCG TCG TTT TGT CGT TTT GTC GTT

Dieses Oligonukleotid hat keine Phosphothioat-Modifikation. Das immunstimulatorische Motiv ist eine CpG-Sequenz.

3.2.5 Gemischte Leukozyten-Reaktion (GLR)

3.2.5.1 Grundlagen der GLR

Mit der gemischten Leukozyten-Reaktion wurde der Einfluss bestimmter Zellgruppen (als Stimulatorzellen) auf andere Zellgruppen (Responderzellen)

überprüft. Diese Stimulatorzellen waren antigenpräsentierende Zellen und regten die Responderzellen zur Proliferation als Maß für die Zellaktivierung an.

3.2.5.2 Zellen in der GLR

3.2.5.2.1 Gewinn der gezüchteten Zellen

Zum Lösen der adhärenierten Zellen nach Kultur wurden die Zellkulturplatten 15min auf Eis inkubiert, dann die Zellen unter intensivem Resuspendieren in ein Gefäß mit Schraubverschluss überführt. Die Zellzahl wurde nach Zentrifugation (10min bei 350g) in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Arbeitsschritte und Substanzen waren steril.

3.2.5.2.2 Gewinn von Monozyten

Die Monozyten wurden wie oben beschrieben gewonnen.

3.2.5.2.3 Gewinn von CD45RA⁺ Zellen (naiven T-Zellen)

Naive T-Zellen wurden aus mononukleären Nabelschnurzellen mittels Depletion gewonnen. CD45RA⁺ Zellen wurden mit einer Mischung folgender MACS Antikörper gereinigt: CD8, CD34, CD45RO, CD56, HLA-DR und Glycophorin A (alle Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach). Diese wurden 15min bei 4°C inkubiert und dann 10min bei 4°C und 350g gewaschen. Naive T-Zellen wurden mittels einer LS Säule (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach) und einem MiniMACS Gerät getrennt. Die Reinheit der naiven T-Zellen war in allen Experimenten höher als 99%.

3.2.5.3 Ansatz einer Gemischten Leukozyten Reaktion (GLR)

Die Responder- und Stimulatorzellen jeweils unterschiedlicher Spender wurden in verschiedenen Mengen miteinander in einem Brutschrank mit 5% CO₂ für definierte Zeiträume gemeinsam kultiviert.

3.2.5.4 Zugabe exogener Stimulantien in die GLR

Zur Darstellung unterschiedlicher Effekte verschiedener bakterieller Stimuli wurden unreife DZ am sechsten Kulturtag mit LPS, LTA und CpG-ODN stimuliert. Zum Vergleich der Stimulationskapazitäten wurden unstimulierte und CD14⁺-Monozyten (24h nach Isolation) in den Ansätzen mitgeführt.

3.2.5.5 Messung der (Effektor-) Zellproliferation

Zur Untersuchung des Proliferationsverhaltens wurden nach 48, 72 und 96 Stunden die Zellen mit $10\mu\text{Ci/ml}$ ^3H -Thymidin (37mBq , entsprechen 1mCi/ml) für 18h gepulst. Über ein Zellerntegerät wurden die zellulären Bestandteile gewonnen, in einem Beta-Counter analysiert und die Ergebnisse in radioaktiven Zerfällen pro Minute (counts per minute) dargestellt.

3.2.6 Analytische Durchflusszytometrie

3.2.6.1 Aufbau eines Durchflusszytometers

Das Prinzip der Durchflusszytometrie war die simultane Messung verschiedener Eigenschaften einzelner Zellen, die hintereinander in einem Flüssigkeitsstrom angeordnet untersucht wurden. Dabei erfolgte die Analyse von Zellen über die gleichzeitige Bestimmung ihrer Fluoreszenzintensität und ihres Streulichtes.

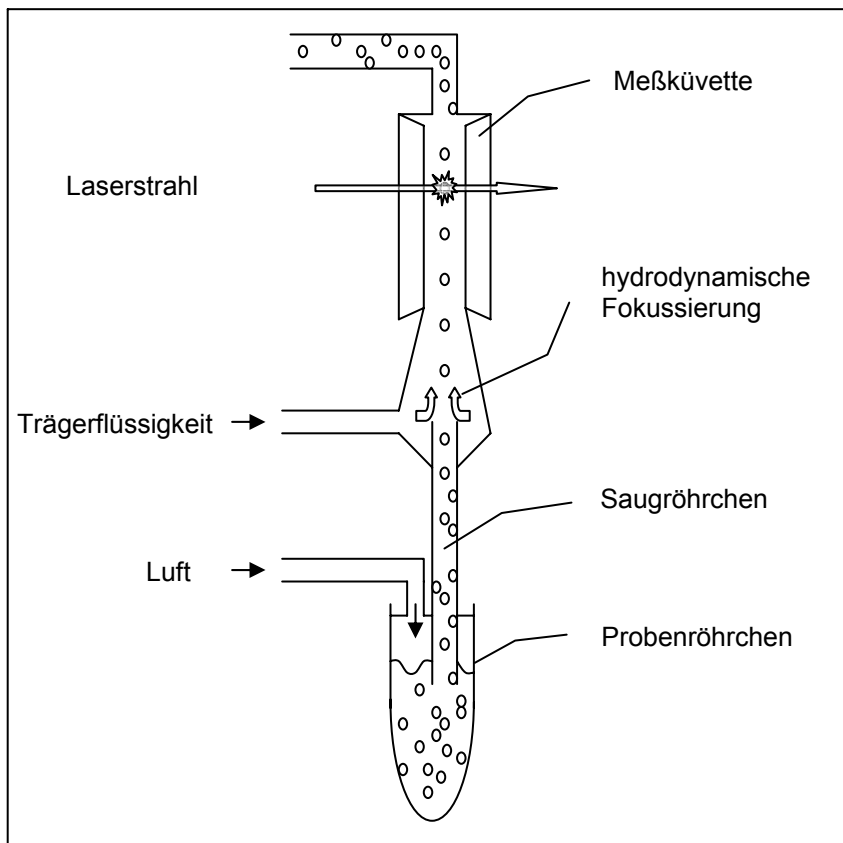


Abbildung 4: Prinzip der Durchflusszytometrie

Zur Analyse wurde die in einem Reagenzröhrchen vorgegebene Zellsuspension über eine Stahlkapillare durch Ansaugen in die aus Quarzglas bestehende

Messküvette eingeführt. Die Zellen passierten, von einem Hüllstrom umgeben, den Analysepunkt. Der Hüllstrom diente dazu, den Probestrom im Zentrum der Messküvette zu stabilisieren und so zu verengen, dass die Zellen hintereinander, einzeln, zum Analysepunkt gelangten (Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung).

3.2.6.2 Messung der Lichtstreuung

Die Lichtstreuung wurde definiert als physikalischer Prozess, bei dem die Zelle mit dem einfallenden Licht interagiert. Hierbei wurde nur die Richtung, nicht die Wellenlänge des Lichtes verändert. Zur Lichtstreuung trugen folgende Zelleigenschaften bei: Zellgröße, Zellmembran, Zellkern und intrazelluläre granuläre Bestandteile. Das Licht wurde nicht in alle Richtung gleichmäßig gestreut; der größte Anteil fiel in die Vorwärtsrichtung (d.h. entlang des einfallenden Lichtstrahls) und war das hauptsächliche Maß für die Zellgröße (Vorwärtsstreulicht). Das im rechten Winkel zum einfallenden Lichtstrahl gestreute Licht hing von der Zelldichte und der Granularität, jedoch nur zum geringen Teil von der Zellgröße ab (Rechtwinkelstreulicht).

3.2.6.3 Messung der Fluoreszenz

Mittels eines 15MW Argon-Lasers wurden Fluoreszenzfarbstoffe zur Emission von Lichtquanten bestimmter Wellenlänge angeregt. Diese Anregung geschah durch Licht mit der Wellenlänge 488nm. Dabei konnten mehrere Farbstoffe mit ähnlichem Absorptionsspektrum und unterschiedlichen Emissionsspektren verwendet werden.

3.2.6.4 Signalverarbeitung

Passierte eine Zelle den Analysepunkt, wurden Signale vom Vorwärtsstreulicht, Rechtwinkelstreulicht und den Fluoreszenzen gemessen. Dies geschah durch eine Kombination von Signalmessung und -verstärkung. Dieses analoge Signal wurde dann in ein computergerechtes Digitalsignal verwandelt.

3.2.6.5 Datenauswertung

Die Daten wurden mit der Software FlowMax II, entweder als Histogramm oder als korrelierte Zweiparameterdarstellung (DotPlot) aufgetragen.

Im Histogramm stellte dabei die vertikale Achse die Intensität des Signals dar, die horizontale Achse die Anzahl der Zellen. In der korrelierten Zweiparameterdarstellung (DotPlot) wurde ein Signalpaar gleichzeitig abgebildet. Die beiden Intensitätenachsen wurden gegeneinander aufgetragen. In die so gebildete Matrix wurde jeweils ein Punkt eingezeichnet, an dem sich die Intensitätswerte der beiden Parameter einer gegebenen Zelle schneiden.

3.2.6.6 Autofluoreszenz und Qualitätskontrolle

Viele Zellen zeigten bei der Anregung mit 488nm auch ohne Anfärbung eine gewisse Fluoreszenz. Dieses als Autofluoreszenz bezeichnete Signal war Fluoreszenzlicht, welches ungefärbte Zellen aufgrund ihrer eigenen chemischen Zusammensetzung emittierten.

Zur Qualitätssicherung wurde zu einer Probe unbehandelter Zellen noch ein unspezifischer Antikörper gleicher Klasse, Subklasse und Fluoreszenzfarbstoff wie der Meßfarbstoffantikörper gegeben, nach entsprechender Inkubation diese Kontrolle gemessen und als Negativwert festgelegt. Messungen, deren Intensität dann über den Werten der Kontrollmessung lag, galten als positiv.

3.2.6.7 Färbung von Oberflächenantigenen

Die Differenzierung der mononukleären Zellen bzw. der angezüchteten Zellen erfolgte durchflusszytometrisch anhand der Streulichteigenschaften und mit Hilfe monoklonaler, gegen Leukozytenoberflächenantigene gerichteter Antikörper. Die Antikörper waren direkt an die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC) oder Phycoerythrin (PE) gekoppelt.

Die Markierungsmöglichkeiten (direkt/ indirekt) wurden oben beschrieben.

3.2.6.8 Uptake-Messung

Die zu untersuchenden Zellen wurden wie oben beschrieben geerntet und auf zwei Kulturplatten mit 24 Senkbodenlöchern verteilt. Je 5×10^5 Zellen wurden auf 1ml Click/RPMI Medium gegeben. Die unstimulierten Kontrollen wurden verdoppelt. Die Platten wurden für 20min je eine auf Eis (4°C) und eine im Brutschrank (37°C) vortemperiert. Dann wurden die FITC-markierten Oligonukleotide zugegeben und die Platten für 90min inkubiert. Anschließend erntete man die Zellen. Die Zellen wurden zweimal je 10min bei 350g und 4°C

in 2ml kaltem PBS gewaschen, in 1,7ml kaltem PBS resuspendiert und gemessen.

Die Zellen nahmen bei 4°C die Oligonukleotide aufgrund der niedrigen Temperatur nicht aktiv auf, durchflusszytometrisch positive Zellen leuchteten somit nur durch passiv angelagerte ODN. Im Gegensatz dazu war bei 37°C eine aktive Aufnahme möglich. Die angegebenen Werte ergaben sich aus den Differenzen des MFI [Δ 37°C-4°C].

3.2.6.9 Phagozytose

Analog zur Messung des Uptakes wurde die Phagozytosefähigkeit bestimmt, anstatt FITC-markierter Oligonukleotide wurden Latex-Beads (Verdünnung 1:100) den Zellen zugegeben.

3.2.7 Enzymgekoppeltes Immunoassay (ELISA)

Mit Hilfe des „enzyme linked immunosorbent assay“(ELISA) ließen sich Zytokine in Lösungen messen (hier IL-6 und IL-12p40).

Die eingesetzte ELISA-Technik beruhte auf dem Prinzip einer so genannten „Sandwich-Technik“ (capture-ELISA). Hierzu wurde zunächst ein Antikörper, gegen das zu testende Zytokin an eine Polystyroloberfläche gekoppelt. Dieser interagiert mit dem zu quantifizierenden Zytokin. Ein zweiter, biotinylierter Antikörper band an ein Epitop des Zytokins. Aufgrund der sehr hohen Bindungsaffinität (10^{-15} M) von Biotin zu Avidin und Streptavidin konnte die im nächsten Schritt zugegebene Streptavidin-gekoppelte Peroxidase an den Sandwich-Komplex binden. Bei Zugabe des Substrates (1,2-o-Phenylamidin-Dihydrochlorid; OPD) entstand durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase ein gelber Farbstoff. Die Menge dieses Farbstoffes war direkt proportional zur Konzentration des gebundenen Zytokins aus der Probe. Mit Hilfe eines mitgeführten Standards konnte die Konzentration photometrisch erfasst werden. Zur Gewinnung zytokinhaltiger Überstände wurden die Zellkulturplatten für 5min bei 200g (1500rpm) zentrifugiert, der zellfreie Überstand entnommen und bis zur Messung tiefgefroren (-20°C).

Es wurden kommerzielle Testsysteme der Firma Becton Dickinson, Heidelberg, verwendet: IL-6-OptEIA™-Set und IL-12-p40-OptEIA™-Set. Die Durchführung der Analysen erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Bei allen

Zytokinanalysen wurden Doppelbestimmungen aus einem Doppelversuchsansatz durchgeführt. Die optischen Dichten wurden mit einem Mikrotiterplatten-Photometer bei 490nm Messfilter gegen 630nm Referenzfilter gemessen. Unter Verwendung einer Standardreihe wurden Zytokinkonzentrationen mit Hilfe eines Auswertungsprogrammes (Revelation Software, Dynatech, Denkendorf) berechnet.

3.2.8 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

3.2.8.1 RNA-Isolierung

Nach den entsprechenden Stimulations- oder Kulturzeiträumen wurden 0,5 bis 1×10^6 Zellen 5min bei 300g zentrifugiert und die Überstände abgesaugt. Die Aufarbeitung erfolgte mit dem High Pure RNA Isolation Kit von Roche, Mannheim, entsprechend dem Herstellerprotokoll.

Die so gewonnene RNA wurde entweder bei -70°C gelagert oder direkt zur cDNA-Synthese eingesetzt.

3.2.8.2 cDNA-Synthese

Für die cDNA-Synthese wurde das RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Roth, verwendet. Die Synthese der cDNA erfolgte entsprechend den Angaben des Herstellers unter Verwendung von Oligo(dT)₁₈-Primer, wobei ausschließlich mRNA in cDNA umgeschrieben wurde. Die RNA wurde photometrisch vermessen und 1,5µg Gesamt-RNA in die Synthesereaktion eingesetzt. Die Synthese erfolgte in einem Mastercycler[®]Gradient (Eppendorf, Köln).

3.2.8.3 Prinzip der PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (engl.: polymerase chain reaction = PCR) erlaubte es, beliebige DNA-Abschnitte ohne Verwendung von Restriktionsenzymen, Vektoren und Wirtszellen zu vervielfältigen (zu amplifizieren). Man benötigte dazu zwei Oligonukleotide (Primer), die mit jeweils einem der Stränge auf beiden Seiten des zu amplifizierenden DNA-Abschnitts hybridisierten, ausreichende Mengen der Desoxynukleosid-Triphosphate Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin sowie eine spezielle hitzebeständige

DNA-Polymerase. Die Primer wurden durch chemische Synthese hergestellt, die Polymerase wurde aus thermostabilen Bakterien gewonnen.

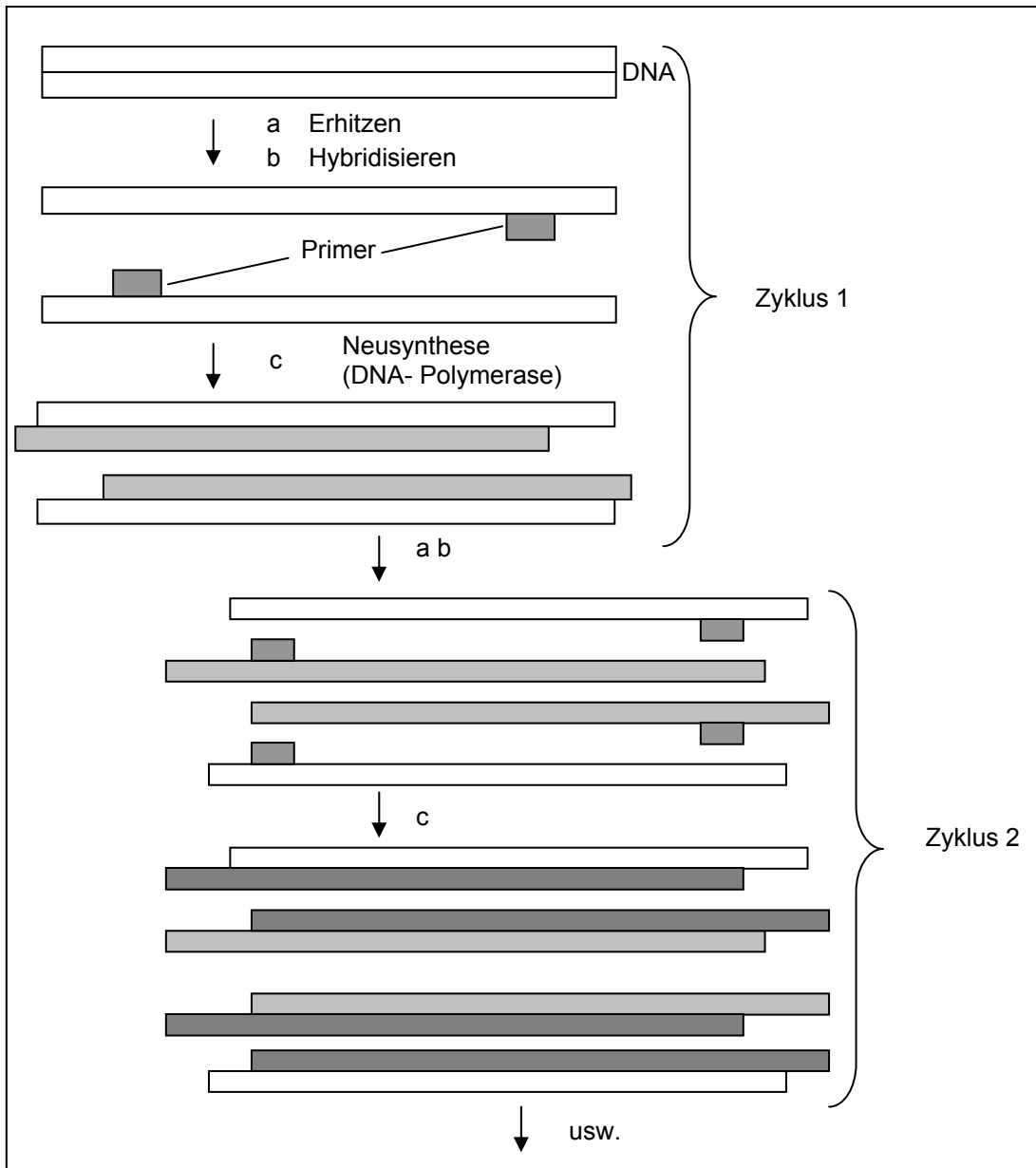


Abbildung 5: Prinzip der PCR

in Zyklus 1 entstehende Syntheseprodukte hellgrau, in Zyklus 2 dunkelgrau hinterlegt

Zunächst wurde der Ansatz auf etwa 90°C erhitzt, um die DNA-Doppelhelix in Einzelstränge zu zerlegen (a). Dann ließ man das Ganze abkühlen, um die Hybridisierung der Primer zu ermöglichen (b). Von diesen ausgehend wurden nun in beide Richtungen komplementäre DNA-Stränge neu synthetisiert (c). Dieser Zyklus wurde mit derselben Reaktionsmischung mehrfach wiederholt. Schon nach dem dritten Zyklus bildeten sich Doppelstränge, deren Länge dem Abstand der Primer entsprach. Ihr Anteil erhöhte sich mit jedem Zyklus etwa auf

das Doppelte, bis schließlich alle neu synthetisierten Abschnitte die richtige Länge hatten. Das Erhitzen und Abkühlen wurde in computergesteuerten Thermocyclern durchgeführt.

3.2.8.4 Konventionelle PCR

Für die konventionelle PCR wurde ein Kit (PCR Core Reagent Kits) verwendet und nach den Angaben des Herstellers (PE Applied Biosystems, Weiterstadt) angewendet. Die Überprüfung der PCR-Amplifikation erfolgte durch Elektrophorese in zeiprozentigem Agarosegel mit Zusatz von Ethidiumbromid. Dann wurden jeweils 8µl des PCR-Produkts mit 2µl Ladepuffer aufgetragen, in 1x TBE-Puffer bei 60V eine Stunde aufgetrennt und anschließend bei UV-Durchleuchtung fotografiert.

3.2.8.5 Quantitative PCR

3.2.8.5.1 Prinzip der realtime PCR (TaqMan®)

Die Real-Time PCR war eine Methode, die unter anderem für Genexpressionsanalysen und DNA-Quantifizierung genutzt werden konnte. Zur Detektion der Expression von TLR-Genen wurde ein ABI Prism 7700 PCR-Gerät (TaqMan®, PE Applied Biosystems, Weiterstadt) verwendet.

Diese Technologie nutzte die 5'-3'-Exonuklease Aktivität der Taq-Polymerase aus, um eine direkte Detektion der PCR-Produkte durch die Freisetzung eines fluoreszierenden Signalmoleküls oder Reporters während der PCR zu ermöglichen. Dazu wurde eine zweifach markierte fluorogene Oligonukleotid-Sonde verwendet. Diese Sonde bestand aus einem Oligonukleotid, das mit zwei verschiedenen fluoreszierenden Farbstoffen markiert war. Am 5'-Ende trug die Sonde den Signalfarbstoff oder Reporter (FAM, 6-Carboxyfluorescein) und am 3'-Ende den „Unterdrücker-Farbstoff“ oder Quencher (TAMRA, 6-Carboxytetramethylrhodamin). Wurde die Sonde bei einer spezifischen Wellenlänge (488nm) angeregt, so wurde die Fluoreszenz-Emission des Reporters durch den Quencher unterdrückt. Die Sequenz der Sonde war zu einer internen Zielsequenz des Amplikons komplementär. Während der PCR hybridisierten Primer und Sonde am Matrizenstrang. In der Extensionsphase traf die Taq-Polymerase auf die Sonde und zerschnitt diese durch ihre Exonukleasefunktion. Dadurch wurde die Verbindung des Reporters zum

Quencher unterbrochen und somit die Fluoreszenzunterdrückung aufgehoben (siehe Abbildung 6: Prinzip der TaqMan[®]-PCR).

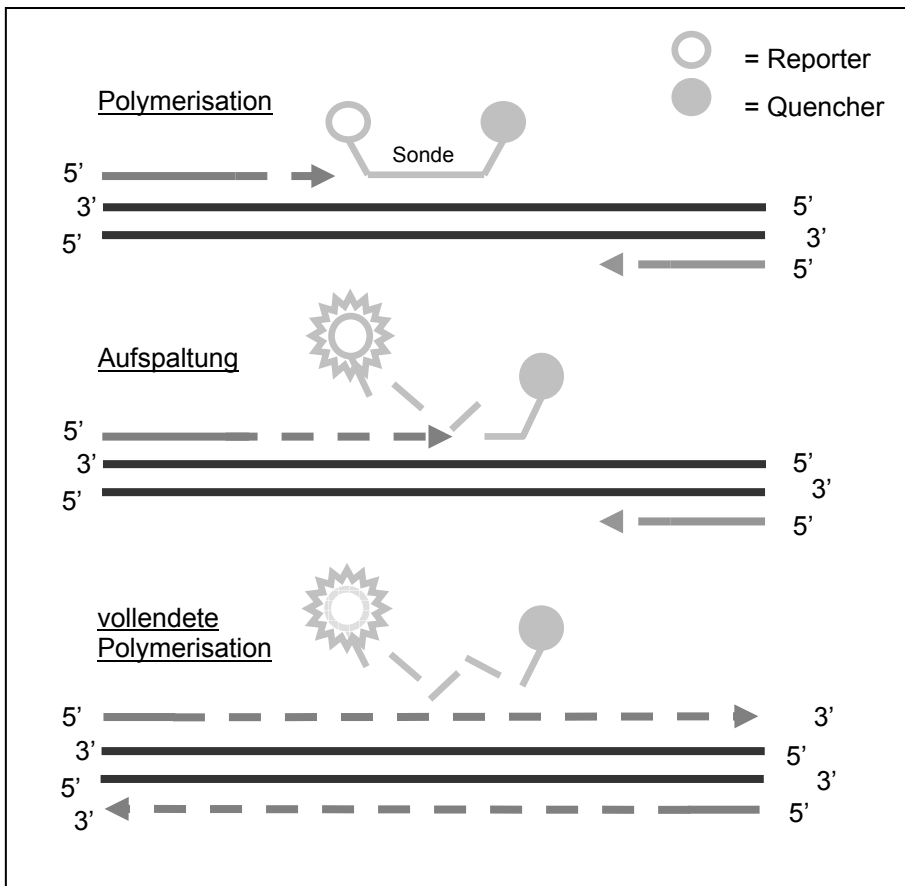


Abbildung 6: Prinzip der TaqMan[®]-PCR

Das entstandene Signal war ein direktes Maß für die Menge des entstehenden Amplifikates und strikt sequenzspezifisch, da nicht optimal bindende Sonden verdrängt wurden. Die Laserlichtquelle des ABI-Prism-Faseroptiksystems regte jede Probe gleichermaßen an und eine CCD-Kamera nahm das Fluoreszenzspektrum jeder einzelnen Probe auf und gab die resultierenden Daten zeitgleich an einen Computer weiter. Die ABI-Prism Software prüfte die Fluoreszenzintensität des Reporter-Farbstoffes und kalkulierte die Zunahme an normalisierter Reporter-Emissions-Intensität über den Verlauf der Amplifikation. Die Ergebnisse wurden dann gegen die PCR-Zykluszahl aufgetragen, wodurch die PCR-Amplifikation kontinuierlich (*real time*) verfolgt werden konnte. Um die Quantifizierung der initialen Ziel-DNA in jeder PCR-Reaktion zu ermöglichen, wurde ein Fluoreszenz-Schwellenwert angegeben. Damit war die Bestimmung des Zeitpunktes möglich, an dem der Amplifikations-Plot einer jeden Probe diesen Schwellenwert überschreitet (definiert als threshold cycle number, C_t).

Unterschiede im C_t -Wert wurden genutzt, um die relative Menge der PCR-Zielsequenz in jeder Probe zu quantifizieren.

3.2.8.5.2 Durchführung

Die Komponenten des „qPCR MasterMix Plus Low ROX“ Kits für quantitative PCR wurden nach den Angaben des Herstellers rekonstruiert. Für die TaqMan-PCR wurde für jede Probe folgender Reaktionsmix hergestellt: 2,5µl 10x Reaktionspuffer, 5µl 25mM $MgCl_2$ -Lösung, 0,5µl dATP, 0,5µl UTP, 0,5µl dCTP und 0,5µl dGTP (je 2,5mM), je 0,25µl forward primer und reverse primer (50pmol/µl), 0,375µl Sonde (10pmol/µl), 0,125µl AmpliTaq Gold DNA Polymerase, 12µl HPLC Wasser (Merck, Darmstadt) und 2,5µl 1:2-verdünnte cDNA (Gesamtvolumen = 25µl). Es wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Spezifität der RT-PCR wurde mittels no reverse-transcriptase- (noRT; Auslassen der Reversen Transkriptase bei der cDNA Synthese) und no template- (Auslassen der Matrize in der TaqMan-PCR) Kontrollen überprüft. Die PCR-Bedingungen waren wie folgt, die einzelnen Proben wurden für 2min bei 50°C, dann für 10min 95°C (so genannter „hot start“) und danach 45-mal 95°C für 15sec gefolgt von 1min bei 60°C inkubiert.

Die verwendeten Sonden und Primer sind in 3.1.4 aufgelistet.

3.2.9 Ergebnisdarstellung

Alle dargestellten Ergebnisse wurden in Experimenten mit Zellen dreier unabhängiger, nicht verwandter Spender durchgeführt. Es sind jeweils repräsentative Ergebnisse dargestellt.

Die Ergebnisse der TaqMan-PCR wurden logarithmisch aufgetragen als Kehrwert der Differenz der Messwerte von GAPDH und dem jeweiligen Zielgen.

3.2.10 Sequenzierung

Die Qualitätskontrolle der einzelnen PCR- und TaqMan-Produkte erfolgte mittels Sequenzierung. Die Sequenzierung hat Frau Sandra Opper, Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Philippsuniversität Marburg, durchgeführt. Dass die PCR-Produkte bzw. die jeweiligen Primer und Sonden korrekt waren, konnte somit zweifelsfrei gezeigt werden. Die Ergebnisse sind im Folgenden nicht dargestellt.

4. Ergebnisse

4.1 Generierung dendritischer Zellen

4.1.1 Reifemarkerexpression während der Differenzierung dendritischer Zellen

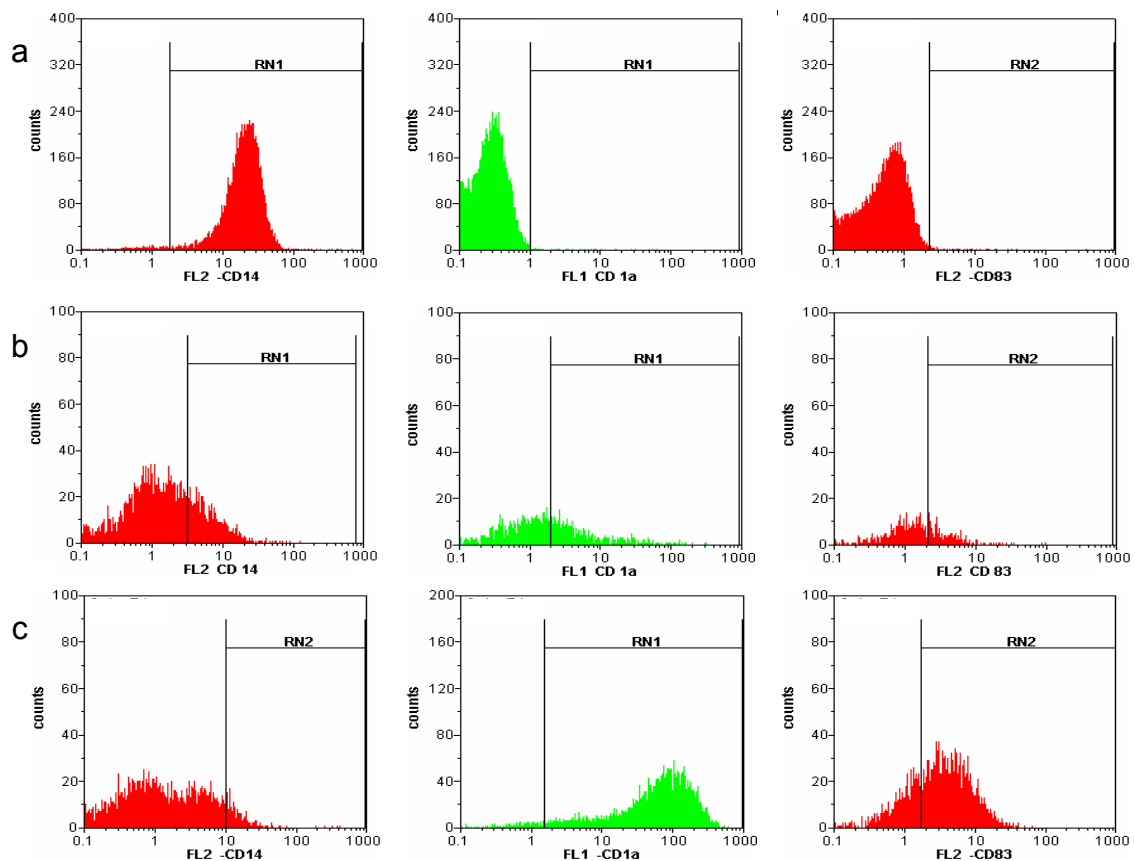


Abbildung 7: Durchflusszytometrie zelltypischer OFA (CD14, CD1a, CD83)

Expression der Oberflächenmoleküle CD14, CD1a und CD83 durch Zellen verschiedener Differenzierungsstadien durchflusszytometrisch mit Hilfe monoklonaler Antikörper ermittelt. (a) CD14⁺ Monozyten wurden mittels MACS aus PBMC isoliert, nach der Isolation für 2h ruhen gelassen, geerntet, mit den jeweiligen Antikörpern markiert und gemessen. (b) CD14⁺ Monozyten wurden nach Isolation mit den Reifungs- und Differenzierungsfaktoren GM-CSF (10 ng/ml) und IL-4 (500 U/ml) stimuliert und sechs Tage kultiviert, die entstandenen Zellen wurden geerntet, markiert und gemessen. (c) Solche sechs Tage kultivierten Zellen wurden nach einer weiteren 24stündigen Stimulation mit 10 ng/ml LPS geerntet, markiert und die Expression durchflusszytometrisch ermittelt.

Zur Differenzierung von DZ wurden CD14⁺ Zellen mittels MACS aus PBMC isoliert. Die Reinheit nach Isolation betrug deutlich mehr als 95%, beurteilt anhand der Expression von CD14, dem Zielmolekül der Monozytenisolation. CD1a als Marker für dendritische Zellen (DZ) und CD83 als spezifischer Marker

für reife DZ (mDZ) waren nicht nachweisbar (Abb. 7a). Nach Stimulation von CD14⁺ Monozyten mit GM-CSF (10 ng/ml) und IL-4 (500 U/ml) und sechstägiger Kultur sieht man den deutlichen Verlust des Monozytenmarkers CD14. Die Zellen exprimieren CD1a, das typische Oberflächenmolekül von DZ, und teilweise den Marker für reife dendritische Zellen (mDZ), CD83 (Abb. 7b). Nach weiterer Differenzierung über 24h mit einem Stimulus von 10ng/ml LPS sieht man den beinahe vollständigen Verlust von CD14, das als Zielmolekül der Monozytenisolation (s. Abb. 7a) zu Kulturbeginn von über 95% der Zellen exprimiert wurde. Auf nahezu allen Zellen findet sich CD1a als Marker für DZ. Auf einem Großteil auch den Marker für reife DZ, CD83 (Abb. 7c).

4.1.2 Expression zellartypischer Oberflächenantigene

Dargestellt sind die Ergebnisse aus mehreren Versuchsreihen mit den Zellen von mindestens drei verschiedenen Probanden.

Tabelle 6: zellarttypische OFA und Aktivierungsmarker auf Monozyten und iDZ

OFA	Tag 0 (CD14 ⁺)	Stdw.[%]	Tag 6 (iDC)	Stdw.[%]
CD 14	96%	(± 2)	28%	(± 6)
CD 1a	0%	(± 1)	53%	(± 23)
CD 83	0%		68%	(± 18)
CD 40	0,3%	(± 1)	84%	(± 5)
CD 80	0%		74%	(± 25)
CD 86	80%	(± 5)	94%	(± 5)
HLA-ABC	33MFI	(± 3)	96MFI	(± 66)
HLA-DR	39MFI	(± 26)	52MFI	(± 18)

Expression zellartypischer Oberflächenantigene (CD14, CD1a und CD83) und kostimulatorischer Moleküle (CD40, CD80 und CD 86) [% positive Zellen, Standardabweichung (Stdw ± %)] sowie des antigenabhängigen Signale [MFI] unstimuliert an Tag 0 und im Vergleich zu Tag 6 nach Stimulation mit GM-CSF (10 ng/ml) und IL-4 (500U/ml), durchflusszytometrisch gemessen.

Die Expression von CD14, CD1a und CD83 wurden in 4.1.1 beschrieben. CD40 ist ein frühes kostimulatorisches Molekül, das auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ) exprimiert wird. Es bindet den CD40-Liganden aktivierter T-Helfer-Zellen. Dieses Oberflächenmolekül ist auf den CD14⁺-Monozyten kaum vorhanden, nach sechs Tagen Kultur aber tragen es 80% der Zellen. CD80 (B7-1) ein kostimulatorisches Molekül auf APZ, das erst im Laufe der Kultur

exprimiert und nach sechs Tagen von durchschnittlich 70% der Zellen getragen wird. CD86 (B7-2) ist ein weiteres kostimulatorisches Molekül auf APZ. CD14⁺-Monozyten tragen es zu 75%, nach einer sechstägigen Kultur wird es von über 90% der Zellen getragen.

HLA-ABC oder MHC I (major histocompatibility complex) wird auf nahezu allen Körperzellen exprimiert, auch auf CD14⁺-Monozyten nach Sortierung und Kultur. Nach sechs Tagen Kultur wird HLA-ABC bis zu dreifach so stark exprimiert wie auf CD14⁺-Monozyten, Maß hierfür war die mittlere Fluoreszenzintensität. HLA-DR oder MHC II, zu finden auf antigenpräsentierenden Zellen (APZ), wird sowohl von CD14⁺-Monozyten als auch von den kultivierten Zellen, dann aber fast doppelt so stark, exprimiert.

4.1.3 Zellmorphie

Zur Darstellung der typischen Zellmorphologien wurden CD14⁺-Monozyten sortiert und auf speziellen Objektträgern sechs bzw. sieben Tage (mit sekundären Ausreifungsfaktoren) kultiviert.

4.1.3.1 CD14⁺ Monozyten

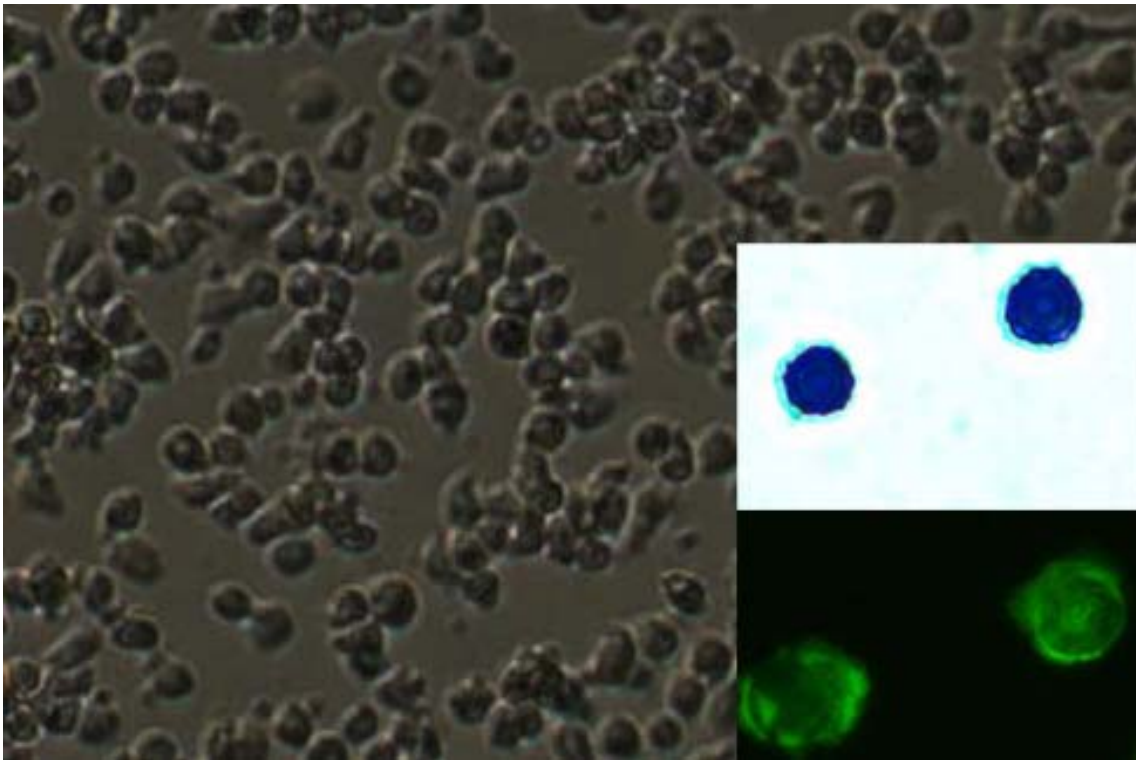


Abbildung 8: CD14⁺ Monozyten

Zur Darstellung der typischen Zellmorphologien wurden CD14⁺-Monozyten auf speziellen Objektträgern zwei Stunden kultiviert. Der Überstand der Zellkultur wurde dekantiert, anschließend wurden die anhaftenden Zellen in gängiger Giemsa-Technik gefärbt. Das Zytoskelett der Zellen wurde mittels einer Phalloidin-färbung dargestellt. Ungefärbte Kultur in 10facher Vergrößerung, Giemsa- und Phalloidin-gefärbte Zellen in 40facher Vergrößerung.

Abbildung 8 zeigt isolierte CD14⁺-Monozyten. Im Bild der ungefärbten Kultur sieht man die runde Form der Zellen. Die Monozyten sind die größten mononukleären Zellen (Ø 12-20µm) und besitzen typischerweise einen großen gebuchteten oder gelappten Kern mit grobmaschigem Chromatingerüst und ein basophiles Zytoplasma mit azurophilen Granula, wie in der Giemsa-färbung und Phalloidin-Färbung zu erkennen.

4.1.3.2 unreife dendritische Zellen (iDZ)

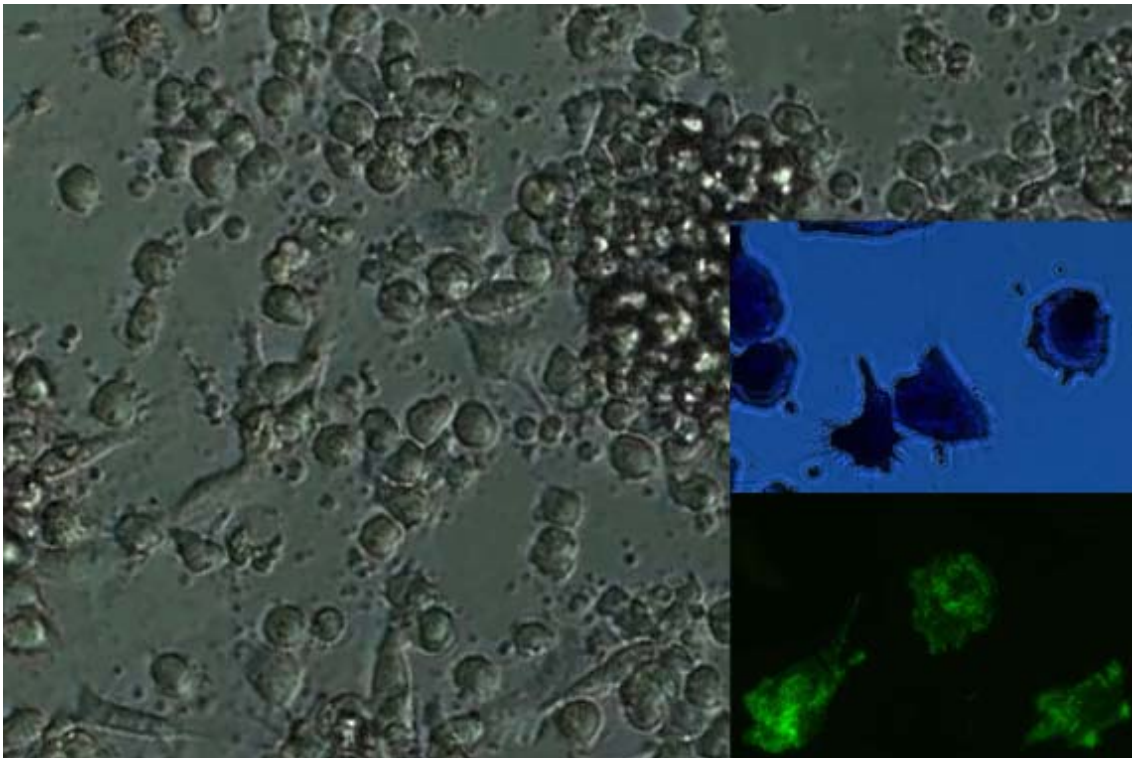


Abbildung 9: unreife DZ

CD14⁺Monozyten nach Stimulation mit GM-CSF (10ng/ml) und IL-4 (500U/ml) und sechstägiger Kultur: Zur Darstellung der typischen Zellmorphologien wurden CD14⁺-Monozyten auf speziellen Objektträgern sechs Tage kultiviert. Der Überstand der Zellkultur wurde dekantiert, anschließend wurden die anhaftenden Zellen in gängiger Giemsa-Technik gefärbt. Das Zytoskelett der Zellen wurde mittels einer Phalloidin-färbung dargestellt. Ungefärbte Kultur in 10-facher Vergrößerung, Giemsa- und Phalloidin-gefärbte Zellen in 40-facher Vergrößerung.

Abbildung 9 zeigt Zellen nach sechstägiger Kultur mit initialem GM-CSF/IL-4-Stimulus. Für unreife DZ typisch, erkennt man die plumpen Extensionen und den großen gelappten Zellkern, der meist zwei Nucleoli enthält. Die Zellen sind aufgrund ihrer Granula stark lichtbrechend. In der ungefärbten Kultur sieht man bereits, dass die Zellen miteinander in direktem Kontakt stehen und plumpe Ausläufer haben. Die Ausläufer der Zellen sieht man in 40-facher Vergrößerung, des Weiteren erkennt man einen breiten, entrundeten Zytoplasmasaum mit kleinen Granula. In der Phalloidin-färbung erkennt man das Zytoskelett der Zellen mit deutlichen Verstärkungen an den Spitzen der Ausläufer.

4.1.3.3 reife dendritische Zellen (mDZ)

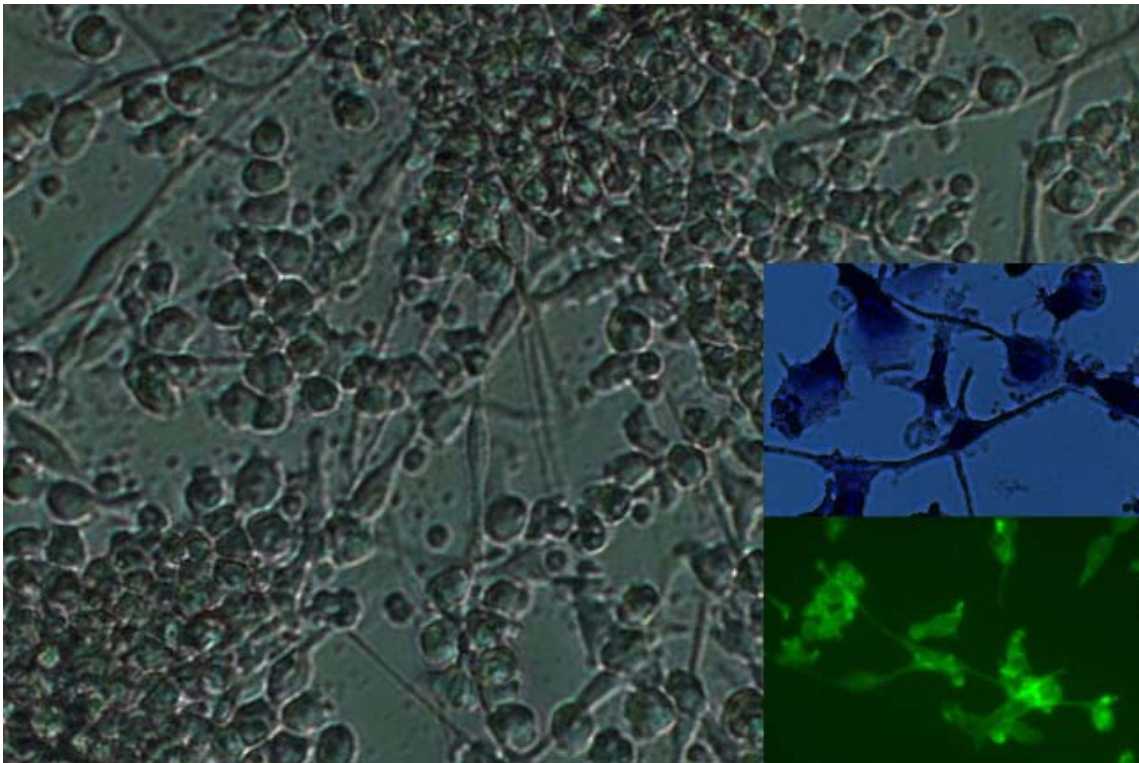


Abbildung 10: reife DZ

unreife DZ mit LPS-Stimulus (10ng/ml) über 24h Stunden: Zur Darstellung der typischen Zellmorphologien wurden CD14⁺-Monozyten auf speziellen Objektträgern sechs Tage kultiviert und für weitere 24h mit 10 ng/ml LPS ausgereift. Der Überstand der Zellkultur wurde dekantiert, anschließend wurden die anhaftenden Zellen in gängiger Giemsa-Technik gefärbt. Das Zytoskelett der Zellen wurde mittels einer Phalloidin-färbung dargestellt.

Abbildung 10 zeigt das typische Bild einer Zellkultur von ausgereiften dendritischen Zellen. Die bei unreifen DZ noch relativ plumpen Ausläufer sind ausgezogen und deutlicher ausgeprägt, was zu einem netzwerkartigen Bild in der Übersichtsvergrößerung führt. Man erkennt sowohl in der 10-fachen als auch in den 40-fachen Vergrößerungen den Kontakt der Ausläufer verschiedener Zellen.

4.1.4 Funktionalität dendritischer Zellen

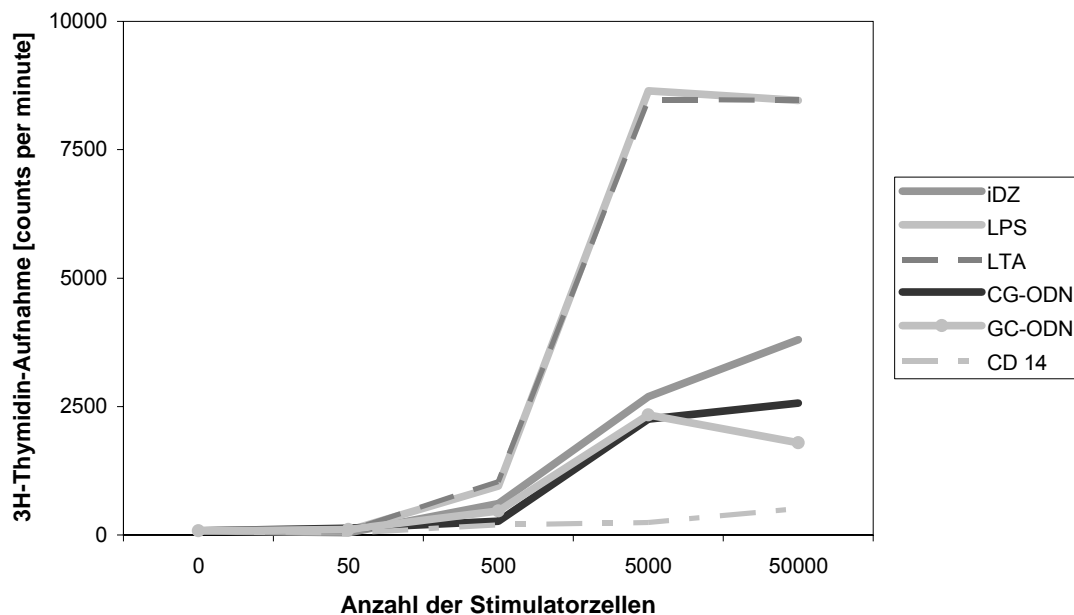


Abbildung 11: GLR

Funktioneller Nachweis dendritischer Zellen durch eine gemischte Leukozytenreaktion (GLR): definierte Zellmengen der zu untersuchenden Stimulatorzellen mit konstanter Anzahl naiver T-Zellen (nT-Z) co-kultiviert. Die Reaktion verlief allogren, d.h. naive T-Zellen (aus Nabelschnurblut) und DZ waren von verschiedenen Spendern. DZ wurden aus CD14⁺-Monozyten über sechstägige Kultur mit initialem GM-CSF- und IL-4-Stimulus gewonnen. Am Tag sechs der Kultur wurden die unreifen DZ (iDZ) über 24h mit LPS, LTA, CpG-ODN und GpC-ODN stimuliert. Jeweils definierte Mengen dieser Zellen, nicht stimulierter iDZ und CD14⁺-Monozyten wurden mit nT-Z drei Tage kokultiviert und mit 10 μ Ci/ml ³H-Thymidin (37mBq, entsprechen 1mCi/ml) für 18h gepulst. Über ein Zellerntegerät wurden die zellulären Bestandteile gewonnen, in einem Beta-Counter analysiert und die Ergebnisse in radioaktiven Zerfällen pro Minute (counts per minute) dargestellt.

Die CD14⁺ Monozyten waren nicht in der Lage Proliferation naiver T-Zellen zu induzieren. Unreife DZ verursachten eine mäßige T-Zellproliferation. Reife dendritische Zellen führten zu einer starken und DZ-typischen T-Zellproliferation. CpG-ODN als Stimulus der unreifen DZ verursachte in der anschließenden GLR keine signifikante Steigerung der T-Zellproliferation. LTA als Ausreifungsfaktor führt zu einer starken und DZ-typischen T-Zellproliferation.

4.1.5 Verunreinigende Zellpopulationen (plasmazytoide DZ und B-Zellen)

Zum Ausschluss von Kontaminationen durch plasmazytoide DZ und B-Zellen wurde PBMC und CD14⁺-Isolate mit monoklonalen Antikörpern gegen BDCA-2, BDCA-3 und BDCA-4 bzw. CD19 sowie mit einem andersfarbigen Antikörper gegen CD14 gefärbt, und durchflusszytometrisch der Anteil der jeweils CD14⁺, BDCA⁺ oder CD19⁺ Zellen ermittelt.

	OFA	CD14	BDCA-2	BDCA-3	BDCA-4	CD19
Zelltyp						
PBMC		14 (±4)	2,3 (±0,2)	0,5 (±0,1)	1,6 (±0,3)	5,2 (±1,3)
CD14 ⁺		97 (±2)	0,5 (±0,1)	0,1	0,4 (±0,1)	0,3 (±0,1)
iDZ		28 (±6)	0,1	0,1	0,1	0,1
mDZ		3 (±1)	0,1	0,1	0,1	0,1

Tabelle 7: Verunreinigung durch plasmazytoide DZ und B-Zellen

PBMC wurden für 2h ruhen gelassen, auf Eis inkubiert und für die Messung 2×10^5 Zellen mit 10µl des entsprechenden monoklonalen Antikörpers für 15min bei 4°C inkubiert. Des Weiteren wurden CD14⁺-PBMC, unreife DZ [iDZ; CD14⁺Monozyten nach Stimulation mit GM-CSF (10ng/ml) und IL-4 (500U/ml) und sechstägiger Kultur] sowie reife DZ [iDZ nach Stimulus mit GM-CSF + LPS] auf ihre CD14-, CD19- und BDCA-Expression hin untersucht. Dargestellt ist der jeweilige OFA-tragende Prozentsatz der Zellen.

BDCA-2 wird von 2,3% der PBMC getragen, 0,5% der mittels MACS sortierten CD14⁺ Zellen tragen dieses OFA. Auf unreifen DZ und ausgereiften Zellen tragen 0,1% der Zellen BDCA, was aufgrund der Ungenauigkeit der Methode mit keinen BDCA-2⁺ Zellen gleichzusetzen ist. 0,5% der PBMC tragen BDCA-3. CD14⁺-PBMC, iDZ oder mDZ tragen kein BDCA-3. BDCA-4 ist auf iDZ und mDZ ebenfalls nicht nachweisbar. Auf PBMC jedoch auf 1,6% der Fälle, nach CD14⁺ Sortierung noch auf 0,4% der Zellen. CD19 wird von 5,2% der PBMC getragen und von 0,3% der CD14⁺ Monozyten. In Kulturen von unreifen oder reifen DZ sind CD19⁺ Zellen nicht nachweisbar.

4.2 Eigenschaften dendritischer Zellen nach TLR Stimulation

4.2.1 OFA nach TLR9 Stimulation

Dargestellt sind die Ergebnisse aus mehreren Versuchsreihen mit den Zellen von mindestens drei verschiedenen Probanden.

4.2.1.1 CD14-Expression

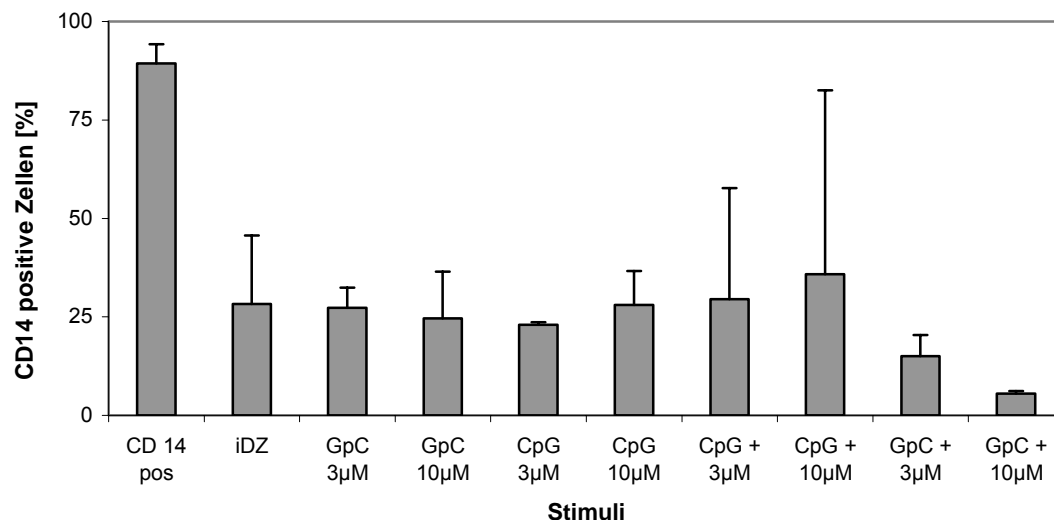


Abbildung 12: CD14-Expression [%] verschiedener Zellarten

An Tag 0 wurden die CD14⁺-Monozyten nach der Isolation mit den Reifungs- und Differenzierungsfaktoren GM-CSF (10ng/ml) und IL-4 (500U/ml) stimuliert und in Click/RPMI-Medium (10% FCS) bei 36°C und 5% CO₂-Begasung sechs Tage kultiviert. Am sechsten Tag der Kultur wurden je 1x10⁶ Zellen mit 3µM GpC-ODN, 10µM GpC-ODN, 3µM CpG-ODN und 10µM CpG-ODN für 24 Stunden stimuliert, des Weiteren wurden je 1x10⁶ Zellen zwei Stunden nach Vorstimulation mit 10ng/ml GM-CSF (in der Darstellung mit „+“ gekennzeichnet) mit 3µM GpC-ODN, 10µM GpC-ODN, 3µM CpG-ODN und 10µM CpG-ODN stimuliert. Zur Ablösung adhaerenter Zellen vom Boden der Kulturgefäße wurden die Kulturen 15min auf Eis inkubiert. Die so erhaltenen iDZ wurden zweimal in 2ml PBS bei 350g gewaschen. Für die Messung wurden 2x10⁵ Zellen mit der vom Hersteller empfohlenen Konzentration des entsprechenden Antikörpers für 15min bei 4°C inkubiert. Dargestellt sind die CD14⁺-Zellen nach den verschiedenen Stimuli im Vergleich zu unstimulierten iDZ und ohne Stimulus nach Isolation für 6 Tage inkubierten CD14⁺-Monozyten.

Die Zellen verlieren während der sechs Tage Kultur den Monozytenmarker CD14, der nach Isolation auf nahezu allen Zellen zu finden ist. Nach sechs Tagen Primärkultur und nach Restimulation mit 3µM CpG-ODN, 10 µM CpG-ODN, 3µM GpC-ODN und 10µM GpC-ODN tragen nur noch etwa ein Viertel der Zellen dieses Molekül. Ausnahme sind mit GM-CSF und 10µM GpC-ODN stimulierte Zellen, von denen nur noch ca. 10% CD14 tragen.

4.2.1.2 CD1a-Expression

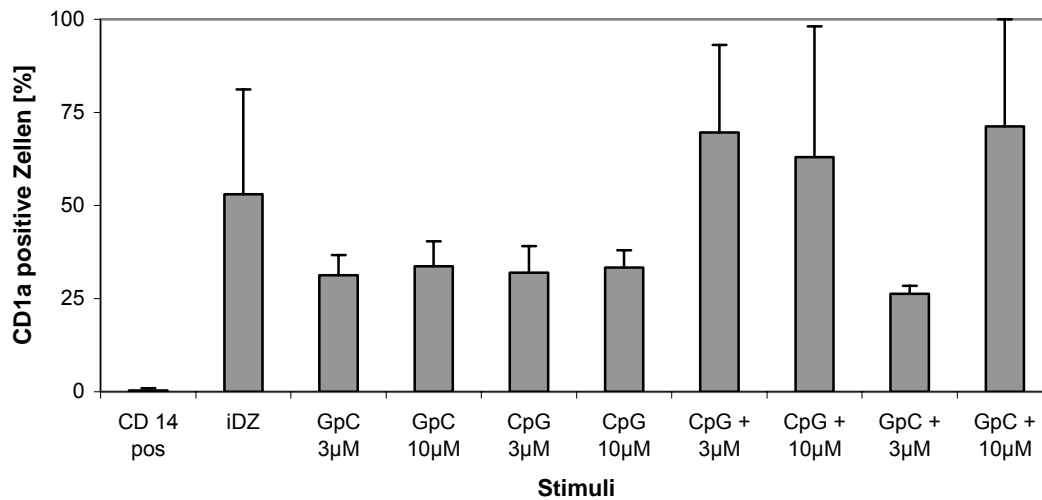


Abbildung 13: CD1a-Expression verschiedener Zellarten

Dargestellt ist die Expression des Oberflächenmoleküls CD1a auf iDZ nach Stimulation mit CpG-ODN und GpC-ODN, teilweise vorinkubiert mit GM-CSF (mit „+“ gekennzeichnet), im Vergleich zu unstimulierten iDZ und ohne Stimulus nach Isolation für 6 Tage inkubierten CD14⁺-Monozyten.

CD14⁺-Monozyten exprimieren kein CD1a, aber ca. 50% der iDZ. Nach Stimulation mit CpG- und GpC-ODN ohne GM-CSF Vorinkubation tragen nur noch 30% der dendritischen Zellen CD1a. Mit GM-CSF vorinkubierte und mit 3µM CpG-ODN, 10µM CpG-ODN und 10µM GpC-ODN stimulierte Zellen tragen zu 70% CD1a, die mit 3µM GpC-ODN stimulierten Zellen nur zu 30%.

4.2.1.3 CD83-Expression

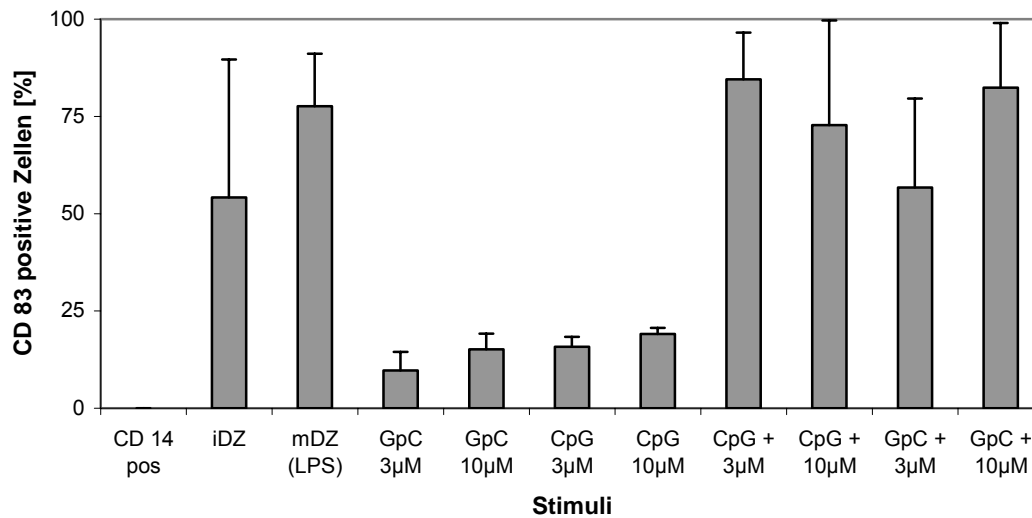


Abbildung 14: CD83-Expression verschiedener Zellen

Dargestellt ist die Expression des Oberflächenmoleküls CD83 auf iDZ nach Stimulation mit CpG-ODN und GpC-ODN, teilweise vorinkubiert mit GM-CSF (mit „+“ gekennzeichnet), im Vergleich zu direkt nach Isolation ohne Stimulus für 6 Tage inkubierten CD14⁺-Monozyten, unstimulierten iDZ und mit LPS ausgereiften (10ng/ml für 24h) mDZ.

CD14⁺-Monozyten tragen kein CD83, aber 50% der iDZ, mit 10ng/ml LPS ausgereifte dendritische Zellen (mDZ) zu über 75%. Nach Stimulation mit CpG- und GpC-ODN ohne GM-CSF Vorinkubation tragen nur 15% bis 20% der Zellen CD83. Von den mit GM-CSF vorstimulierten und mit CpG-ODN und GpC-ODN nachstimulierten Zellen tragen zwischen 70% und 90% der Zellen CD83.

4.2.1.4 CD40-Expression

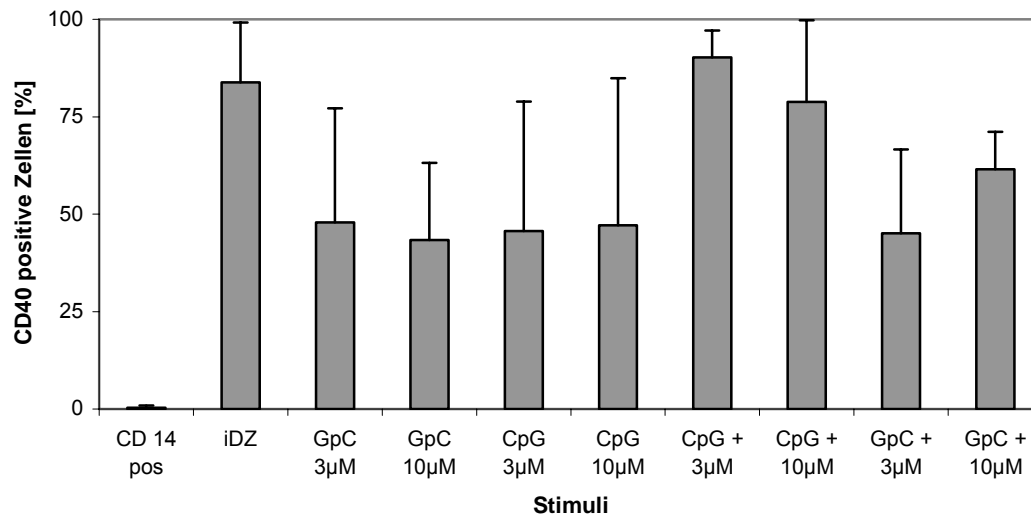


Abbildung 15: CD40-Expression verschiedener Zellen

Dargestellt ist die Expression des Oberflächenmoleküls CD40 auf iDZ nach Stimulation mit CpG-ODN und GpC-ODN, teilweise vorinkubiert mit GM-CSF (gekennzeichnet mit „+“), im Vergleich zu direkt nach Isolation ohne Stimulus für 6 Tage inkubierten CD14⁺-Monozyten und unstimulierten iDZ.

CD40 wird von CD14⁺-Monozyten nur schwach exprimiert, aber nach sechs Tagen Kultur tragen es 80% der iDZ. Nach Stimulation mit CpG- und GpC-ODN ohne GM-CSF Vorinkubation tragen etwa 45% der Zellen CD40. Von den mit GM- und mit CpG-ODN stimulierten Zellen tragen etwa 85% CD40, von den mit GpC-ODN stimulierten bei 3µM nur 45% bzw. bei 10µM 60%.

4.2.1.5 CD80-Expression

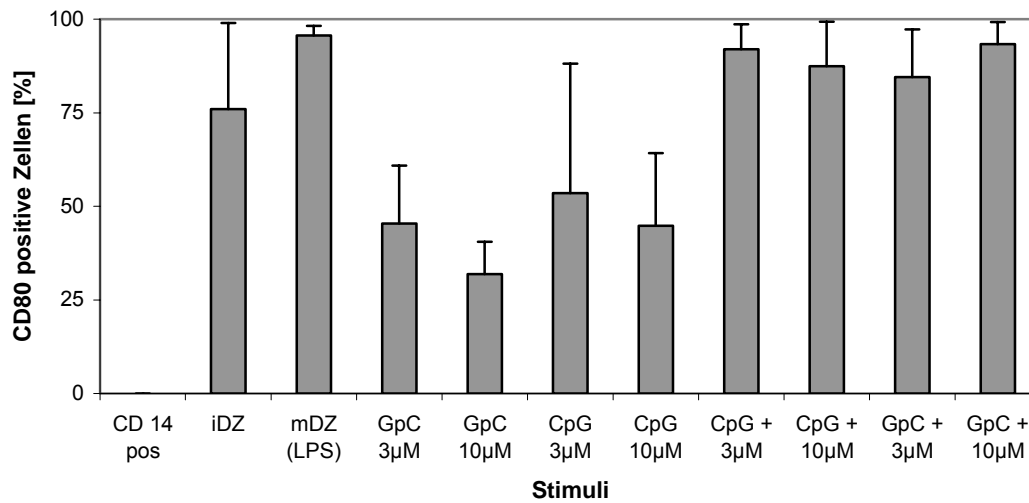


Abbildung 16: CD80-Expression verschiedener Zellen

Dargestellt ist die Expression des Oberflächenmoleküls CD80 (B7-1) auf iDZ nach Stimulation mit CpG-ODN und GpC-ODN, teilweise vorinkubiert mit GM-CSF (mit „+“ gekennzeichnet), im Vergleich zu direkt nach Isolation ohne Stimulus für 6 Tage inkubierten CD14⁺-Monozyten, unstimulierten iDZ und mDZ (10ng/ml für 24h).

CD80 (B7-1) wird im Kulturverlauf exprimiert und nach sechs Tagen von 75% der iDZ getragen wird. Von den mit 10ng/ml LPS ausgereiften mDZ tragen es über 95%. Von mit CpG- und GpC-ODN stimulierten DZ exprimieren es ca. 40 bis 50%, die mit GM-CSF vorstimulierten Zellen tragen es zu über 90%.

4.2.1.6 CD86-Expression

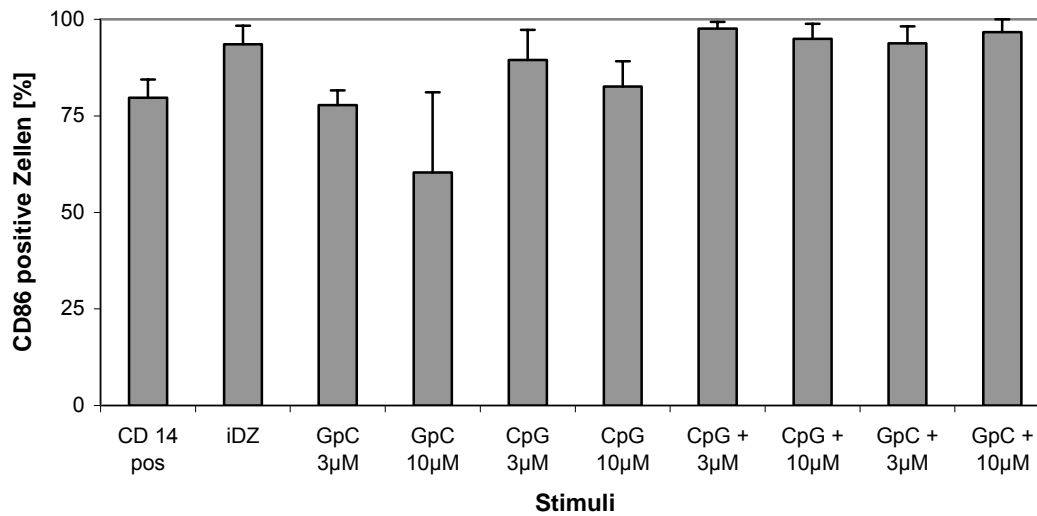


Abbildung 17: CD86-Expression verschiedener Zellen

Dargestellt ist die Expression des Oberflächenmoleküls CD86 auf iDZ nach Stimulation mit CpG-ODN und GpC-ODN, teilweise vorinkubiert mit GM-CSF (gekennzeichnet mit „+“), im Vergleich zu unstimulierten iDZ und direkt nach Isolation ohne Stimulus für 6 Tage inkubierten CD14⁺-Monozyten.

CD14⁺-Monozyten tragen CD86 (B7-2) zu über 75%, nach sechstägiger Kultur wird es von über 90% der iDZ getragen. Mit 3µM GpC-ODN stimulierte Zellen tragen es zu über 75%, die mit 10µM GpC-ODN stimulierten zu 60%. iDZ, die mit CpG-ODN stimuliert wurden, tragen es zu 80%. Alle mit GM-CSF vorstimulierten Zellen exprimieren CD86 zu über 95%.

4.2.1.7 HLA-ABC-Expression

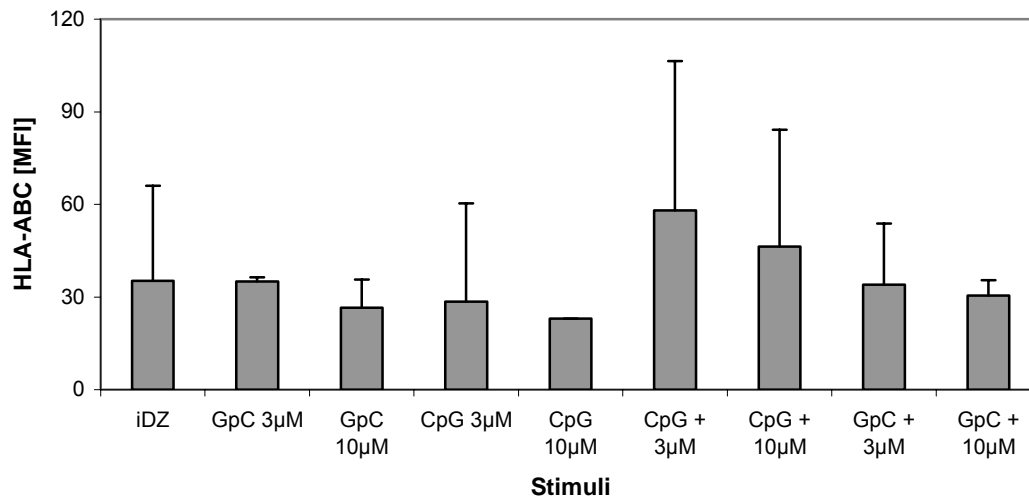


Abbildung 18: HLA-ABC-Expression verschiedener Zellen

Dargestellt ist die Expression des Oberflächenmoleküls HLA-ABC (MHC I) auf iDZ nach Stimulation mit CpG-ODN und GpC-ODN, teilweise vorinkubiert mit GM-CSF (mit „+“ gekennzeichnet), im Vergleich zu unstimulierten iDZ.

HLA-ABC oder MHC I wird auf nahezu allen Körperzellen so auch auf iDZ exprimiert. Alle Zellen exprimieren, unabhängig von der Stimulation, HLA-ABC, die Unterschiede in der Expression sind nicht signifikant.

4.2.1.8 HLA-DR-Expression

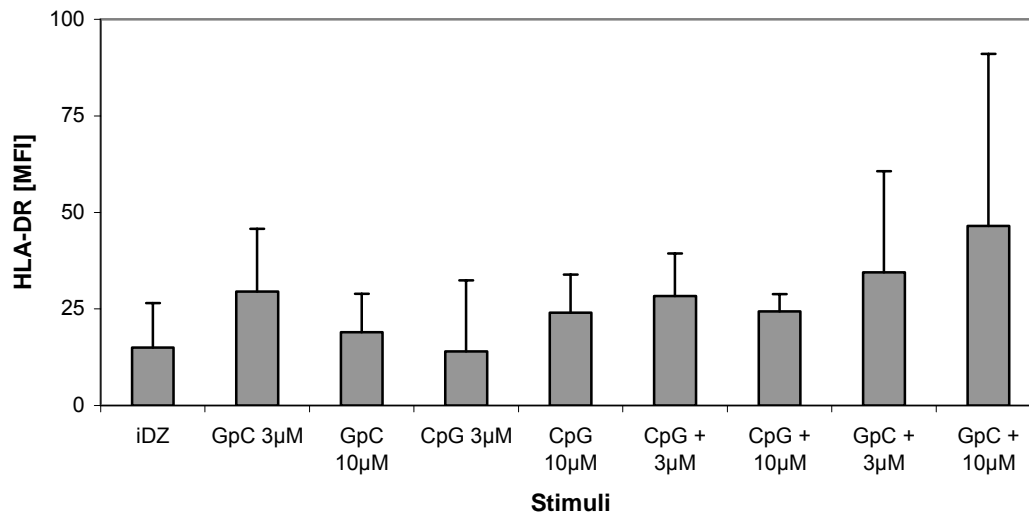


Abbildung 19: HLA-DR-Expression verschiedener Zellen

Gezeigt wird die Expression des Oberflächenmoleküls HLA-DR (MHC Klasse II) auf iDZ nach Stimulation mit CpG-ODN und GpC-ODN, teilweise vorinkubiert mit GM-CSF (gekennzeichnet mit „+“), im Vergleich zu unstimulierten iDZ.

HLA-DR oder MHC II wurde auf allen gemessenen Zellen exprimiert. Sie exprimieren HLA-DR etwa gleich stark mit einer MFI (Mean Fluorescence Intensity) zwischen 15 und 30, die mit GM-CSF und GpC-ODN stimulierten iDZ stärker, mit einer MFI um 45.

4.2.2 OFA-Expression nach TLR2- und TLR4-Stimulation

Die Expression der Oberflächenmoleküle CD1a, CD83, CD40, CD80, CD86 und HLA-DR auf DZ wurde durchflusszytometrisch ermittelt. Die Zellen waren unstimulierte DZ im Vergleich zu mit GM-CSF, LTA, LPS oder GM-CSF plus LPS stimulierten DZ. Dargestellt sind die Ergebnisse aus mehreren Versuchsreihen mit den Zellen von mindestens drei verschiedenen Probanden.

4.2.2.1 CD1a-Expression

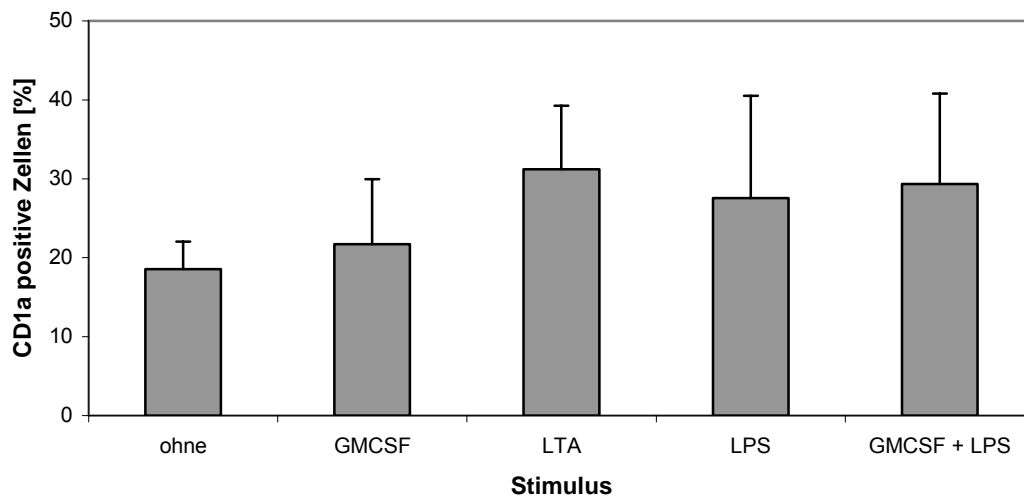


Abbildung 20: CD1a-Expression unterschiedlich stimulierter DZ

Die Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen und 6 Tage kultiviert. Am sechsten Tag der Kultur wurden je 1×10^6 Zellen mit 10ng/ml GM-CSF, 5 μ g/ml LTA und 10ng/ml LPS für 24h stimuliert, des Weiteren wurden je 1×10^6 Zellen zwei Stunden nach Vorstimulation mit 10ng/ml GM-CSF mit 10ng/ml LPS stimuliert, anschließend geerntet und gewaschen. Für die Messung wurden 2×10^5 Zellen mit der entsprechenden Antikörperkonzentration für 15min bei 4°C inkubiert. Bezugsgröße war eine Probe von 1×10^6 iDZ ohne Restimulus.

CD1a, als typischer Marker für dendritische Zellen, wird von 19% der unstimulierten Zellen getragen, mit GM-CSF stimulierte Zellen tragen ihn zu 22%. Mit LTA, LPS oder GM-CSF plus LPS stimulierte DZ tragen ihn zu 30%.

4.2.2.2 CD83-Expression

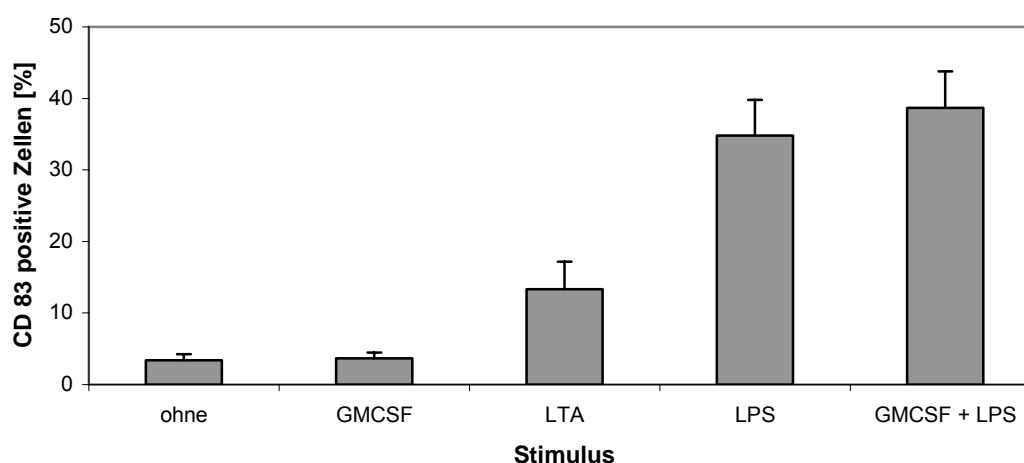


Abbildung 21: CD83-Expression unterschiedlich stimulierter DZ

Die Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen und 6 Tage kultiviert. Am sechsten Tag der Kultur wurden die Zellen wie beschrieben stimuliert, nach 24h geerntet, markiert und gemessen. Bezugsgröße war eine Probe von 1×10^6 iDZ ohne Restimulus.

Unstimulierte DZ tragen CD83 zu 3%. GM-CSF beeinflusst diese Expression nicht. Nach LTA Stimulation tragen 15% der Zellen CD83. Von den LPS ausgereiften Zellen tragen über 35%, von GM-CSF und LPS ausgereiften sogar 40% CD83.

4.2.2.3 CD40-Expression

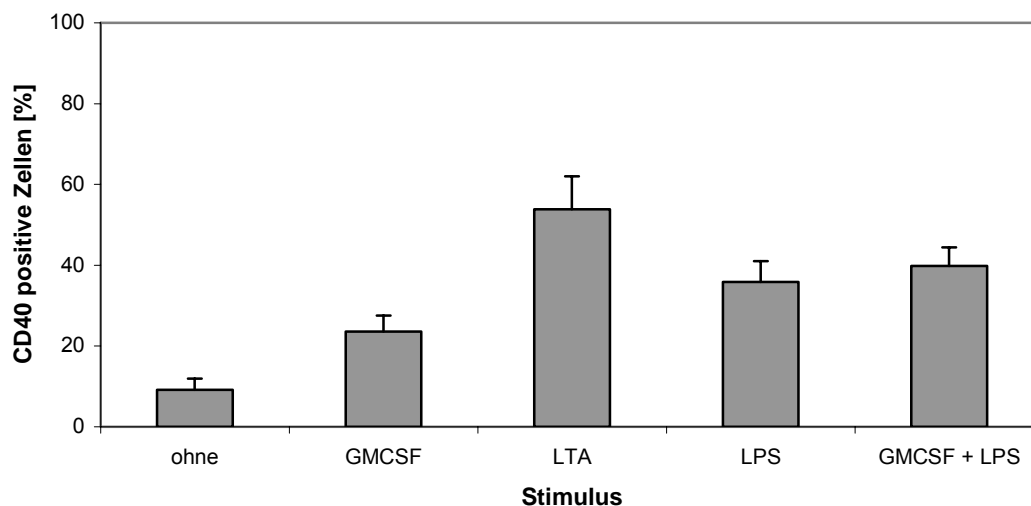


Abbildung 22: CD40-Expression unterschiedlich stimulierter DZ

Die Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen und 6 Tage kultiviert, am sechsten Tag der Kultur wie beschrieben stimuliert, nach 24h geerntet, markiert und gemessen. Bezugsgröße war eine Probe von 1×10^6 iDZ ohne Restimulus.

IDZ tragen zu weniger als 10% CD40. GM-CSF stimulierte Zellen tragen es zu 20%. Nach LTA-Stimulation tragen es über 50%. Stimulation mit LPS oder mit GM-CSF-Vorinkubation führt zu einer CD40-Expression von über 35%.

4.2.2.4 CD80-Expression

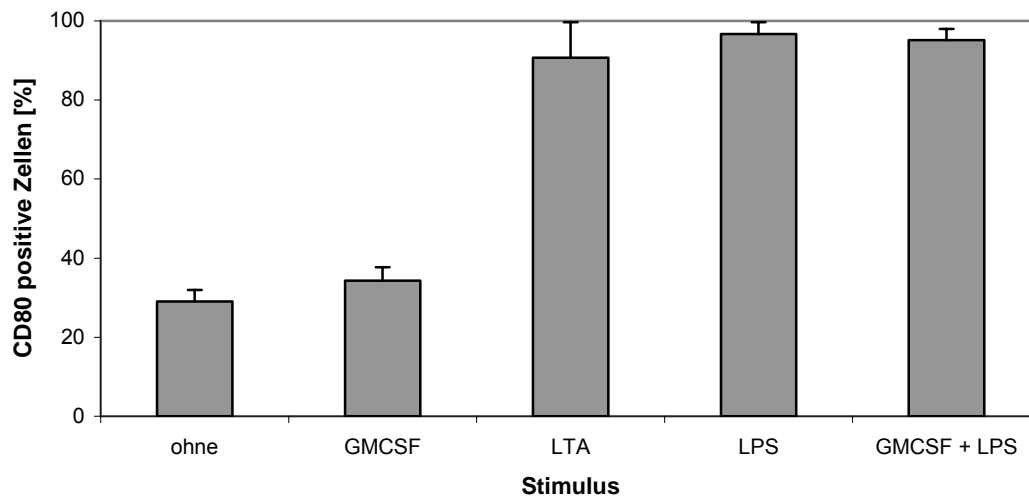


Abbildung 23: CD80 Expression unterschiedlich stimulierter DZ

Die Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen und 6 Tage kultiviert. Am sechsten Tag der Kultur wie beschrieben stimuliert, nach 24h geerntet, markiert und gemessen. Bezugsgröße war eine Probe von 1×10^6 iDZ ohne Restimulus.

CD80 wird von ca. 25 % unstimulierter Zellen getragen. GM-CSF beeinflusst diese Expression nicht. DZ, die mit LTA, LPS oder GM-CSF und LPS stimuliert wurden, exprimieren zu über 90% CD80.

4.2.2.5 CD86-Expression

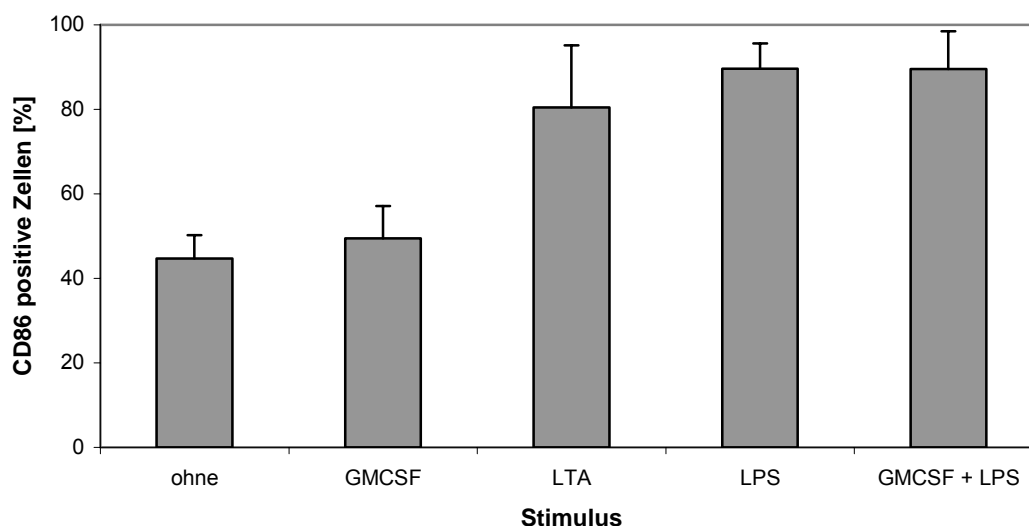


Abbildung 24: CD86-Expression unterschiedlich stimulierter DZ

Die Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen und 6 Tage kultiviert. Am sechsten Tag der Kultur wurden sie wie beschrieben stimuliert, nach 24h geerntet, markiert und gemessen. Bezugsgröße war eine Probe von 1×10^6 iDZ ohne Restimulus.

LPS, mit und ohne GM-CSF-Vorinkubation, führt zu einer CD86-Expression von 90% der Zellen. Von den mit LTA stimulierten Zellen tragen es 85%, im Gegensatz zu den unstimulierten und den mit GM-CSF stimulierten iDZ, die CD86 nur zu knapp 50% exprimieren.

4.2.2.6 HLA-DR-Expression

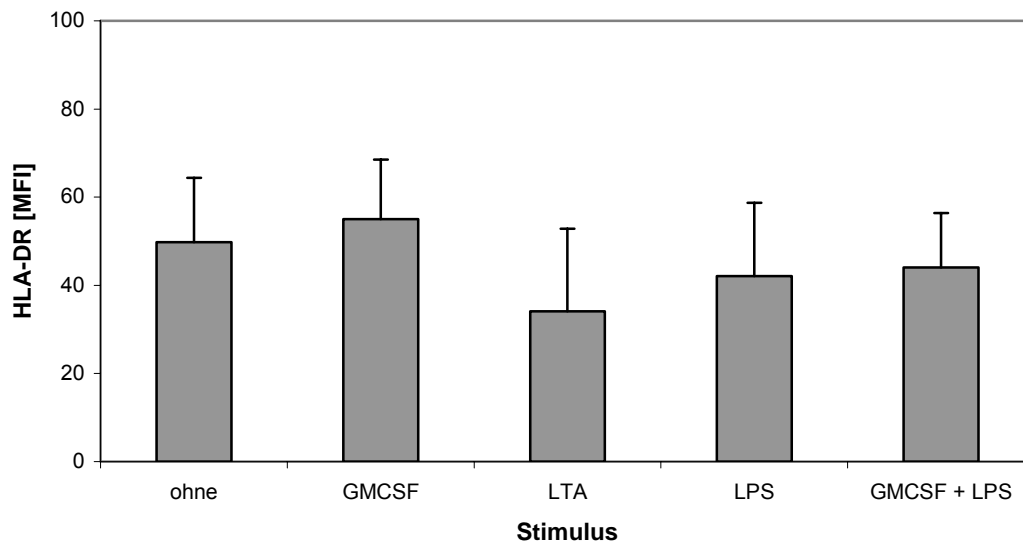


Abbildung 25: HLA-DR-Expression (MFI) unterschiedlich stimulierter DZ

Die Zellen wurden wie im beschriebenen Versuchsaufbau gewonnen und sechs Tage kultiviert. Am sechsten Tag der Kultur wie beschrieben stimuliert, nach 24h geerntet, markiert und gemessen. Bezugsgröße war eine Probe von 1×10^6 iDZ ohne Restimulus.

HLA-DR oder MHC II wird auf iDZ mit einer MFI von 50 stark exprimiert. GM-CSF-Stimulation steigert die Expression auf eine MFI von 55. Stimulation mit LTA hingegen führt zu einer MFI von ca. 35. Nach LPS-Stimulus mit und ohne GM-CSF-Vorinkubation ist die MFI über 40.

4.3 Funktionalität verschieden stimulierter Zellen

4.3.1 Aufnahme FITC markierter Oligodesoxynukleotide

Die Aufnahme verschiedener FITC-markierter ODN (CG-PTO, GC-PTO, CG-PO) durch unreife und reife dendritische Zellen (mDZ) wurde durchflusszytometrisch ermittelt.

4.3.1.1 ODN-Aufnahme durch iDZ

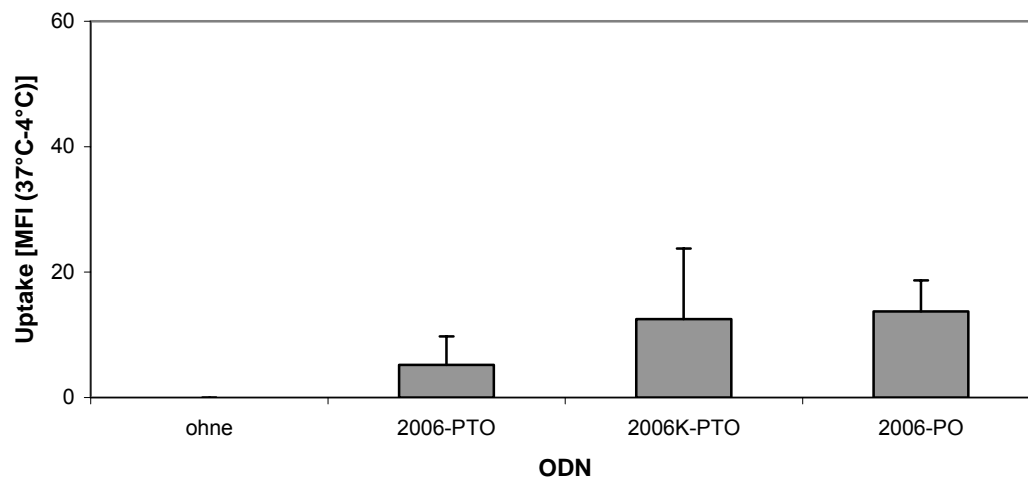


Abbildung 26: Uptake MFI (Differenz 37°C-4°C)

CD14⁺-Monozyten wurden wie beschrieben zu iDZ differenziert und geerntet. Zur Uptake-Messung wurden die Zellen jeweils auf zwei Kulturplatten zu je 5×10^5 Zellen in 1ml Click/RPMI Medium verteilt. Die Platten wurden 20 min auf Eis (4°C) oder im Brutschrank (37°C) vortemperiert, die FITC-markierten Oligonukleotide zugegeben und die Platten für 90min bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Nach durchflusszytometrischer Ermittlung der MFI wurden für die Ergebnissdarstellung von den Werten der bei 37°C inkubierten Proben die der bei 4°C inkubierten subtrahiert [Δ MFI (37°C-4°C)].

Alle getesteten ODN werden von den unreifen dendritischen Zellen nur sehr schwach aufgenommen. Einen signifikanten Unterschied zwischen 2006-PTO, 2006K-PTO und 2006-PO gibt es hierbei nicht.

4.3.1.2 ODN-Aufnahme durch mDZ

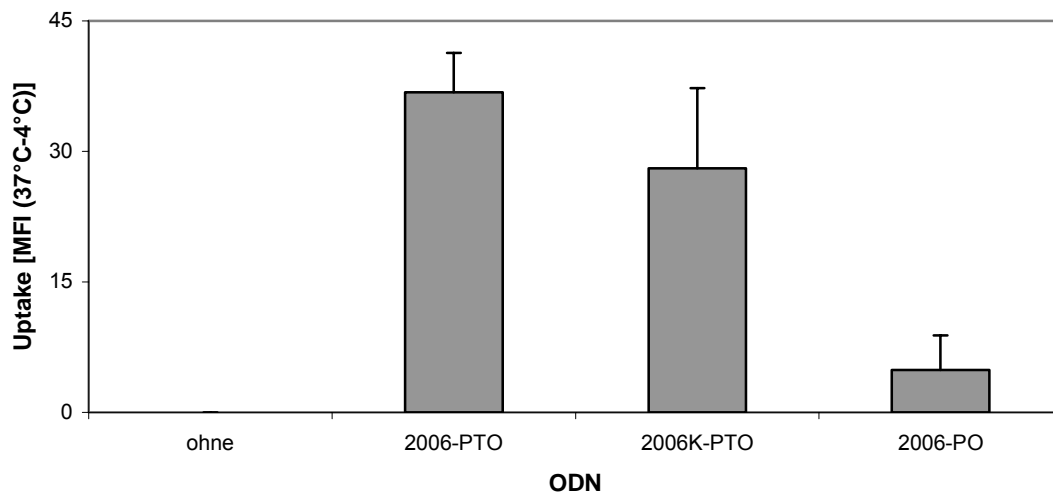


Abbildung 27: mDZ Uptake MFI (Differenz 37°-4°)

CD14⁺-Monozyten wurden wie beschrieben zu iDZ differenziert und daraus durch Stimulation mit 10ng/ml LPS über 24h reife dendritische Zellen (mDZ) generiert. Zur Uptake-Messung wurden die Zellen jeweils auf zwei Kulturplatten zu je 5×10^5 Zellen in 1ml Click/RPMI Medium verteilt. Die Platten wurden 20min auf Eis (4°C) oder im Brutschrank (37°C) vortemperierte, die FITC-markierten Oligonukleotide zugegeben und die Platten für 90min bei den entsprechenden Temperaturen inkubiert. Nach durchflusszytometrischer Ermittlung der MFI wurden für die Ergebnissdarstellung von den Werten der bei 37°C inkubierten Proben die der bei 4°C inkubierten subtrahiert [Δ MFI (37°C-4°C)].

In der Darstellung der mittleren Fluoreszenzintensität erkennt man, dass reife dendritische Zellen (mDZ) PTO-ODN gut aufnehmen, MFI 35 nach Aufnahme von 2006-PTO-ODN und MFI 29 nach 2006K-PTO-ODN-Aufnahme. Das 2006-PO-ODN hingegen wird mit einer MFI von unter fünf weniger gut aufgenommen.

4.3.2 Phagozytosefähigkeit

Die Phagozytosekapazität wurde durch die Aufnahme von FITC-markierten Latex-Beads unstimulierter und mit LPS, LTA, GM-CSF oder GM-CSF und LPS ausgereifter dendritischer Zellen (DZ) durchflusszytometrisch ermittelt.

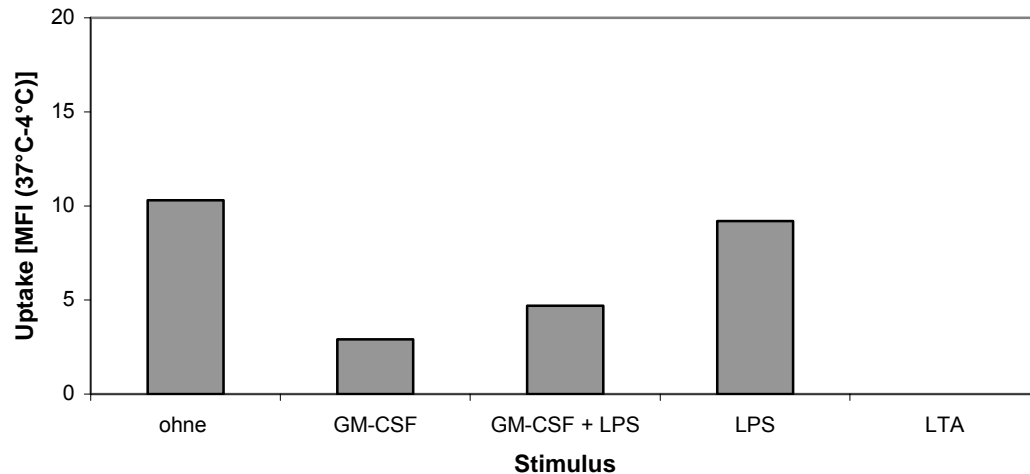


Abbildung 28: Phagozytose nach verschiedenen Stimuli [MFI]

CD14⁺-Monozyten wurden wie beschrieben zu iDZ differenziert und geerntet. Für die Phagozytose-Messung wurden die Zellen analog zur Uptake-Messung behandelt und anstatt ODN FITC-markierte Latex-Beads zugegeben. Nach durchflusszytometrischer Ermittlung der MFI wurden für die Ergebnisdarstellung von den Werten der bei 37°C inkubierten Proben die der bei 4°C inkubierten subtrahiert [Δ MFI (37°C-4°C)].

Das Diagramm zeigt die mittlere Fluoreszenzintensität (mean fluorescence intensity, MFI) der Zellen nach Phagozytose. iDZ fluoreszieren mit einer mittleren Leuchtintensität von ca. 11, mit LPS ausgereifte DZ tun dies auch mit einer MFI von 10. Mit GM-CSF und LPS stimulierte Zellen zeigen eine MFI von 5 und die nur mit GM-CSF stimulierten DZ von 3. Nach LTA-Stimulus fluoreszieren die Zellen nicht mehr.

4.3.3 IL-6 und IL-12 Produktion

Die Produktion der Zytokine IL-6 und IL-12 wurde mittels ELISA-Technik erfasst.

4.3.3.1 IL-6 Produktion

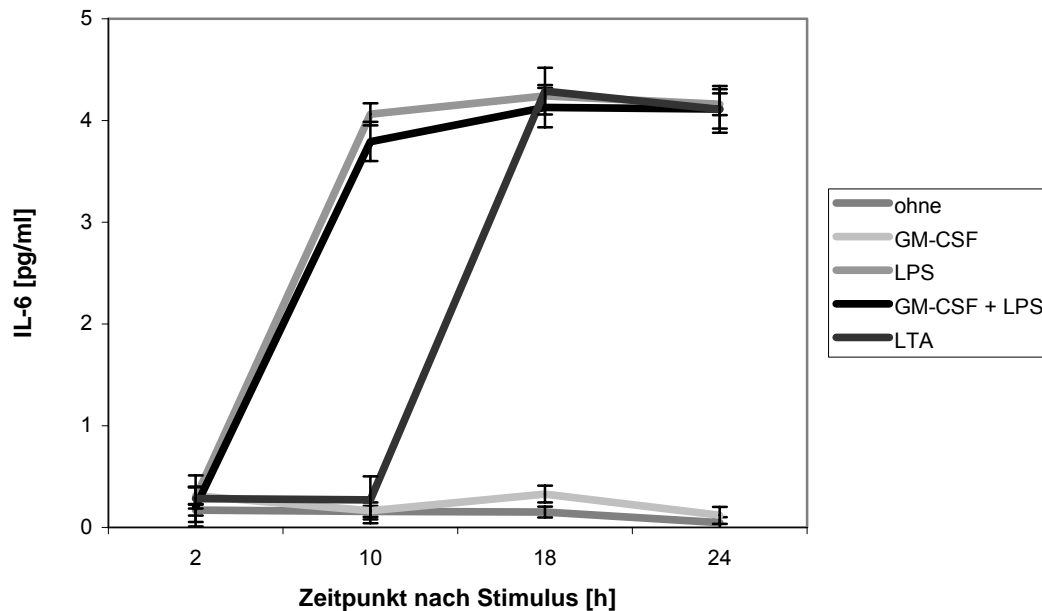


Abbildung 29: IL-6-Produktion dendritischer Zellen nach Stimulation

Aus CD14⁺-Monozyten wurden iDZ generiert, diese mit LPS (10ng/ml), LTA (5µg/ml), GM-CSF (10ng/ml) oder GM-CSF (10ng/ml) und LPS (10ng/ml) stimuliert oder unstimuliert gelassen. Zu definierten Zeitpunkten nach Stimulation (2h, 10h, 18h und 24h) wurden Überstände abgenommen, in diesen wurde das Zytokin IL6 mittels ELISA-Technik gemessen.

Ohne Stimulus wird von den iDZ über den gesamten Zeitraum von 24h eine gleichbleibend geringe Menge (unter 0,3pg/ml) IL-6 produziert, Stimulation mit GM-CSF beeinflusst dies nicht. Inkubation der Zellen mit LPS, mit und ohne GM-CSF-Vorstimulus, führt zu einer deutlichen IL-6-Freisetzung von ca. 4pg/ml nach zehn Stunden, die über den gemessenen Zeitraum von 24h gleich stark nachweisbar ist. LTA-Stimulation führt zu einer späteren IL6-Produktion. Das Zytokin ist erst nach 18h mit ca. 4pg/ml nachweisbar. Nach 24h ist eine IL-6 Konzentration von 4,1pg/ml im Überstand messbar.

4.3.3.2 IL-12p40 Produktion

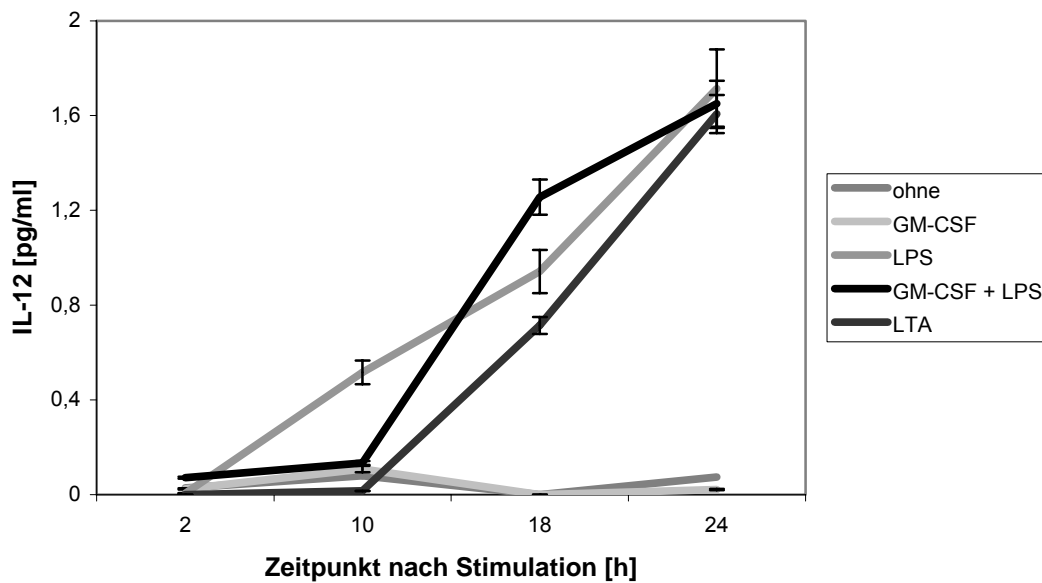


Abbildung 30: IL-12p40 Produktion dendritischer Zellen nach Stimulation

Aus CD14⁺-Monozyten wurden iDZ generiert, diese mit LPS (10ng/ml), LTA (5µg/ml), GM-CSF (10ng/ml) oder GM-CSF (10ng/ml) und LPS (10ng/ml) stimuliert oder unstimuliert gelassen. Zu definierten Zeitpunkten nach Stimulation (2h, 10h, 18h und 24h) wurden Überstände abgenommen, in diesen wurde IL12p40 mittels ELISA-Technik gemessen.

Ohne Stimulation produzieren DZ nur wenig IL-12, über den gesamten Zeitraum von 24h weniger als 0,2pg/ml. GM-CSF-Stimulation verändert die IL-12 Produktion nicht. Nach Inkubation der Zellen mit LPS ist eine IL12 Produktion messbar, nach 24h bis zu 1,6pg/ml. Mit GM-CSF Vorstimulus beginnt die IL-12 Produktion später, erst nach 18h ist ein Anstieg auf über 1,2pg/ml messbar. 24h nach GM-CSF und LPS Stimulation ist eine Menge 1,6pg/ml nachweisbar. Inkubation mit LTA führt erst nach 18h zu einer IL-12 Produktion von etwa 0,7pg/ml, 6h verzögert ist aber eine Erhöhung der IL-12 Produkton auf bis zu 1,6pg/ml messbar.

4.4 PCR-Nachweis von TLR2, 3, 4 und 9

4.4.1 Konventionelle PCR

Eine konventionelle PCR zum Nachweis von TLR erfolgte beispielhaft für TLR4 und 9.

4.4.1.1 TLR4-PCR

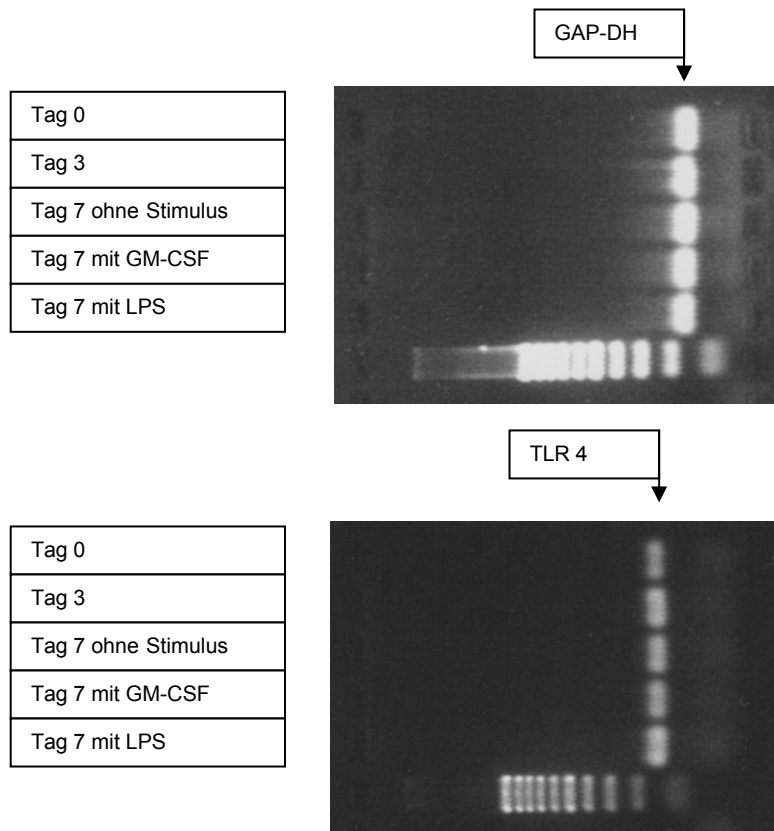


Abbildung 31: Gel-Elektrophorese der TLR4-PCR

CD14⁺-Monozyten wurden mittels MACS aus PBMC isoliert und zu dendritischen Zellen differenziert. An den Kulturtagen 0, 3 und 7 sowie nach GMCSF- oder LPS-Stimulus wurde die TLR4-Expression der Zellen mittels konventioneller PCR gemessen.

TLR4-RNA ist zu allen untersuchten Zeitpunkten der Zellkultur nachweisbar.

4.4.1.2 TLR9-PCR

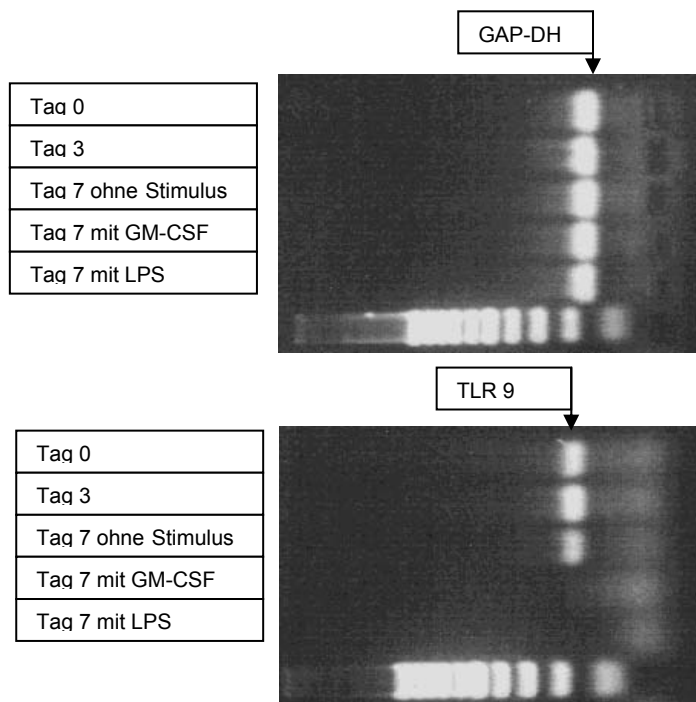


Abbildung 32: Gel-Elektrophorese der konventionellen TLR9-PCR

CD14⁺-Monozyten wurden mittels MACS aus PBMC isoliert und zu dendritischen Zellen differenziert. An den Kulturtagen 0, 3 und 7 sowie nach GMCSF- oder LPS-Stimulus wurde die TLR9-Expression der Zellen mittels konventioneller PCR gemessen.

TLR9-RNA ist nur in den unstimulierten Zellen an Tag 0, 3 und 7 vorhanden. Nach Stimulation mit GM-CSF oder LPS ist keine TLR9-RNA mehr nachweisbar.

4.4.2 TaqMan[®]-PCR von TLR2, 3, 4 und 9

In dieser Versuchsreihe wurde die TLR-Expression im Laufe von siebentägigen Kulturen mittels TaqMan[®]-PCR an Tag 0, 3, 5 und 7 bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte je zweier Messungen eines repräsentativen Experimentes von drei unabhängigen Spendern.

4.4.2.1 TLR2

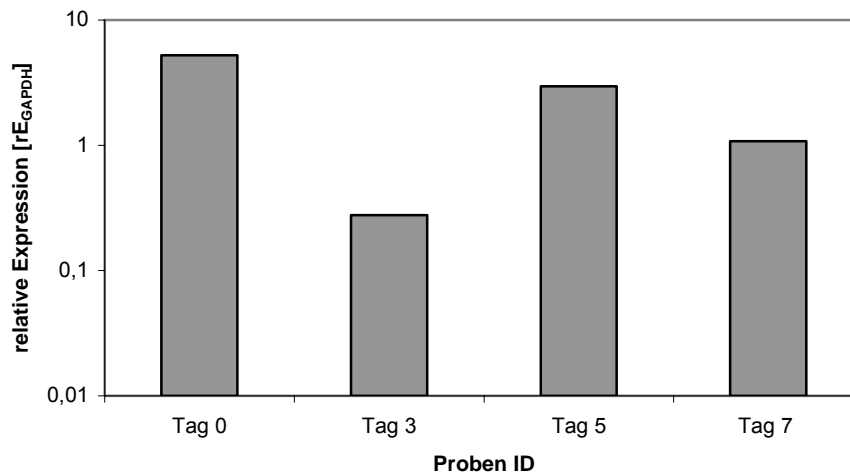


Abbildung 33: Isolation CD14⁺-Monozyten aus PBMC

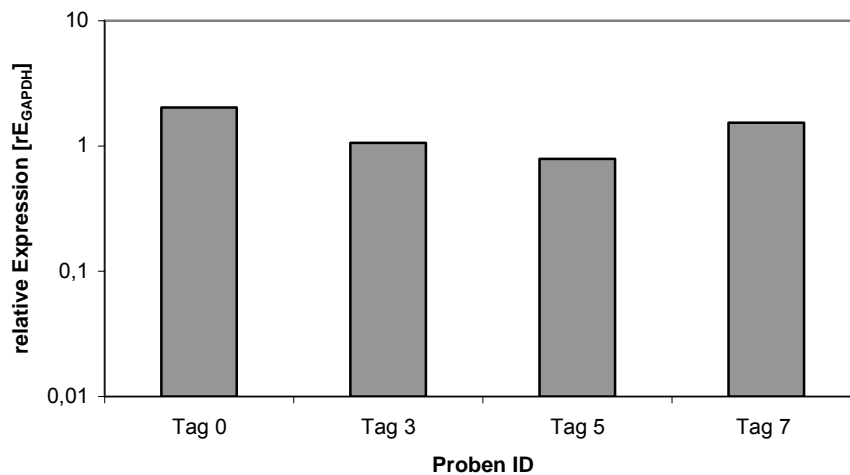
Aus PBMC wurden CD14⁺-Monozyten isoliert und mit GM-CSF (10ng/ml) und IL-4 (500U/ml) stimuliert und in Click/RPMI-Medium (10% FCS) bei 36°C und 5% CO₂-Begasung kultiviert. An den Tagen 0, 3, 5 und 7 wurde aus jeweils 1 x 10⁶ Zellen die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und diese cDNA in einer TaqMan[®]-PCR amplifiziert. Untersucht wurde die Expression TLR2-RNA im Vergleich zu GAPDH.

TLR2 wird an allen Tagen exprimiert. Am stärksten ist die RNA-Expression an Tag 0. An Tag 3 ist die TLR2-RNA am geringsten. An Tag 5 ist sie fast wieder auf dem Level von Tag 0 um am siebten Tage wieder leicht abzusinken.

4.4.2.2 TLR3

TLR3 ist an keinem Kulturtag nachweisbar.

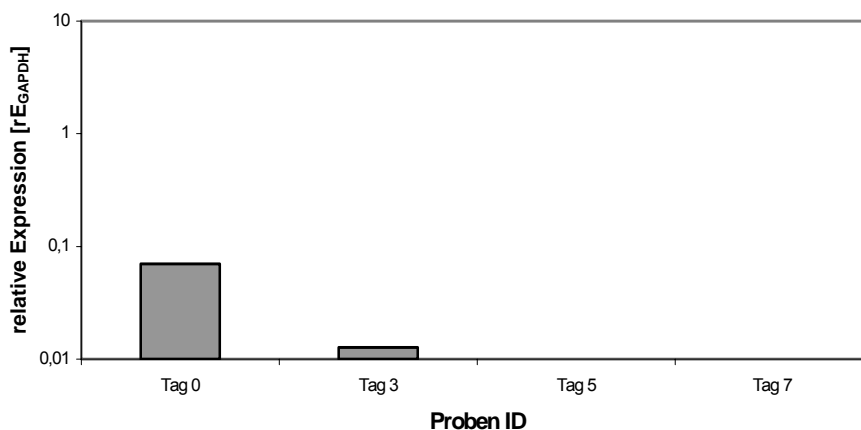
4.4.2.3 TLR4

**Abbildung 34: Isolation CD14⁺-Monozyten aus PBMC**

Die Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen und an den Tagen 0, 3, 5 und 7 wurde aus jeweils 1×10^6 Zellen RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und diese cDNA in einer TaqMan[®]-PCR amplifiziert. Untersucht wurde die Expression TLR4-RNA im Vergleich zu GAPDH.

TLR4-RNA ist an allen Kulturtagen nachweisbar. An Tag 0 ist die RNA-Expression am stärksten, über Tag 3 bis Tag 5 sinkt sie ab, um am siebten Kulturtag wieder stärker nachweisbar zu sein.

4.4.2.4 TLR9

**Abbildung 35: Isolation CD14⁺-Monozyten aus PBMC**

Die Zellen wurden wie oben beschrieben gewonnen und an den Tagen 0, 3, 5 und 7 wurde aus jeweils 1×10^6 Zellen RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und diese cDNA in einer TaqMan[®]-PCR amplifiziert. Untersucht wurde die Expression TLR9-RNA im Vergleich zu GAPDH.

TLR9-RNA ist an Tag 0 und weniger stark an Tag3 vorhanden. Nach 5 Kulturtagen ist der Rezeptor mittels TaqMan[®]-PCR nicht mehr nachweisbar.

4.4.3 TLR2, 3, 4 und 9 auf verschiedenen Zelltypen (rtPCR)

Untersucht wurden die Expression der Toll-like-Rezeptoren 2, 3, 4 und 9 auf T-Zellen (Jurkat-Zellen, T-Zellkultur), B-Zellen (Raji-Zellen, B-Zellkulturlinie), auf aus Nabelschnurstammzellen generierten Monozyten (Mo240) und dendritischen Zellen (DZ170), sowie auf frisch isolierten CD14⁺-Monozyten, auf unreifen DZ (iDZ) nach sechs Kulturtagen und auf reifen DZ (mDZ) [iDZ nach 24h Inkubation mit LPS (10ng/ml)].

4.4.3.1 TLR2

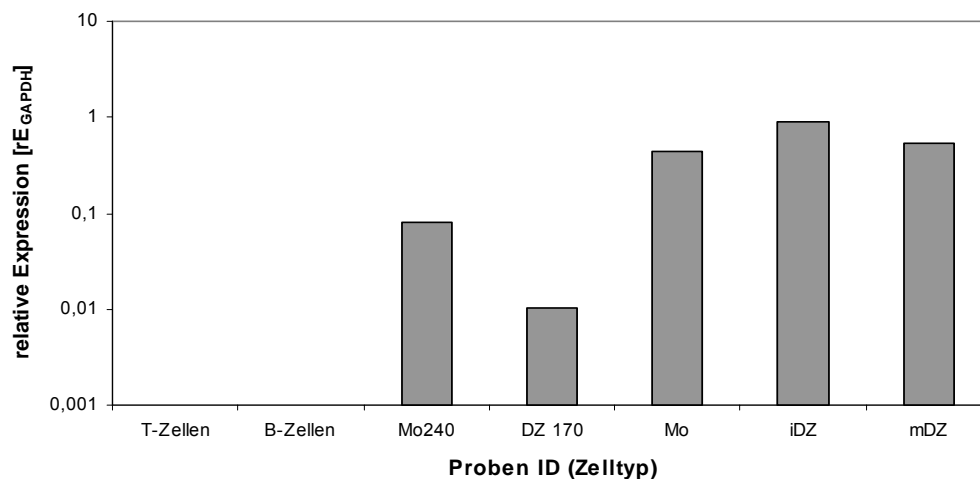
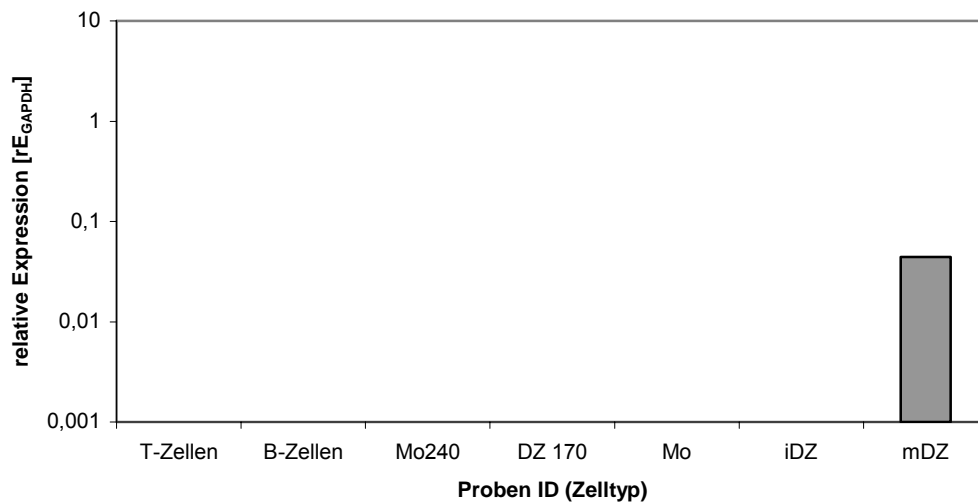


Abbildung 36: Isolation CD14⁺-Monozyten aus PBMC

Aus PBMC wurden CD14⁺-Monozyten (Mo) isoliert und nach GMCSF und IL4 Stimulus 6 Tage zu iDZ kultiviert, diese wurden 24h mit LPS inkubiert (mDZ). Aus Nabelschnurstammzellen wurden Monozyten (Mo240) und dendritische Zellen (DZ170) generiert. T-Zellen und B-Zellen stammten aus entsprechenden Zellkulturlinien. Aus jeweils 1x10⁶ Zellen wurde die RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und diese cDNA in einer TaqMan[®]-PCR amplifiziert. Untersucht wurde die Expression von TLR2-RNA im Vergleich zu GAPDH.

TLR2 wird in Zellkulturlinien von T- und von B-Zellen nicht exprimiert. In stammzellgenerierten Monozyten (Mo240) wird TLR2-RNA stärker als in stammzellgenerierten dendritischen Zellen (DZ170) exprimiert. Deutlich stärker ist TLR2-RNA in den aus PBMC generierten Zellen vorhanden, wobei in CD14⁺-Monozyten (Mo) und reifen Dendriten (mDZ) TLR2-RNA etwa gleichstark und in iDZ sogar noch einmal geringfügig stärker nachweisbar ist.

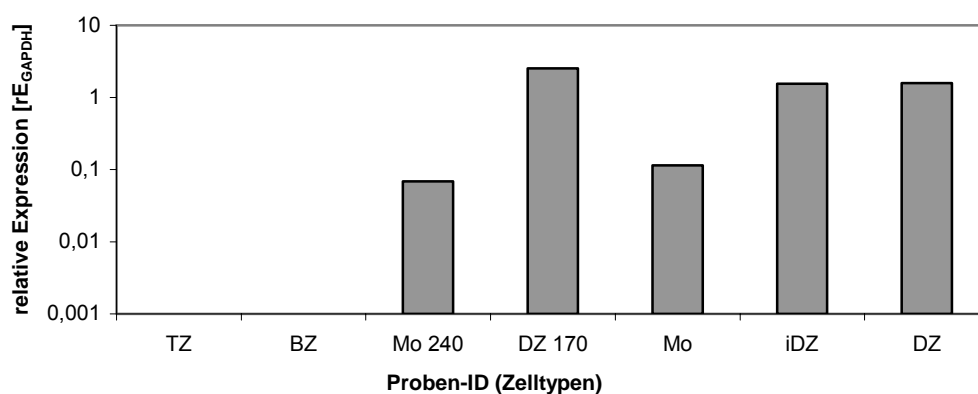
4.4.3.2 TLR3

**Abbildung 37: Isolation CD14⁺-Monozyten aus PBMC**

Der Versuch wurde analog zu 4.4.3.1 durchgeführt. Untersucht wurde die Expression von TLR3-RNA im Vergleich zu GAPDH.

TLR3-RNA ist nur in aus CD14⁺-Monozyten generierten, reifen dendritischen Zellen (mDZ) nachweisbar. Auf T-Zellen, B-Zellen, aus Stammzellen generierten Monozyten und DZ sowie kultivierten Monozyten und unreifen dendritischen Zellen ist TLR3 nicht nachweisbar.

4.4.3.3 TLR4

**Abbildung 38: Isolation CD14⁺-Monozyten aus PBMC**

Der Versuch wurde analog zu 4.4.3.1 durchgeführt. Untersucht wurde die Expression von TLR4-RNA im Vergleich zu GAPDH.

TLR4-RNA ist in den Zellkulturlinien der T- und B-Zellen nicht nachweisbar. Stammzellgenerierte Monozyten exprimieren TLR4-RNA, stammzellgenerierte

DZ exprimieren sie am stärksten von allen Zelltypen. In den aus PBMC generierten CD14⁺-Monozyten ist TLR4-RNA stärker nachweisbar als in den stammzellgenerierten Monozyten. In unreifen und reifen aus PBMC generierten DZ ist TLR4 gleichstark nachweisbar, aber geringfügig schwächer als in den stammzellgenerierten DZ.

4.4.3.4 TLR9

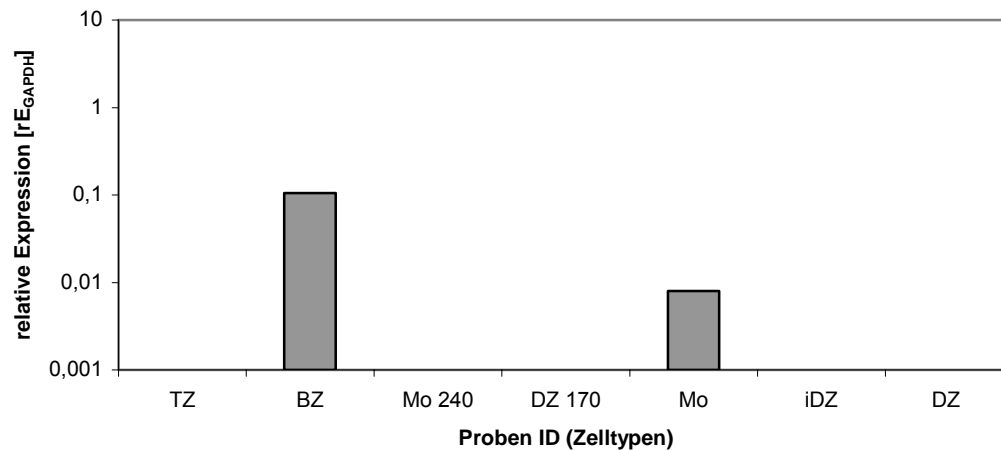


Abbildung 39: Isolation CD14⁺-Monozyten aus PBMC

Der Versuch wurde analog zu 4.4.3.1 durchgeführt. Untersucht wurde die Expression von TLR9-RNA im Vergleich zu GAPDH.

TLR9 wird nur von B-Zellen und CD14⁺-Monozyten direkt nach Isolation exprimiert. B-Zellen exprimieren TLR9 deutlich stärker.

4.4.4 TLR-Expression nach verschiedenen Stimuli (rtPCR)

In dieser Versuchsreihe wurden die TLR2, 3, 4 und 9 Expressionen auf iDZ nach verschiedenen Stimuli ermittelt.

4.4.4.1 TLR2-Expression

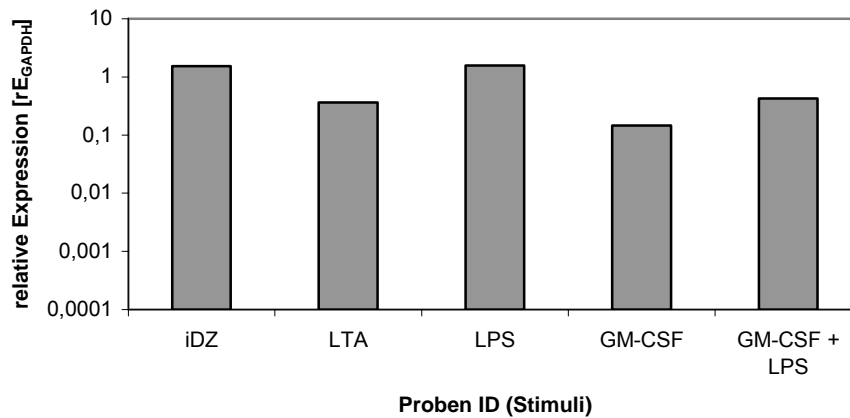


Abbildung 40: TLR2 auf iDZ nach verschiedenen Stimuli

TLR2 auf iDZ und nach verschiedenen Stimuli; dendritische Zellen wurden wie oben beschrieben generiert und diesen am sechsten Tag LPS (10ng/ml), LTA (5 μ gng/ml), GM-CSF (10ng/ml) oder GM-CSF (10ng/ml) und LPS (10ng/ml) hinzugefügt und für 24h inkubiert. Aus diesen Zellen wurde RNA isoliert, diese in cDNA umgeschrieben und in den erhaltenen Proben mit einer TaqMan[®]-PCR die relative TLR-RNA-Expression von Toll-like-Rezeptor 2 (TLR2) ermittelt.

Die Expression der TLR2-RNA wird durch Stimulation mit LPS nicht beeinflusst. Mit LPS stimulierte DZ exprimieren TRL2 gleichstark wie unreife dendritische Zellen (iDZ). Inkubation mit LTA über 24h führt zu einer deutlich geringeren TLR2-RNA-Expression. GM-CSF und GM-CSF mit LPS als Stimuli verringern ebenfalls die Expression, wobei dies durch einen GM-CSF-Stimulus am stärksten erfolgt.

4.4.4.2 TLR3-Expression

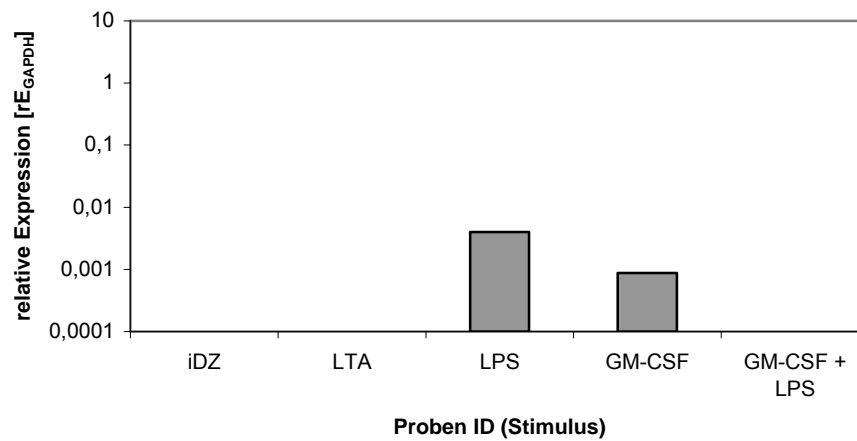


Abbildung 41: TLR3 auf iDZ nach verschiedenen Stimuli

TLR3 auf iDZ; analog zu 4.4.4.1 wurde mittels TaqMan[®]-PCR die relative TLR-RNA-Expression von TLR3 ermittelt.

Unstimulierte iDZ exprimieren kein TLR3, Stimulation mit LTA vermag an der Expression nichts zu ändern. Nach Inkubation mit GM-CSF ist TLR3-RNA schwach nachweisbar. Stimulation mit LPS oder GM-CSF führt zu einer deutlichen TLR3 Expression, im Gegensatz zur Stimulation mit GM-CSF und LPS die keine TLR3 Expression induziert.

4.4.4.3 TLR4-Expression

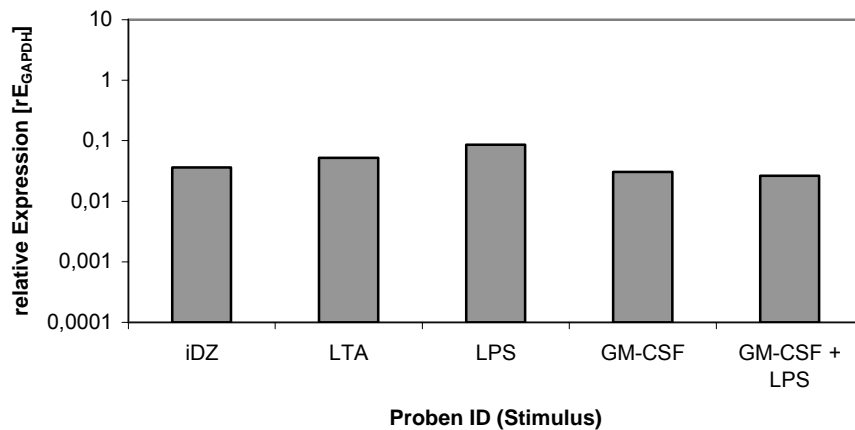


Abbildung 42: TLR4 auf iDZ nach verschiedenen Stimuli

TLR4 auf iDZ: analog zu 4.4.4.1 wurde mittels TaqMan[®]-PCR die relative TLR-RNA-Expression von TLR4 ermittelt.

TLR4-RNA ist in allen Zellen nachweisbar. In iDZ, mit GM-CSF sowie mit GM-CSF und LPS stimulierten Zellen ist TLR4 gleichstark nachweisbar. LTA-Stimulation führt zu einer leicht höheren TLR4-Expression, Stimulation mit LPS zu einer geringfügig höheren.

4.4.4.4 TLR9-Expression

TLR9-RNA ist in keinem Zelltyp nachweisbar.

4.5 Oberflächenexpression von TLR2 und 4

TLR2 und TLR4 Expression wurde auf iDZ und nach verschiedenen Stimuli mittels Durchflusszytometrie gemessen. Die Antikörper gegen TLR2 und TLR4 waren freundliche Überlassungen von T. Espevik (Institute of Cancer Research and Molecular Biology, NTNU, Trondheim) ^{41,79,97}.

4.5.1 TLR2-Expression

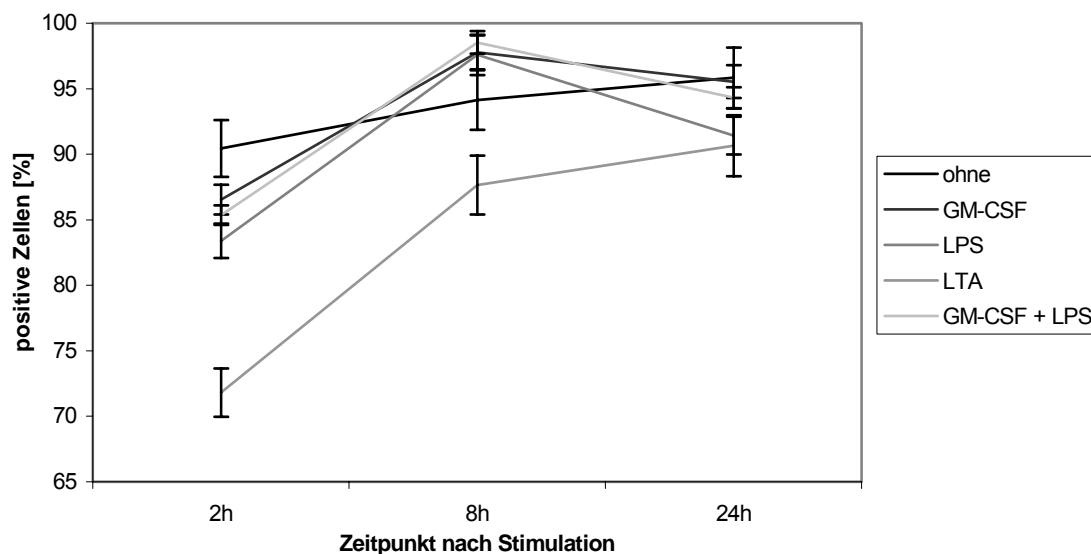


Abbildung 43: TLR2-Expression nach verschiedenen Stimuli

iDZ wurden wie beschrieben gewonnen und mit LPS (10 ng/ml), LTA (5µgng/ml), GM-CSF (10ng/ml) oder GM-CSF (10ng/ml) und LPS (10ng/ml) stimuliert, ein Teil der Kultur blieb unstimuliert. Nach 24h wurden die Zellen wie beschrieben geerntet. Zur Markierung von TLR2 wurde zunächst ein primärer Antikörper gegen den Rezeptor eingesetzt, an diesen wiederum wurde ein spezifischer, FITC-markierter Sekundäntikörper gekoppelt, mit dessen Hilfe sich die Oberflächenexpression von TLR 2 darstellen ließ.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Oberflächenexpression des TLR2-Proteins nach verschiedenen Stimuli. Die TLR2-Expression steigt in einem Zeitraum von 24h konstant, 90% der unstimulierten Zellen tragen TLR2, 24h später tragen 95% der Zellen TLR2. Der Verlauf der TLR2-Expression auf mit GM-CSF und LPS stimulierten Zellen verläuft ähnlich: nach 2h tragen 85% der Zellen TLR2, nach 8h ist ein Maximum von über 95% TLR2 tragender Zellen erreicht, nach 24h wird der Rezeptor noch von ca. 95% der DZ getragen. LTA Stimulation bewirkt, dass nach 2h nur noch 72% der Zellen TLR2 tragen. Im Laufe der nächsten 22h steigt die Expression wieder auf knapp 90% an. Die Ausreifung mit GM-CSF und LPS führt nach 8h zu einer Expression von TLR2

auf 98% der Zellen, auch diese Expression fällt wieder ein wenig ab auf ca. 95% TLR2 tragende Zellen nach 24h.

4.5.1 TLR4-Expression

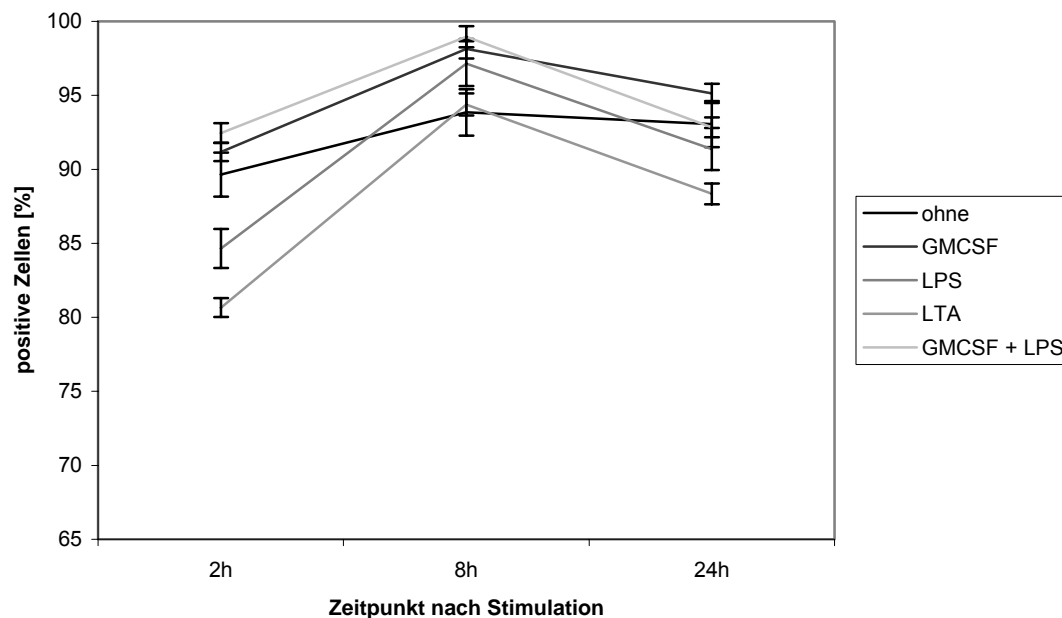


Abbildung 44: TLR4-Expression nach verschiedenen Stimuli (FACS)

iDZ wurden wie beschrieben gewonnen und mit LPS (10 ng/ml), LTA (5µgng/ml), GM-CSF (10ng/ml) oder GM-CSF (10ng/ml) und LPS (10ng/ml) stimuliert, ein Teil der Kultur blieb unstimuliert. Nach 24h wurden die Zellen wie beschrieben geerntet. Zur Markierung von TLR4 wurde zunächst ein primärer Antikörper gegen den Rezeptor eingesetzt, an diesen wiederum wurde ein spezifischer, FITC-markierter Sekundäntikörper gekoppelt, mit dessen Hilfe sich die Oberflächenexpression von TLR4 darstellen ließ.

Dargestellt ist der zeitliche Verlauf der Oberflächenexpression von TLR4 nach verschiedenen Stimuli. Die Population TLR4-tragender, unstimulierter Zellen steigt über 24h kontinuierlich von 89% auf 92%. 2h nach GM-CSF-Stimulus tragen 90% der DZ TLR4, nach 8h ist ein Maximum von 97% TLR4-tragender Zellen erreicht, das dann nach weiteren 16h auf 95% TLR4-tragende Zellen abfällt. Die TLR4-Expression nach Inkubation mit LPS verläuft ähnlich: von 85% positiver Zellen nach 2h steigt die Expression auf 96% TLR4-tragende DZ nach 8h, nach 24h exprimieren noch 92% der Zellen den Rezeptor. Auch LTA bewirkt einen solchen Verlauf, mit einem Anstieg von 80% TLR4-tragender Zellen nach 2h auf 93% nach 8h und einem Abfallen auf 89% nach 24h. LPS-Stimulation mit GM-CSF-Vorinkubation führt nach 8h bei 99% der Zellen zu einer TLR4-Expression, nach 24h Kultur tragen noch 92% der Zellen den Rezeptor.

5. Diskussion

Humane myeloide dendritische Zellen exprimieren TLR2 und TLR4 funktionell in allen Ausreifungsstadien – der Nachweis konnte auf allen Ebenen geführt und ihre Funktion gezeigt werden. TLR3 ist nur auf bestimmten, reifen DZ nachweisbar, während der Differenzierungsperiode gar nicht – die Erkennung von dsRNA durch TLR3¹²⁹ ist diskussionswürdig. Humanen myeloiden DZ tragen kein TLR9 – ein Nachweis gelang nicht, wie aufgrund der fehlenden CG-spezifischen Reaktion zu erwarten war. Die eingangs gestellten Fragen bezüglich der TLR-Expression durch humane myeloide DZ während Ihrer Ausreifung konnten beantwortet werden.

Im Weiteren wurde die Regulation der TLR 2, 3, 4 und 9 durch exogene (PAMPs) und endogene (z.B. GM-CSF) Ausreifungsfaktoren von unreifen zu reifen DZ untersucht. TLR2 und 4 blieben exprimiert und funktionell, TLR3 wird nur von bestimmt gereiften DZ getragen. TLR9 war nicht nachzuweisen und scheint unabdingbar für die Erkennung von ODN.

In der Literatur zeigt sich immer mehr ein Unterschied von Maus und Mensch bezüglich der TLR-Expression und -Funktion. Insbesondere in Bezug auf die dendritischen Zellen sind das humane und das murine System immer schwerer vergleichbar geworden. Zwar sind an murinen Zellen die Grundlagen zum Verständnis des menschlichen Immunsystems erforscht worden, doch bleiben der Umfang und die Tragweite der gezeigten Unterschiede bzw. Gemeinsamkeiten ein spannendes Thema zukünftiger Arbeit.

Um die eingangs gestellten Fragen beantworten zu können, wurde zunächst ein System zur Anzucht humaner myeloider dendritischer Zellen aus adulten CD14⁺ Monozyten etabliert (nach Romani et al.¹¹²). Unreife DZ wurden durch Stimulation mit LPS, LTA und verschiedenen ODN weiter ausgereift und das Potenzial dieser Stimuli, eine Ausreifung zu induzieren verglichen. Ausreifungskriterium war neben der Expression spezifischer Oberflächenmarker insbesondere die gemischte Leukozytenreaktion (GLR).

Im Laufe der Kultur ändert sich nicht nur Morphologie der einzelnen Zellen und das Gesamtbild der Kultur^{8,106,143}, sondern auch das Expressionsmuster der

spezifischen Oberflächenmarker (CD14, CD1a, CD83, CD 40, CD80, CD86) in typischer Weise. CD14 wird nur auf Monozyten und daher im Laufe der Kultur von immer weniger Zellen exprimiert^{8,78,103,106,118,143}. CD1a, als typischer Oberflächenmarker dendritischer Zellen mit kostimulatorischen Fähigkeiten^{54,92}, wird früh während der Ausreifung getragen und von voll ausgereiften Zellen wieder schwächer exprimiert, was sowohl von Steinman¹⁰⁶ als auch von Pickl et al.⁶² beschrieben wird. CD83 dahingegen wird nur von reifen DZ getragen^{106,73-75}. CD40^{20,86,106,107,143} und CD86^{31,33-36,95} sowie MHC-I und MHC-II werden im Laufe der Kultur deutlich hochreguliert^{21,55,56,106}. CD80^{1,76,106,107,121} konnte nicht auf Monozyten nachgewiesen werden, sondern erst auf unreifen DZ. Was in der Literatur kontrovers beschrieben wird, so wird CD80 teils bereits auf PBMC nachgewiesen¹⁴⁴, teils erst auf stimulierten Zellen¹⁰⁶. Die oben dargestellten Ergebnisse in Zusammensicht mit den Ergebnissen anderer Gruppen, unter anderem von Pickl¹⁰⁶ und Sharpe¹²¹, legen somit nahe, dass die von Wittmann et al.¹⁴⁴ gesehene CD80-Expression durch PBMC durch eine Vorstimulation ausgelöst wurde. Obschon die Expression von CD80 durch unreife und auch reife dendritische Zellen unbestritten bleibt.

Neben dem Phänotyp ändern sich auch die funktionellen Eigenschaften der Zellen: Die Kapazität zur Aktivierung naiver T-Zellen in der GLR (GLR, gemischte Leukozyten-Reaktion) ist das funktionelle Kriterium dendritischer Zellen und steigt dementsprechend mit zunehmender Reife der Zellen; im Gegenzug wird ein deutlicher Verlust der Phagozytosefähigkeit der Zellen beschrieben^{7,27,70,108,111,112,143}. Anhand der dargestellten Kriterien, Phänotyp und Funktion, konnte gezeigt werden, dass es sich bei den generierten Zellen um dendritische Zellen handelt.

Auf diesen DZ wurde die TLR-Expression auf verschiedenen Ebenen mit entsprechenden Methoden bestimmt. Der Nachweis erfolgte auf Ebene der mRNA sowohl mit Hilfe der konventionellen PCR als auch quantitativ mittels der TaqMan-PCR (TLR2, 3, 4 und TLR9). Erst durch die TaqMan-PCR wurde es möglich, die mRNA-Expressionstärken der verschiedenen Differenzierungsstadien zu vergleichen. Der Nachweis von TLR2 und TLR4 auf der Zelloberfläche erfolgte im Weiteren auch durch Einsatz monoklonaler Antikörper und Durchflusszytometrie. Die zur Verfügung stehenden Antikörper

gegen TLR3 und TLR9 zeigten in mehreren Vorversuchen (Daten nicht dargestellt) keine genügende Spezifität bezüglich der Zielproteine, so dass eine Beurteilung der Oberflächenexpression von TLR3 und TLR9 nicht möglich war. In der TaqMan-PCR zum Nachweis der TLR 2, 3, 4 und 9 mRNA zu verschiedenen Differenzierungsstadien dendritischer Zellen wurden als Vergleich neben von T- und B-Zellen aus Kulturlinien auch stammzellgenerierte Monozyten und dendritische Zellen untersucht (freundliche Überlassung von U. Schauer, Bochum). So ließ sich zeigen, inwiefern die gesehenen Effekte allein Folge der Generierung waren oder als zellspezifisch zu werten sind. Wie sich im Verlauf der Arbeit zeigte, ist dies ein völlig neuer Ansatz zellartspezifische Rezeptorexpression gegen generierungsbeeinflusste abzugrenzen. Ähnliche Vergleiche sind in der Literatur bis dato nicht herangezogen worden, obwohl hier spannende weiterführende Fragestellung entwickelt werden könnten.

Mit Hilfe der quantitativen PCR (TaqMan[®]) konnte, wie bereits von Muzio¹⁰⁰, Jarrossay⁵⁹ und Reis e Sousa¹⁰⁹ beschrieben, gezeigt werden, dass TLR2 auf myeloiden DZ immer exprimiert wird. Da der Rezeptor sowohl auf konventionell generierten als auch auf stammzellgenerierten DZ aller Reifegrade nachweisbar ist, nicht aber in T- oder B-Zellen, schließt das eine Verunreinigung aus. Wie bereits aus den TaqMan-PCR-Analysen zu erwarten, war TLR2 auch auf der Oberfläche der Zellen mittels FACS-Analyse nachweisbar. Über 90% der Zellen tragen diesen Rezeptor und eine Stimulation verursachte unspezifische Regulationsvorgänge mit geringer Schwankung in der Zahl der exprimierenden Zellen. Die Ausreifung dendritischer Zellen nach LTA-Stimulus zeigt des Weiteren auch die Funktionalität von TLR2. Humane myeloide dendritische Zellen exprimieren TLR2 funktionell in allen Ausreifungsstadien^{100,59,109}.

TLR4-mRNA kann zu allen Zeitpunkten in den Zellen nachgewiesen werden, in Monozyten wie unreifen und reifen DZ, sowohl konventionell gezüchtet als auch aus Stammzellen generiert. Die Reaktivität auf LPS bleibt über die gesamte Kulturperiode erhalten, wie die ausreifungstypischen OFA-Veränderungen nach LPS-Stimulation zeigen, somit ist TLR4 auch funktionell. Wie auch TLR2 war TLR4 auf der Zelloberfläche mittels FACS-Analyse nachweisbar. Eine Stimulation verursachte ebenso unspezifische Regulationsvorgänge der TLR-

Expression mit geringer Schwankung in der Zahl der exprimierenden Zellen (über 90%). Eine Hochregulation von TLR4 nach LPS-Stimulation, wie beschrieben von Muzio¹⁰⁰, konnte weder auf mRNA-Level noch an der Oberfläche gezeigt werden. Der kontinuierliche Nachweis von TLR4 zu allen Kulturzeitpunkten steht im Einklang mit der aktuellen Literatur^{52,59,61,109}.

TLR9-mRNA konnte nur in unstimulierten CD14⁺-Monozyten sowie im Vergleich zu TLR2- oder TLR4-mRNA in deutlich geringeren Mengen nachgewiesen werden. Der fehlende Nachweis in unreifen und reifen DZ sowie der Hinweis aus der Literatur, insbesondere durch die Arbeiten von Hornung et al.⁵², dass sowohl plasmazytoide DZ^{52,59} als auch B-Zellen^{50,52,128,137} TLR9 hoch exprimieren, führten zu dem Verdacht, dass der Nachweis zu Beginn der Kulturen auf verunreinigende Zellen zurückzuführen sein könnte. Eine spezifische Reaktion der Zellen auf CpG-ODN wiederum, die nicht gezeigt werden konnte, hätte diesen Verdacht teilweise entkräften können. Zum Ausschluss oder Nachweis von Verunreinigungen wurden die Zellen erstens durchflusszytometrisch zu verschiedenen Kulturzeitpunkten auf die postulierten Zellpopulationen, plasmazytoide DZ und B-Zellen, untersucht. Zum zweiten wurden stammzellgenerierte Monozyten und DZ, bei denen Kontaminationen auf Grund der Anzuchtbedingungen und Isolationsprotokolle ausgeschlossen sind, auf ihren TLR9-mRNA-Gehalt untersucht. Sowohl der positive Nachweis von verunreinigenden Zellen, insbesondere von BDCA2 und 4 positiven plasmazytoiden DZ und in geringerem Umfang von CD19⁺-B-Zellen, als auch der fehlende Nachweis von TLR9-mRNA in stammzellgenerierten Zellen, weisen den initialen Nachweis von TLR9-mRNA als verunreinigungsbedingt aus. Zu späteren Kulturzeitpunkten konnte keine TLR9-mRNA nachgewiesen werden, da die kontaminierenden Zellen die mehrtägige Kultur wohl aufgrund fehlender Überlebensfaktoren nicht überstehen. Myeloide DZ exprimieren zu keinem Zeitpunkt TLR9, was auch in der Literatur so beschrieben ist^{7,11,27,52,70,105,111} und die Ergebnisse dieser Arbeit somit bestätigt. Die fehlenden spezifischen Reaktionen auf CpG-ODN unterstützen dies und deuten im Umkehrschluss an, dass TLR9 essentiell für die CpG-Erkennung durch humane Zellen ist, auch wenn TLR9 eventuell noch weitere Strukturen zur Signaltransduktion benötigt, worauf eine beschriebene differentielle Erkennung

von D- und K-CpG-Motiven durch plasmazytoide DZ hindeutet
29,46,49,61,63,69,136,137

Es konnte gezeigt werden, dass CpG-ODN im Endosom erkannt^{68,47} werden und auch dass TLR9 im Endosom exprimiert wird². Ein direkter Nachweis, dass CpG-ODN im Endosom an TLR9 binden, konnte bis dato nicht erbracht werden. Dennoch könnte die fehlende Reaktion der Zellen auch ein Problem der Aufnahme (des „Uptake“) sein, weshalb diese genauer untersucht wurde. Wie dargestellt gibt es bei immunstimulatorischen ODN Unterschiede bezüglich der Sequenz, im humanen System CpG-D-ODN und CpG-K-ODN, und bezüglich der Rückgratstruktur, Phosphodiester (PO-ODN) und Phosphothioatester-ODN (PTO-ODN). Es konnte gezeigt werden, dass ODN von unreifen ebenso wie von reifen DZ aufgenommen werden. Wie auch im murinen System^{131,147} gezeigt werden konnte, ist die Aufnahme nicht sequenzspezifisch, die Aufnahme von 2006-PTO und 2006K-PTO unterscheidet sich nicht signifikant. Im murinen System beeinflusst aber die Rückgratstruktur erheblich die Aufnahme von CpG-ODN. Phosphothioat-ODN werden sehr viel effizienter aufgenommen als Phosphodiester-ODN^{131,147}. Phosphothioat-Modifikationen wurden dem Rückgrat hinzugefügt um die Stabilität der ODN zu erhöhen. Diese PTO-ODN haben auch ein intrinsisches, von den CpG-Motiven unabhängiges, stimulatorisches Potential. Zudem scheinen sie der Literatur nach ein den PO-ODN gegenüber leicht verändertes Aktivierungsprofil zu induzieren^{10,120}. Es konnte analog zur Literatur¹⁰ gezeigt werden, dass auch humane myeloide DZ PTO-ODN geringfügig besser aufnehmen als PO-ODN. Eine Reaktion blieb allerdings aus, weder Funktion noch Phänotyp änderten sich im Vergleich zu unstimulierten iDZ. Dies deutet zum einen indirekt auf das Fehlen von TLR9 und unterstreicht trotz ungelöster Korezeptorenfrage⁴⁹ die Notwendigkeit von TLR9 für die ODN-Erkennung. Zum anderen beweist es in Zusammenschau mit dem fehlenden Nachweis von TLR9-mRNA, dass humane myeloide DZ und deren Vorläuferzellen keinen TLR9 tragen, im Gegensatz zu murinen DZ.

Es gibt mehrere artspezifische Unterschiede zwischen Maus und Mensch: Zum einen wird TLR9 nicht von allen DZ-Subtypen des menschlichen Immunsystems getragen, im Gegensatz zu murinen DZ, die alle TLR9 tragen^{7,11,27,52,70,105,111}; Zum anderen unterscheiden sich die erkannten Sequenz-

Motive der von murinen und humanen DZ erkannten ODN²⁹. In murinen Zellen konnte gezeigt werden, dass CpG-ODN in der Lage sind lang anhaltende Veränderungen der Immunreaktion auszulösen³⁰, über TLR9 als Impf-Adjuvantien zu wirken⁸⁰ und TH1-gerichtete Immunantworten zu induzieren, was ihnen einen protektiven Effekt in Modellen atopischer Erkrankungen und in TH2-assoziierten Infektionen zukommen lässt^{64,148}. Auch ein vorteilhafter Effekt von CpG-ODN in Krebs-Modellen konnte gezeigt¹⁴⁰ werden. In allen Bereichen blieben vergleichbare Ergebnisse bei menschlichen Zellen bis dato aus. Nur die potentielle Fähigkeit von CpG-ODN über TLR9 als Impf-Adjuvantien zu wirken ist ein Feld intensiver Forschung mit der Zielrichtung klinischer Anwendbarkeit⁸⁰.

Neben der Expression von TLR2 und TLR4, die in allen Ausreifungsstadien getragen werden und funktionell sind, und der Expression von TLR9, der von myeloiden humanen DZ nicht getragen wird, wurde die Expression von TLR3 untersucht. Während der Differenzierung von CD14⁺-Monozyten zu unreifen DZ wird TLR3 nicht exprimiert. Nach weiterer Ausreifung zu DZ ist TLR3 allerdings teilweise nachweisbar. TLR3-RNA kann in mit LPS ausgereiften Zellen nachgewiesen werden^{100,109,138}. Sogar eine Stimulation mit GM-CSF, das wie gezeigt nur eine schwache Potenz zur Ausreifung von DZ hat, führt zu einer TLR3-Expression. Die Stimulation mit beiden Agenzien könnte somit einen kumulativen Effekt haben. Vorinkubation mit GM-CSF und nachfolgend mit LPS ist die potenteste Stimulation hinsichtlich der Ausreifung dendritischer Zellen^{78,106,112}. Dieser Stimulus führt aber erstaunlicherweise dazu, dass TLR3-mRNA nicht mehr nachweisbar ist. Ein Effekt der auch von Muzio et al beschrieben wird, DZ exprimieren nach Inkubation mit LPS oder proinflammatorischen Zytokinen kein TLR3¹⁰⁰.

Eine erklärende Hypothese hierzu wäre, dass ein sehr starker Stimulus wie GMCSF und LPS die Zellen zu „überreifen DZ“ ausreifen lässt. Diese bräuchten keine Infektionsreize mehr wahrzunehmen, sondern nur noch ihrer Aufgabe, der Induktion einer Immunantwort, gerecht werden^{22,37,59}. Eine andere Erklärungsmöglichkeit wirft die Frage nach der Notwendigkeit eines Rezeptors für dsRNA, der beschriebenen Funktion von TLR3^{6,129}, auf reifen myeloiden humanen DZ auf.

Bereits sehr früh konnte gezeigt werden, dass TLR3 sich von anderen Säugetier-TLR unterscheidet. So unterscheiden sich unter anderem das murine und das humane TLR3-Protein von dem des jeweiligen TLR4 in einer wichtigen Aminosäure. Humaner TLR4 besitzt ein Prolin in der zu Prolin712 von murinem TLR4 äquivalenten Position, ein Prolin das in dieser Position auch in Toll-Rezeptoren der Drosophilafliege nachweisbar ist⁹⁰. In Versuchen mit C3H/HeJ-Mäusen wurde dieses Prolin712 durch ein Histidin ersetzt, was zur Unfähigkeit auf LPS zu reagieren führte. Auch andere TLR haben in gleichwertiger Position ein Prolin, dessen Austausch mit Histidin zum Verlust der Signalaktivität führt^{102,133}. Die Tatsache, dass TLR3 dieses konservierte und in dieser Position für die Funktion notwendige Prolin nicht hat, lässt vermuten, dass der Signalmechanismus von TLR3 von dem anderer TLR abweicht.

TLR3 erkennt dsRNA^{6,129}, ist dafür aber nicht der alleinige Rezeptor^{23,81,142}. Doppelsträngige RNA (dsRNA) ist eine von den meisten Viren im Laufe ihres Infektionszyklus produzierte Molekülstruktur, die als PAMP funktioniert. Ihre immunstimulatorische Potenz war seit längerem bekannt und konnte teilweise der dsRNA-abhängigen Proteinkinase PKR zugeschrieben werden. Da PKR-defiziente murine Zellen aber durch dsRNA oder das synthetische Analogon poly(I:C) weiterhin aktivierbar blieben⁴⁴, wurde nach einem weiteren Rezeptor gesucht, den man in TLR3 schließlich fand. TLR3-defiziente murine Zellen zeigen eine deutlich schlechtere Erregbarkeit durch poly(I:C) oder virale dsRNA⁶. Inwiefern dies auch für humane Zellen gültig ist, bleibt noch zu zeigen. Denn zum einen unterscheidet sich das Expressionsmuster von TLR3 auf murinen im Vergleich zu humanen DZ deutlich – analog zu TLR9 wird TLR3 nicht von allen humanen DZ getragen. Alle Subtypen muriner DZ (CD4⁺, CD8⁺, DN, PDZ) tragen TLR3¹⁰⁹. Von humanen DZ tragen nur myeloide TLR3^{59,100}, plasmazytoide tragen diesen Rezeptor nicht. Myeloide humane DZ produzieren aber kein IFN α , was eine postulierte Antwort auf eine virale Infektion wäre. Dennoch reagieren diese Zellen auf Poly(I:C)⁴⁴. Plasmazytoide humane DZ, können IFN α sezernieren und eine antivirale Immunreaktion somit induzieren, tragen aber kein TLR3⁵².

Hier eröffnet sich also die Frage nach der Notwendigkeit eines Rezeptors für virale dsRNA auf reifen humanen myeloiden DZ, deren Funktion weder die Erkennung von PAMP sein dürfte noch in der Induktion antiviraler

Immunantworten liegt. Die genaue Funktion von TLR3 bleibt zum einen speziesübergreifend von Seiten des Signalmechanismus ^{102,133}, zum anderen auch bezüglich der Vergleichbarkeit von humanem und murinem Immunsystem ein spannendes Feld für zukünftige Arbeiten ^{59,100,109}.

Es konnte gezeigt werden, dass myeloide DZ aus CD14⁺-Monozyten generiert werden können. Diese Zellen haben die typischen Eigenschaften dendritischer Zellen, sie exprimieren die charakteristischen Marker CD1a und CD83 sowie kostimulatorische Moleküle (CD40, CD80, CD86) und auch MHC-I und MHC-II. Mit Hilfe genau dieser Moleküle besitzen sie die DZ-charakterisierenden Fähigkeit, die Induktion von Proliferation naiver T-Zellen (GLR). Auch wurde gezeigt, dass myeloide DZ die Toll-like Rezeptoren 2 und 4 über den gesamten siebentägigen Verlauf der Kultur tragen. TLR3 wird nur von reifen myeloiden DZ getragen und TLR9 konnte, wie dargestellt, auf diesen Zellen nicht nachgewiesen werden. Der Frage nach einer Reaktion auf spezifische Aktivierung der einzelnen untersuchten TLR wurde nachgegangen, indem die Zellen mit jeweils für den Rezeptor spezifischen Substanzen stimuliert wurden. TLR2 erkennt Lipoteichonsäure (Lipoteichoic Acid = LTA) ¹¹⁹. Da kommerziell erhältliche LTA-Präparate erhebliche Verunreinigungen von LPS enthalten ⁹⁶, was die Abgrenzung gegenüber einem LPS-Stimulus unmöglich machen würde, wurde in dieser Arbeit hochreine, Endotoxin-freie LTA von *Staphylococcus aureus* verwendet, das immunstimulatorische Eigenschaften hat ⁹⁵ (LTA: freundliche Überlassung von T.Hartung, Konstanz). Zur TLR4-Stimulation wurde ein ebenfalls hochreines LPS verwendet (freundliche Überlassung von H. Heine, Borstel). Mit Polyinosin-Polycytidylischer Säure, kurz poly(I:C), gäbe es ein synthetisches, hochreines Analogon doppelsträngiger RNA, die über TLR3 stellvertretend für virale RNA signalisieren würde. TLR3 ist aber nicht der alleinige Erkennungsmechanismus für poly(I:C) ^{81,142}, eine Stimulation der myeloiden DZ würde also kein TLR-spezifisches Signal auslösen, weshalb eine solche auch nicht untersucht wurde. TLR9 wird für die Erkennung bakterieller DNA bzw. ihrer synthetischen Analoga CpG-ODN benötigt, wie oben dargestellt tragen myeloide Zellen kein TLR9 und können somit auch keine Reaktionen auf Stimulationen mit ODN zeigen.

Auf Stimulation unreifer myeloider DZ mit PAMP ist eine Ausreifung mit typischer Veränderung von Oberflächenantigenen (OFA), eine Steigerung der Proliferationsrate in der GLR und ein Verlust der Phagozytosefähigkeit zu erwarten. Es wurden die Reaktionen der exogenen Stimuli, LPS, LTA und ODN miteinander sowie im Unterschied zu endogenen Stimuli verglichen. Stellvertretend für endogene Stimuli, die im Entzündungsgeschehen auf unreife DZ und Makrophagen wirken, wurde Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF [Leukomax[®]]) eingesetzt, der ein ubiquitärer Entzündungsmarker ist. Gemessen an der OFA-Expression lassen LPS und LTA DZ ausreifen, endogene Stimulation mit GM-CSF verstärkt die Ausreifung noch. Nach LTA-Stimulus reifen die DZ, gemessen an der Zahl CD83 tragenden Zellen nicht so stark aus wie nach LPS-Gabe, aber exprimieren CD40 sehr viel stärker. Überraschenderweise verringern beide Stimuli die Stärke der HLA-DR-Expression, was so von anderen Gruppen nicht gesehen wurde ^{21,55,113}. Hierbei könnte es sich allerdings auch um ein kurzfristiges Phänomen im Rahmen von Regulationsvorgängen handeln, die weiter nicht untersucht wurden. Zur weiterführenden Untersuchung wäre eine Kinetik der HLA-DR-Expression nach LPS- und LTA-Stimulus aufschlussreich. CpG-Stimuli beeinflussen die Ausreifung der DZ, beurteilt anhand der Reifemarker CD14, CD1a und CD83, nicht CG-spezifisch, was ein Zeichen für das Nichtvorhandensein des ODN-spezifischen Rezeptors TLR9 ist. GM-CSF, alleine und als Vorstimulus zu CG bzw. GC, hingegen lässt die Zellen weiter ausreifen. Auch auf die kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80 und CD86 haben ODN-Stimuli keinen spezifischen Einfluss. Die Expression von HLA-ABC, dessen Hauptaufgabe die Präsentation von Virenantigenen ist, wird dadurch ebenfalls kaum beeinflusst. GM-CSF-Vorstimulation bewirkt eine leichte Steigerung der Expression. Über die HLA-DR-Expression ist das gleiche zu sagen. Endogene Stimuli benötigen einen weiteren exogenen Reiz um DZ vollständig ausreifen zu lassen, sofern für die Stimulantien Rezeptoren auf den jeweiligen Zellen vorhanden sind ¹⁴⁴.

IL-6 ist ein proinflammatorisches Interleukin, das früh und schnell Entzündungen anzeigt. Wie zu erwarten wird es nach Stimulation mit PAMPs schneller als IL-12 sezerniert ^{59,71}. Nach Stimulation mit LTA und LPS erreicht die IL6 Konzentration bereits nach 10 Stunden ein Maximum, das über einen

Zeitraum von 24h konstant gehalten wird. Bei der IL-12-Sekretion kann man ein ähnliches Reaktionsmuster sehen: LPS und LTA lösen eine geringfügig stärkere Sekretion aus. Allerdings dürfte die IL12-Sekretion im weiteren Verlauf, über die beobachteten 24h hinaus, noch deutlich steigen, wie in anderen Arbeiten gezeigt werden konnte^{22,59,65,71}.

Im Rahmen des Nachweises von die Zellkulturen verunreinigenden Zellen und zum Ausschluss generierungsspezifischer Rezeptorexpression wurden als Vergleich stammzellgenerierte DZ mituntersucht. Zu solchen Vergleichen naiver und adulter dendritischer Zellen gibt es keine Literatur. Weshalb eine Evaluierung und Einordnung der Ergebnisse schwierig ist und den Rahmen der eingangs gestellten Fragen weitaus überschreitet. Wie aus den Ergebnissen zu erwarten wird TLR2 und TLR4 von allen untersuchten Monozyten und dendritischen Zellen getragen, TLR9 hingegen nicht. Ähnlich der sonstigen Ergebnisse (s.o.) betreffend TLR3 zeigen sich hier deutliche Unterschiede: Adulte ausgereifte DZ tragen TLR3, aus Stammzellen generierte DZ tun dies nicht. Hier wären, wie oben angeführt, weitere Arbeiten zur ausführlichen, tiefgreifenden Diskussion wünschenswert und notwendig.

6. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde die Toll-Like-Rezeptor-Expression während der Entwicklung von Monozyten zu dendritischen Zellen (DZ) unterschiedlicher Reifegrade untersucht. Ausgangszellen waren CD14⁺ Monozyten aus humanem peripheren Blut, die unter Einsatz von Granulozyten-Makophagen-Kolonie-Stimulierenden-Faktor (GM-CSF) und Interleukin 4 (IL-4) zu immaturren dendritischen Zellen (iDZ) entwickelt. Die Zellen wurden anhand der Oberflächenantigen-Expression, Phagozytosefähigkeit und ihrer Aktivierungskapazität in der Gemischten-Leukozyten-Reaktion (GLR) charakterisiert. Die Expression von TLR2, 3, 4 und 9 wurde mittels realtime-PCR bestimmt und ihre Funktionalität mittels hochspezifischer Liganden für die entsprechenden Rezeptoren überprüft (TLR2: LTA, TLR4: LPS, TLR9: synthetische Oligodesoxynukleotide)

Expression und Funktion von TLR2 und TLR4 auf myeloiden DZ konnte in allen untersuchten Entwicklungsstadien gezeigt werden. TLR9 war nicht nachweisbar und eine spezifische Stimulation der Zellen durch CpG-ODN war nicht möglich. TLR3 Expression war nach Stimulation der iDZ mit GM-CSF oder LPS nachweisbar.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in dieser Arbeit myeloide dendritische Zellen generiert wurden, was anhand ihrer Oberflächenmoleküle und ihrer komplexen Funktion belegt wurde. Diese dendritischen Zellen tragen TLR2 und TLR4 zu allen Kulturzeitpunkten, aber nie TLR9. Eine Reaktion auf ODN blieb dementsprechend aus. Einerseits erklärt das Fehlen von TLR9 die ausbleibende Reaktion auf ODN-Stimuli, andererseits konnte somit auch die Notwendigkeit von TLR9 für die ODN-Erkennung unterstrichen werden.

Die Expression des vierten untersuchten TLR, TLR3 wirft abschließend jedoch Fragen auf: zum einen nach der Notwendigkeit eines Rezeptors für virale dsRNA auf *reifen* humanen myeloiden DZ, und daraus resultierend die Frage nach der Funktion von humanem TLR3. Wie der gegenüber anderen TLR vermutlichlicher Weise abweichende Signalmechanismus von TLR3^{102,133} funktioniert oder wie weit er abweicht, bleibt ein ebenso spannendes Thema,

wie die unterschiedliche Expression von TLR3 im humanen gegenüber dem murinen Immunsystem. Hier konnte anhand der TLR3- und TLR9-Expression gezeigt werden, dass sich Mensch und Maus – zumindest in Bezug auf die TLR-Expression durch DZ^{59,100,109} – doch deutlich unterscheiden.

Auch konnte erstmals ein Vergleich von adulten und naiven humanen DZ angerissen werden, dieser wurde allerdings nicht weiter vertieft, da er den Rahmen dieser Arbeit auch aufgrund fehlender vergleichbarer Literatur weit überschreiten würde. Unter den Ergebnissen bleibt aber wiederum die unterschiedliche TLR3-Expression hervorzuheben – aus naiven Zellen generierte DZ tragen kein TLR3. Insgesamt erstaunt überhaupt der Mangel an Literatur bezüglich des Vergleiches des naiven und adulten menschlichen Immunsystems.

Somit bleiben als Ausblick für zukünftige Arbeiten die Funktion und Signalwege von TLR3 genauer zu untersuchen, sowie Unterschiede von naivem und adultem humanem Immunsystem weiter herauszuarbeiten, insbesondere bezüglich dendritischer Zellen – den „Schaltzentralen“ der Immunantwort. Anhand dieser Ergebnisse ließen sich vielleicht auch die Unterschiede von murinem und humanem Immunsystem besser verstehen.

7. Literaturverzeichnis

- 1 Abbas AK.
The control of T cell activation vs. Tolerance. *Autoimmun Rev.* 2003 May;2(3):115-8
- 2 Ahmad-Nejad P, Hacker H, Rutz M, Bauer S, Vabulas RM, Wagner H.
Bacterial CpG-DNA and lipopolysaccharides activate toll-like receptors at distinct cellular compartments. *Eur J Immunol* 2002;32(7):1958-68
- 3 Akira S, Hemmi H.
Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett.* 2003 Jan;85(2):85-95
- 4 Akira S, Takeda K, Kaisho T.
Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001 Aug;2(8):675-80
- 5 Albrecht I, Tapmeier T, Zimmermann S, Frey M, Heeg K, Dalpke A.
Toll-like receptors differentially induce nucleosome remodelling at the IL-12p40 promoter. *EMBO Rep.* 2004 Feb;5(2):172-7
- 6 Alexopoulou L, Czopik-Holt A, Medzhitov R, Flavell R.
Recognition of double stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature.* 2001 Oct 18;413(6857):732-8
- 7 Austyn JM.
Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. *Semin Immunol.* 1992 Aug;4(4):227-36
- 8 Banchereau J, Steinman RM.
Dendritic cells and the control of immunity. *Nature.* 1998 Mar 19;392(6673):245-52
- 9 Bartz et al.
The role of CD40 in DC-driven T-cell-polarization. *in Vorbereitung.* mündliche Mitteilung
- 10 Bartz H, Mendoza Y, Gebker M, Fischborn T, Heeg K, Dalpke A.
Poly-guanosine strings improve cellular uptake and stimulatory activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in human leukocytes. *Vaccine* 23 (2004);148-155
- 11 Bauer S, Kirschning CJ, Hacker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB.
Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001 Jul 31;98(16):9237-42
- 12 Beg AA.
Endogenous ligands of toll-like Receptors: implications for regulating inflammatory and immune responses; *Trends Immunol.* 2002 Nov;23(11):509-512
- 13 Bendelac A.
CD1: presenting unusual antigens to unusual T lymphocytes. *Science.* 1995 Jul 14;269(5221):185-6
- 14 Blomberg S, Eloranta ML, Magnusson M, Alm GV, Ronnblom L.
Expression of the markers BDCA-2 and BDCA-4 and production of interferon-alpha by plasmacytoid dendritic cells in systemic lupus erythematosus *Arthritis Rheum.* 2003 Sep;48(9): 2524-32
- 15 Bowie A, O'Neill LA.
The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol.* 2000 Apr;67(4):508-14

- 16 Bozza S, Gaziano R, Spreca A, Bacci A, Montagnoli C, diFrancesco P, Romani L.
DC transport conidia and hyphae of *Aspergillus fumigatus* from the airways to the draining lymph nodes and initiate disparate Th responses to the fungus.
J Immunol. 2002 Feb 1;168(3):1362-71
- 17 Cao Z, Henzel WJ, Gao X.
IRAK: A kinase associated with the interleukin-1 receptor.
Science. 1996 Feb 23;271(5252):1128-31
- 18 Cao Z, Xiong J, Takeuchi M, Kurama T, Goeddel DV
TRAF6 is a signal transducer for interleukin-1
Nature 1996; 383:443-446
- 19 Caroff M, Karibian D, Cavaillon JM, Haeffner-Cavaillon N.
Structural and functional analyses of bacterial lipopolysaccharides
Microbes Infect. 2002 Jul;4(9):915-26
- 20 Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Banchereau J.
Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking.
J Exp Med. 1994 Oct 1;180(4):1263-72
- 21 Cella M, Engering A, Pinet V, Pieters J, Lanzavecchia A.
Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells.
Nature. 1997;388:782-7
- 22 Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G.
Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation.
J Exp Med. 1996 Aug 1;184(2):747-52
- 23 Chu WM, Ostertag D, Li ZW, Chang L, Chen Y, Hu Y, Williams B, Perrault J, Karin M.
JNK2 and IKKbeta are required for activating the innate response to viral infection.
Immunity. 1999 Dec;11(6):721-31
- 24 Costello JF, Plass C.
Methylation matters. *J Med Genet.* 2001 May;38(5):285-303
- 25 Croston GE, Cao Z, Goeddel DV.
NF-kappa B activation by interleukin-1 (IL-1) requires an IL-1 receptor-associated protein kinase activity. *J Biol Chem.* 1995;270:16514-16517
- 26 d'Ostiani CF, Del Sero G, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, Ricciardi-Castagnoli P, Romani L.
Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of fungus *C. albicans*: implication for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo;
J Exp Med. 2000 May 15;191(10):1661-74
- 27 Dalgaard J, Beckstrom KJ, Jahnsen FL, Brinchmann JE.
Differential capability for phagocytosis of apoptotic and necrotic leukemia cells by human peripheral blood dendritic cell subsets.
J Leukoc Biol. 2005 May;77(5):689-98
- 28 Dalpke A, Zimmermann S, Heeg K.
CpG-oligonucleotides in vaccination: Signaling and mechanisms of action.
Immunobiol. 2001;204:667-676
- 29 Dalpke AH, Heeg K.
CpG-DNA as immune response modifier.
Int J Med Microbiol. 2004 Oct;294(5):345-54
- 30 Dalpke AH, Zimmermann S, Albrecht I, Heeg K.

- Phosphodiester CpG oligonucleotides as adjuvants: polyguanosine runs enhance cellular uptake and improve immunostimulative activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in vitro and in vivo. *Immunology*. 2002 May;106(1):102-12
- 31 Daser A, Meissner N, Herz U, Renz H.
Role and modulation of T-cell cytokines in allergy.
Curr Opin Immunol. 1995 Dec;7(6):762-70
- 32 Del Nagro CJ, Otero DC, Anzelon AN, Omori SA, Kolla RV, Rickert RC.
CD19 function in central and peripheral B-cell development.
Immunol Res. 2005;31(2):119-31
- 33 Del Sero G, d'Ostiani CF, Bacci A, Montagnoli C, Spreca A, Mencacci A, Ricciardi-Castagnoli P, Romani L.
Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of fungus *C. albicans*: implication for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo;
J Exp Med. 2000 May 15;191(10):1661-74
- 34 Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J.
BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol*. 2000 Dec 1;165(11):6037-46
- 35 Dzionek A, Inagaki Y, Okawa K, Nagafune J, Rock J, Sohma Y, Winkels G, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J.
Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions.
Hum Immunol. 2002 Dec;63(12):1133-48
- 36 Dzionek A, Sohma Y, Nagafune J, Cella M, Colonna M, Facchetti F, Gunther G, Johnston I, Lanzavecchia A, Nagasaka T, Okada T, Vermi W, Winkels G, Yamamoto T, Zysk M, Yamaguchi Y, Schmitz J.
BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon alpha/beta induction
J Exp Med. 2001 Dec 17;194(12):1823-34
- 37 e Sousa C, Hieny S, Schariton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A.
In vivo microbial stimulation induces rapid CD40L-independent production of IL-12 by dendritic cells and their re-distribution to T cell areas.
J Exp Med. 1997 Dec 1;186(11):1819-29
- 38 Edwards AD, Manickasingham SP, Sporri R, Diebold SS, Schulz O, Sher A, Kaisho T, Akira S, Reis e Sousa C.
Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering.
J Immunol. 2002 Oct 1;169(7):3652-60
- 39 Fenton MJ, Golenbock DT.
PS-binding proteins and receptors. *J Leukoc Biol*. 1998 Jul;64(1):25-32
- 40 Fischer W.
Physiology of lipoteichoic acids in bacteria. *Adv Microb Physiol*. 1988;29:233-302
- 41 Flo TH, Halaas O, Lien E, Ryan L, Teti G, Golenbock DT, Sundan A, Espevik T.
Human toll-like receptor 2 mediates monocyte activation by *Listeria monocytogenes*, but not by group B streptococci or lipopolysaccharide.
J Immunol. 2000 Feb 15;164(4):2064-9
- 42 Fujimoto M, Poe JC, Hasegawa M, Tedder TF.
CD19 regulates intrinsic B lymphocyte signal transduction and activation through a novel mechanism of processive amplification. *Immunol Res*. 2000;22(2-3):281-98

- 43 Gauldie JC, Richards C, Harnich D, Lansdrop P, Baumann H.
Interferon α 2/BSF-2 shares identity with monocyte-derived hepatocyte stimulating factor (HSF) and regulates the major acute phase protein response in liver cells.
Proc Natl Acad Sci USA. 1987;84: 7251-6
- 44 Gerosa F, Gobbi A, Zorzi P, Burg S, Briere F, Carra G, Trinchieri G.
The reciprocal interaction of NK cells with plasmacytoid or myeloid dendritic cells profoundly affects innate resistance functions.
J Immunol. 2005 Jan 15;174(2):727-34
- 45 Greenwald RJ, Freeman GJ, Sharpe AH.
The B7 family revisited. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:515-48
- 46 Gursel M, Verthelyi D, Gursel I, Ishii KJ, Klinman DM.
Differential and competitive activation of human immune cells by distinct classes of CpG oligodeoxynucleotide. *J Leukoc Biol*. 2002 May;71(5):813-20
- 47 Häcker H, Mischak H, Miethke T, Liptay S, Schmid R, Sparwasser T.
CpG-DNA-specific activation of antigen-presenting cells requires stress kinase activity and is preceded by non-specific endocytosis and endosomal maturation.
EMBO J 1998;17: 6230–40
- 48 Hanlon AM, Jang S, Salgame P
Signaling from cytokine receptors that affect Th1 responses
Front Biosci. 2002 May 1;7:d1247-54
- 49 Hemmi H, Kaisho T, Takeda K, Akira S.
The roles of Toll-like receptor 9, MyD88, and DNA-dependent protein kinase catalytic subunit in the effects of two distinct CpG DNAs on dendritic cell subsets;
J Immunol. 2003 Mar 15;170(6):3059-64
- 50 Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S.
A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA; *Nature*. 2000 Dec 7;408(6813):740-5.
- 51 Hirano T, Yasukawa K, Harada H, Taga T, Watanabe Y, Matsuda T, Kashiwamura S, Nakajima K, Koyama K, Iwamatsu A, et al.
Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin; *Nature*. 1986; 324: 73-7
- 52 Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, Krug A, Jahrsdorfer B, Giese T, et al.
Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides.
J Immunol. 2002;168:4531–7
- 53 Hultmark D.
Macrophage differentiation marker MyD88 is a member of the Toll/IL-1 receptor family.
Biochem Biophys Res Commun. 1994 Feb 28;199(1):144-6
- 54 Hunger RE, Sieling PA, Ochoa MT, Sugaya M, Burdick AE, Rea TH, Brennan PJ, Belisle JT, Blauvelt A, Porcelli SA, Modlin RL.
Langerhans cells utilize CD1a and langerin to efficiently present nonpeptide antigens to T cells. *J Clin Invest*. 2004 Mar;113(5):701-8
- 55 Inaba K, Pack M, Inaba M, Sakuta H, Isdell F, Steinman RM.
High levels of a major histocompatibility complex II-self peptide complex on dendritic cells from the T cell areas of lymph nodes. *J Exp Med*. 1997 Aug 29;186(5):665-72
- 56 Inaba K, Turley S, Iyoda T, Yamaide F, Shimoyama S, Reis e Sousa C, Germain RN, Mellman I, Steinman RM.
The formation of immunogenic major histocompatibility complex class II-peptide ligands in lysosomal compartments of dendritic cells is regulated by inflammatory stimuli.

- J Exp Med.* 2000;191:927–36
- 57 Janeway, CA Jr
Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology.
Cold Spring Harb Symp Quant Biol. 1989;54 Pt 1:1-13
- 58 Jann K, Jann B
Polysaccharide antigens of *Escherichia coli*.
Rev Infect Dis. 1987 Sep-Oct;9 Suppl 5:517-26
- 59 Jarrossay D, Napolitani G, Colonna M, Sallusto F, Lanzavecchia A.
Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells; *Eur J Immunol.* 2001;31:3388–3393
- 60 Julia V, Hessel EM, Malherbe L, Glaichenhaus N, O'Garra A, Coffmann RL.
A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity.* 2002 Feb;16(2):271-83
- 61 Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, de Waal Malefyt R, Kastelein RA, Bazan F, et al.
Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med.* 2001;194:863–70
- 62 Kasinrerk W, Baumruker T, Majdic O, Knapp W, Stockinger H.
CD1 molecule expression on human monocytes induced by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *J Immunol.* 1993 Jan 15;150(2):579-84
- 63 Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, Giese T, Endres S, Hartmann G.
Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells.
J Immunol. 2003 May 1;170(9):4465-74
- 64 Kline JN, Waldschmidt TJ, Businga TR, Lemish JE, Weinstock JV, Thorne PS, et al.
Cutting edge: modulation of airway inflammation by CpG oligodeoxynucleotides in a murine model of asthma. *J Immunol.* 1998;160:2555–9
- 65 Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kampgen E, Romani N, Schuler G.
High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10.
J Exp Med. 1996 Aug 1;184(2):741-6
- 66 Kopp EB, Medzhitov R.
The Toll-receptor family and control of innate immunity.
Curr Opin Immunol. 1999; 11:13-18
- 67 Kox WJ, Volk T, Kox SN, Volk HD.
Immunomodulatory therapies in sepsis
Intensive Care Med. 2000;26(Suppl 1): S124-8
- 68 Krieg AM, Yi AK, Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM.
CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation. *Nature.* 1995; 374:546-549
- 69 Krug A, Rothenfusser S, Hornung V, Jahrsdorfer B, Blackwell S, Ballas ZK, Endres S, Krieg AM, Hartmann G.
Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN-alpha/beta in plasmacytoid dendritic cells.
Eur J Immunol. 2001 Jul;31(7):2154-63
- 70 Kunkel HG, Crow MK.
Human dendritic cells: major stimulators of the autologous and allogeneic mixed leucocyte reactions. *Clin Exp Immunol.* 1982 Aug;49(2):338-46

- 71 Langenkamp A, Messi M, Lanzavecchia A and Sallusto F.
Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of Th1, Th2 and nonpolarized T cells. *Nat Immunol.* 2000. 1: 311–316
- 72 Langerhans P.
Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch. Anat.* 1868;44:325-343
- 73 Lechmann M, Berchtold S, Hauber J, Steinkasserer A; CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation; *Trends Immunol.* 2002 Jun;23(6):273-5
- 74 Lechmann M, Krooshoop DJ, Dudziak D, Kremmer E, Kuhnt C, Figdor CG, Schuler G, Steinkasserer A.
The extracellular domain of CD83 inhibits dendritic cell-mediated T cell stimulation and binds to a ligand on dendritic cells. *J Exp Med.* 2001 Dec 17;194(12):1813-21
- 75 Lechmann M, Zinser E, Golka A, Steinkasserer A.
Role of CD83 in the Immunomodulation of Dendritic Cells
Int Arch Allergy Immunol. 2002;129:113–118
- 76 Lenschow DJ, Walunas TL, Bluestone JA.
CD28/B7system of T cell costimulation. *Annu Rev Immunol.* 1996;14:233 –58
- 77 Lenz, A., Heine, M., Schuler, G., Romani, N
Human and murine dermis contain DC: isolation of a novel method and phenotypical and functional characterization. *J Clin Invest.* 1993 Dec;92(6):2587-96
- 78 Zhou LJ, Tedder TF.
CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996 Mar 19;93(6):2588-92
- 79 Lien E, Chow JC, Hawkins LD, McGuinness PD, Miyake K, Espevik T, Gusovsky F, Golenbock DT
A novel synthetic acyclic lipid A-like agonist activates cells via the lipopolysaccharide/toll-like receptor 4 signaling pathway.
J Biol Chem. 2001 Jan 19;276(3):1873-80
- 80 Lipford GB, Bauer M, Blank C, Reiter R, Wagner H, Heeg K.
CpG-containing synthetic oligonucleotides promote B and cytotoxic T cell responses to protein antigen: a new class of vaccine adjuvants.
Eur J Immunol. 1997;27(9):2340–4
- 81 Lopez CB, Moltedo B, Alexopoulou L, Bonifaz L, Flavell RA, Moran TM.
TLR-independent induction of dendritic cell maturation and adaptive immunity by negative-strand RNA viruses
J Immunol. 2004 Dec 1;173(11):6882-9
- 82 Lord KA, Hoffman-Liebermann B, Liebermann DA.
Nucleotide sequence and expression of a cDNA encoding MyD88, a novel myeloid differentiation primary response gene induced by IL-6. *Oncogene* 1990;5:1095-1097
- 83 Lotz M, Jirik F, Kabouridis P, Tsoukas C, Hirano T, Kishimoto T, Carson DA
B cell stimulating factor 2/interleukin 6 is a costimulant for human thymocytes and T lymphocytes
J Exp Med. 1988;140: 508-13
- 84 Lotz S, Aga E, Wilde I, van Zandbergen G, Hartung T, Solbach W, Laskay T
Highly purified lipoteichoic acid activates neutrophil granulocytes and delays their spontaneous apoptosis via CD14 and TLR2. *J Leukoc Biol.* 2004 Mar;75(3):467-77
- 85 Luger TA, Krutmann J, Kirnbauer R, Urbanski A, Schwarz T, Klappacher G, Kock A, Micksche M, Malejczyk J, Schauer E, et al.
IFN- γ /IL-6 augments the activity of human natural killer cells.

- J Immunol.* 1989 Aug 15;143(4):1206-9
- 86 MacDonald AS, Straw AD, Dalton NM, Pearce EJ.
Cutting edge: Th2 response induction by dendritic cells: a role for CD40.
J Immunol. 2002 Jan 15;168(2):537-40
- 87 McCluskie MJ, Weeratna RD, Davis HL.
The role of CpG in DNA vaccines. *Springer Semin. Immunopathol.* 2000;22:125-132
- 88 Medzhitov R, Janeway CA Jr.
Innate immunity: impact on the adaptive immune response;
Curr Opin Immunol. 1997;9:4-9
- 89 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Kopp E, Stadlen A, Chen C, Ghosh S, Janeway CA.
MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathway.
Mol Cell. 1998; 2:253-258
- 90 Medzhitov R.
Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol.* 2001 Nov;1(2):135-45
- 91 Miyake K.
Innate recognition of lipopolysaccharide by CD14 and toll-like receptor 4-MD-2: unique roles for MD-2. *Int Immunopharmacol.* 2003 Jan;3(1):119-28
- 92 Mizumoto N, Takashima A.
CD1a and langerin: acting as more than Langerhans cell markers.
J Clin Invest. 2004 Mar;113(5):658-60
- 93 Moll H.
Dendritic cells and host resistance to infection. *Cell Microbiol.* 2003 Aug;5(8):493-500
- 94 Moll H, Flohé S, Röllinghoff M.
Dendritic cells in leishmania major-immune mice harbor persistent parasites and mediate an antigen-specific T cell immune response.
Eur J Immunol. 1995 Mar;25(3):693-9
- 95 Morath S, Geyer A, Hartung T.
Structure-function relationship of cytokine induction by lipoteichoic acid from *Staphylococcus aureus*. *J Exp Med.* 2001;193:393-397
- 96 Morath S, Geyer A, Spreitzer I, Hermann C, Hartung T.
Structural decomposition and heterogeneity of commercial lipoteichoic acid preparations. *Infect Immun.* 2002; 70:938-944
- 97 Mori Y, Yoshimura A, Ukai T, Lien E, Espevik T, Hara Y.
Immunohistochemical localization of Toll-like receptors 2 and 4 in gingival tissue from patients with periodontitis; *Oral Microbiol Immunol.* 2003 Feb;18(1):54-8
- 98 Mule JJ, McIntosh JK, Joblons DM, Rosenberg SA.
Antitumor activity of recombinant interleukin-6 in mice; *J Exp Med.* 1990;171: 629-35
- 99 Muzio M, Natoli G, Sacconi S, Levrero M, Mantovani A.
The human toll signaling pathway: divergence of nuclear factor κ B and JNK/SAPK activation upstream of tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 (TRAF 6).
J Exp Med. 1998; 187:2097-2101
- 100 Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, D'amico G, Stoppacciaro A, Mancinelli R, van't Veer C, Penton-Rol G, Ruco LP, Allavena P, Mantovani A.
Differential Expression and Regulation of Toll-Like Receptors (TLR) in Human Leukocytes: Selective Expression of TLR3 in Dendritic Cells.
J Immunol. 2000 Jun 1;164(11):5998-6004

- 101 Novak N, Haberstock J, Geiger E, Bieber T.
Dendritic cells in allergy. *Allergy*. 1999 Aug;54(8):792-803
- 102 Ozinsky A, Underhill DM, Fontenot JD, Hajjar AM, Smith KD, Wilson CB, Schroeder L, Aderem A.
The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors.
Proc Natl Acad Sci USA. 2000 Dec 5;97(25):13766-71
- 103 Palsson-McDermott EM, O'Neill LA.
Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, TLR-4.
Immunology. 2004 Oct;113(2):153-62
- 104 Pasare C, Medzhitov R.
Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity
Microbes Infect. 2004 Dec;6(15):1382-7
- 105 Pasare C, Medzhitov R.
Toll-like receptors and acquired immunity. *Semin Immunol*. 2004 Feb;16(1):23-6
- 106 Pickl WF, Majdic O, Kohl P, Stockl J, Riedl E, Scheinecker C, Bello-Fernandez C, Knapp W.
Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. *J Immunol*. 1996 Nov 1;157(9):3850-9
- 107 Pinchuk LM, Polacino PS, Agy MB, Klaus SJ, Clark EA;
The role of CD40 and CD80; accessory cell molecules in dendritic cell-dependent HIV-1 infection. *Immunity*. 1994 Jul;1(4):317-25
- 108 Randolph GJ, Inaba K, Robbiani DF, Steinman RM, Muller WA.
Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo.
Immunity. 1999 Dec;11(6):753-61
- 109 Reis e Sousa
Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls
Semin Immunol. 2004 Feb;16(1):27-34
- 110 Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ.
Reciprocal control of t-helper cell and dendritic cell differentiation.
Science. 1999 Feb 19;283(5405):1183-6
- 111 Romani N, Schuler G.
The immunologic properties of epidermal Langerhans cells as part of the dendritic cell system; *Springer Semin Immunopathol*. 1992;13(3-4):265-79
- 112 Romani N, Gruner S, Brang D, Kampgen E, Lenz A, Trockenbacher B, Konwalinka G, Fritsch PO, Steinman RM, Schuler G.
Proliferating dendritic cell progenitors in human blood
J Exp Med. 1994 Jul 1;180(1):83-93
- 113 Sallusto F, Lanzavecchia A.
Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994 Apr 1;179(4):1109-18
- 114 Sato S
CD19 is a central response regulator of B lymphocyte signaling thresholds governing autoimmunity; *J Dermatol Sci*. 1999 Dec;22(1):1-10
- 115 Schaible UE, Kaufmann SH.
CD1 molecules and CD1-dependent T cells in bacterial infections: a link from innate to acquired immunity? *Semin Immunol*. 2000 Dec;12(6):527-35

- 116 Schindler S, Bristow A, Cartmell T, Hartung T, Fennrich S.
Comparison of the reactivity of human and rabbit blood towards pyrogenic stimuli;
ALTEX. 2003;20(2):59-63
- 117 Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS,
Ulevitch RJ.
Structure and function of lipopolysaccharide binding protein.
Science. 1990 Sep 21;249(4975):1429-31
- 118 Schumann RR.
Function of lipopolysaccharide (LPS)-binding protein (LBP) and CD14, the receptor for
LPS/LBP complexes: a short review. *Res Immunol*. 1992 Jan;143(1):11-5
- 119 Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ.
Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like
receptor 2. *J Biol Chem*. 1999 Jun 18;274(25):17406-9
- 120 Sester DP, Naik S, Beasley SJ, Hume DA, Stacey KJ.
Phosphorothioate backbone modification modulates macrophage activation by CpG
DNA. *J Immunol*. 2000;165(8):4165-73
- 121 Sharpe AH, Freeman GJ.
The B7-CD28 superfamily. *Nat Rev Immunol*. 2002;2:116-26
- 122 Shortman K, Liu YJ.
Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat Rev Immunol*. 2002 Mar;2(3):151-61
- 123 Steinman RM, Cohn ZA
Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I.
Morphology, quantitation, tissue distribution.
J Exp Med. 1973 May 1;137(5):1142-62
- 124 Steinman RM, Cohn ZA
Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional
Properties in vitro.
J Exp Med. 1974 Feb 1;139(2):380-97
- 125 Stevceva L.
Cytokines and their antagonists as therapeutic agents
Curr Med Chem. 2002 Dec;9(24):2201-7
- 126 Stingl G, Katz SI, Green I, Shevach EM.
The functional role of Langerhans cells; *J Invest Dermatol*. 1980 May;74(5):315-8
- 127 Takeda K, Kaisho T, Akira S.
Toll-like receptors; *Annu Rev Immunol*. 2003;21:335-76
- 128 Takeshita F, Leifer CA, Gursel I, Ishii KJ, Takeshita S, Gursel M, Klinman DM.
Cutting edge: Role of Toll-like receptor 9 in CpG DNA-induced activation of human
cells. *J Immunol*. 2001 Oct 1;167(7):3555-8
- 129 Takeuchi O, Hemmi H, Akira S.
Interferon response induced by Toll-like receptor signaling.
J Endotoxin Res. 2004;10(4):252-6
- 130 Tapping RI, Tobias PS
Soluble CD14-mediated cellular responses to lipopolysaccharide
Chem Immunol. 2000;74:108-21
- 131 Temsamani J, Kubert M, Tang J, Padmapriya A, Agrawal S.
Cellular uptake of oligodeoxynucleotide phosphorothioates and their analogs.
Antisense Res Develop. 1994;4:35-42

- 132 Ulevitch RJ, Tobias PS.
Receptor-dependent mechanisms of cell stimulation by bacterial endotoxin.
Annu Rev Immunol. 1995;13:437-57
- 133 Underhill DM, Ozinsky A, Hajjar AM, Stevens A, Wilson CB, Bassetti M, Aderem A.
The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature.* 1999 Oct 21;401(6755):811-5
- 134 van Uden J, Raz E.
Immunostimulatory DNA and applications to allergic disease
J Allergy Clin Immunol. 1999 Nov;104(5):902-10
- 135 Verthelyi D, Ishii KJ, Gursel M, Takeshita F, Klinman D.
Human peripheral blood cells differentially recognize and respond to two distinct CPG motifs. *J Immunol.* 2001;166(4):2372-7
- 136 Verthelyi D, Kenney RT, Seder RA, Gam AA, Friedag B, Klinman DM.
CpG oligodeoxynucleotides as vaccine adjuvants in primates.
J Immunol. 2002 Feb 15;168(4):1659-63
- 137 Verthelyi D, Zeuner RA
Differential signaling by CpG DNA in DCs and B cells: not just TLR9.
Trends Immunol. 2003 Oct;24(10):519-522
- 138 Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM.
Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells.
J Immunol. 2001;166:249-55
- 139 Wagner H.
Bacterial CpG DNA activates immune cells to signal infectious danger.
Adv Immunol. 1999; 73:329-368
- 140 Weiner GJ.
Immunostimulatory DNA sequences and cancer therapy.
Springer Semin Immunopathol. 2000;22(1-2):107-16
- 141 Wesche H, Henzel WJ, Shillinglaw W, Li S, Cao Z.
MyD88: an adapter that recruits IRAK to the IL-1 receptor complex
Immunity. 1997;7:837-847
- 142 Williams BR.
PKR, a sentinel kinase for cellular stress; *Oncogene.* 1999 Nov 1;18(45):6112-20
- 143 Winzler C, Rovere P, Rescigno M, Granucci F, Penna G, Adorini L, Zimmermann VS, Davoust J, Ricciardi-Castagnoli P.
Maturation stages of mouse dendritic cells in growth-factor dependent long-term cultures.
J Exp Med. 1997 Jan 20;185(2):317-28
- 144 Wittmann M, Kienlin P, Mommert S, Kapp A, Werfel T.
Suppression of IL-12 Production by Soluble CD40 Ligand: Evidence for Involvement of the p44/42 Mitogen-Activated Protein Kinase Pathway.
J Immunol. 2002 Apr 15;168(8):3793-800
- 145 Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC.
CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein.
Science. 1990 Sep 21;249(4975):1431-3
- 146 Xu J, Lucas R, Wendel A.
The potential of GM-CSF to improve resistance against infections in organ transplant.
Trends Pharmacol Sci. 2004 May;25(5):254-8

- 147 Zhao Q, Matson S, Herrera CJ, Fisher E, Yu H, Krieg AM. Comparison of cellular binding and uptake of antisense phosphodiester, phosphorothioate, and mixed phosphorothioate and methylphosphonate oligonucleotides. *Antisense Res Dev.* 1993 Spring;3(1):53-66
- 148 Zimmermann S, Egeter O, Hausmann S, Lipford GB, Rocken M, Wagner H, Heeg K. Cutting edge: CpG oligodeoxynucleotides trigger protective and curative Th1 responses in lethal murine leishmaniasis. *J Immunol.* 1998 Apr 15;160(8):3627-30
- 149 Zimmermann S, Heeg K, Dalpke A. Immunostimulatory DNA as adjuvant: efficacy of phosphodiester CpG oligonucleotides is enhanced by 3' sequence modification. *Vaccine.* 2003 Feb 14;21(9-10):990-5

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Schema der DZ Entwicklung (nach Bieber, T et al. ¹⁰¹)	5
Abbildung 2: Schematische Darstellung der Separierungseinheit	21
Abbildung 3: Schematische Darstellung der Markierungsmöglichkeiten von Zellen	22
Abbildung 4: Prinzip der Durchflusszytometrie	27
Abbildung 5: Prinzip der PCR	32
Abbildung 6: Prinzip der TaqMan [®] -PCR	34
Abbildung 7: Durchflusszytometrie zelltypischer OFA (CD14, CD1a, CD83) ...	36
Abbildung 8: CD14 ⁺ Monozyten	39
Abbildung 9: unreife DZ	40
Abbildung 10: reife DZ	41
Abbildung 11: GLR	42
Abbildung 12: CD14-Expression [%] verschiedener Zellarten	44
Abbildung 13: CD1a-Expression verschiedener Zellarten	45
Abbildung 14: CD83-Expression verschiedener Zellen	46
Abbildung 15: CD40-Expression verschiedener Zellen	47
Abbildung 16: CD80-Expression verschiedener Zellen	48
Abbildung 17: CD86-Expression verschiedener Zellen	49
Abbildung 18: HLA-ABC-Expression verschiedener Zellen	50
Abbildung 19: HLA-DR-Expression verschiedener Zellen	51
Abbildung 20: CD1a-Expression unterschiedlich stimulierter DZ	52
Abbildung 21: CD83-Expression unterschiedlich stimulierter DZ	52
Abbildung 22: CD40-Expression unterschiedlich stimulierter DZ	53
Abbildung 23: CD80 Expression unterschiedlich stimulierter DZ	54
Abbildung 24: CD86-Expression unterschiedlich stimulierter DZ	54
Abbildung 25: HLA-DR-Expression (MFI) unterschiedlich stimulierter DZ	55
Abbildung 26: uptake MFI (Differenz 37°C-4°C)	56
Abbildung 27: mDZ uptake MFI (Differenz 37°C-4°C)	57
Abbildung 28: Phagozytose nach verschiedenen Stimuli [MFI]	58
Abbildung 29: IL-6-Produktion dendritischer Zellen nach Stimulation	59
Abbildung 30: IL-12p40 Produktion dendritischer Zellen nach Stimulation	60
Abbildung 31: Gel-Elektrophorese der TLR4-PCR	61
Abbildung 32: Gel-Elektrophorese der konventionellen TLR9-PCR	62
Abbildung 33: Isolation CD14 ⁺ -Monozyten aus PBMC	63
Abbildung 34: Isolation CD14 ⁺ -Monozyten aus PBMC	64
Abbildung 35: Isolation CD14 ⁺ -Monozyten aus PBMC	64
Abbildung 36: Isolation CD14 ⁺ -Monozyten aus PBMC	65
Abbildung 37: Isolation CD14 ⁺ -Monozyten aus PBMC	66
Abbildung 38: Isolation CD14 ⁺ -Monozyten aus PBMC	66
Abbildung 39: Isolation CD14 ⁺ -Monozyten aus PBMC	67
Abbildung 40: TLR2 auf iDZ nach verschiedenen Stimuli	68
Abbildung 41: TLR3 auf iDZ nach verschiedenen Stimuli	69
Abbildung 42: TLR4 auf iDZ nach verschiedenen Stimuli	70
Abbildung 43: TLR2-Expression nach verschiedenen Stimuli	71
Abbildung 44: TLR4-Expression nach verschiedenen Stimuli (FACS)	72

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: OFA myeloider antigenpräsentierender Zellen	7
Tabelle 2: Aktivierungsmarker myeloider antigenpräsentierender Zellen	7
Tabelle 3: charakterisierende OFA anderer Zelltypen	8
Tabelle 4: Erkennung mikrobieller Komponenten durch TLR ^{3,127}	14
Tabelle 5: eingesetzte Materialien.....	17
Tabelle 6: zellartypische OFA auf Monozyten und iDZ.....	37
Tabelle 7: Verunreinigung durch plasmazytoide DZ und B-Zellen.....	43

Abkürzungsverzeichnis

Ag	Antigen
BCR	B-Zell-Antigenrezeptor
BZ	B-Zelle(n)
bzw.	beziehungsweise
CD	in Verbindung mit einer Zahl, „Cluster of differentiation“, internationale Nomenklatur für Oberflächenantigene (OFA)
CpG-ODN	ODN mit zentralem CpG-Motiv
DNA	Desoxyribonucleinsäure
dsRNA	doppelsträngige RNA
DZ	dendritische Zelle(n)
iDZ	unreife oder immature dendritische Zelle(n)
mDZ	reife oder mature dendritische Zelle(n)
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay oder Enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
et al.	und andere
FACS	analytische Durchflusszytometrie
FITC	Fluoresceinisothiocyanat, Farbstoff für FACS
GLR	Gemischte Leukozyten Reaktion
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender-Factor
hGM-CSF	humaner GM-CSF
HLA	humanes Leukozyten Antigen
IFN	Interferon
IL	Interleukin
LPS	Lipopolysaccharid
LTA	Lipoteichoic-Acid, Lipoteichonsäure
MACS	Magnet-assoziierte Zellsortierung
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , auch HLA
MLR	englisch „ <i>mixed leukocyte reaction</i> “ für GLR
NK	natürliche Killerzellen
ODN	Oligodesoxynukleotide
OFA	Oberflächenantigen

PAMP	englisch: <i>pathogen associated molecular patterns</i> , pathogenassoziierte molekulare Strukturen
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , periphere Blutmonozyten
PBS-Puffer	„ <i>Phosphate buffered saline</i> “ – Lösung für Zellkultur
PCR	<i>Polymerase chain Reaction</i> oder Polymerase-Ketten- Reaktion
rtPCR	„rt“ steht für „ <i>real time</i> “ Echtzeit-PCR, erlaubt eine quantitative Aussage im Gegensatz zur rein qualitativen Aussage einer konventionellen PCR
PE	Phycoerythrin
PRR	„ <i>pattern recognition receptors</i> “ (Muster-Erkennungs- Rezeptoren), die PAMP erkennenden Rezeptoren werden in dieser Familie zusammengefasst
PO-ODN	ODN mit Phosphodiester-Rückgrat
PTO-ODN	ODN mit Phosphothioat-Rückgrat
RNA	Ribonucleinsäure
s.	siehe
s.o.	siehe oben
TLR	Toll-like- Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose-Faktor
T oder TZ	T-Zellen
Tn	naive T-Zellen
u.a.	und andere
z.B.	zum Beispiel

Curriculum Vitae

Fischborn, Georg Till Elof

geboren am 09.09.1977 in Köln
Staatsangehörigkeit deutsch
Familie verheiratet mit Dr. med. Sonja Fischborn, geb. Bechmann
Tochter Eleni Theresa Fischborn, geb. 10.01.2008

Georg Fischborn (Dipl. Kaufmann)
Sylva Fischborn (Dipl. Sportlehrerin)
Felix Nils Fischborn (BA Kunstgeschichte)

Schulbildung

1984 – 1988 Katholische Grundschule im Pesch, Düren
1988 – 1997 Stiftisches Gymnasium am Altenteich Düren;
Abschluss mit der allgemeinen Hochschulreife, Note 2,0

Medizinische Ausbildung

10.1998 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Philipps-Universität Marburg
09.2000 ärztliche Vorprüfung; Note befriedigend (2,66)
04.2001 Beginn einer experimentellen Promotionsarbeit am Institut für medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene unter der Leitung von Prof. Dr. K. Heeg
08.2001 erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note befriedigend
08.2003 zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung, Note gut (2,33)
04.2004 – 05.2005 Praktisches Jahr an der Ludwig-Maximilian-Universität München
04.2005 dritter der ärztlichen Prüfung, Note befriedigend
Ärztliche Prüfung mit der Gesamtnote 2,66
05.2005 Erteilung der Approbation

Facharztweiterbildung

- 05.2005 Assistenzarzt der Abteilung Allgemein-, Visceral- und
Gefäßchirurgie, Klinikum Kaufbeuren Ostallgäu, Prof. Dr.
Stiegler
- 10.2006 Assistenzarzt der Abteilung Plastische und Ästhetische,
Hand- und Mikrochirurgie, Klinikum Dachau, Dr. Heitland

Meine akademischen Lehrer

in Marburg:

Arnold, Aumüller, Bach, Barth, Basler, Baum, Becker, Bertalanffy, Beyer, Bien, Christiansen, Czekelius, Daut, Eilers, Fruhstorfer, Gemsa, Geuss, Gotzen, Griss, Happle, Hasilik, Heeg, Hellinger, Herz, Hesse, Hofmann, Jungclas, Kern, Klenk, Lose, Koolmann, Krieg, Kroll, Lammel, Lang, Lill, Lohoff, Lorenz, Maisch, Moll, Mutters, Oertel, Renschmidt, Renz, Röhm, Rothmund, Schäfer, Schmidt, Seitz, Steiniger, Stiletto, Sturm, Suske, Voigt, Wagner, Weihe, Werner, Westermann, Wulf

in München:

Ehrenfeld, Hallfeldt, Mutschler, Schlöndorff, Steckmeier, Stiegler, Stock, Theisen

Danksagung

Mein Dank gilt in allererster Linie Herrn Prof. Dr. Klaus Heeg für die Überlassung dieser Arbeit, für die Möglichkeit sie unter seiner Leitung erarbeiten zu dürfen und für die Unterstützung während dieser Zeit.

Weiterhin danken möchte ich insbesondere (in alphabetischer Reihenfolge)

Dr. med. Holger Bartz für dessen intensive Betreuung, ständigen Beistand, Einarbeitung in praktische Laborarbeit und theoretischen Hintergrund, insbesondere auch für die sorgfältige Revision des Schriftsatzes

Prof. Dr. med. Alexander Dalpke für seine ausgezeichnete Laborleitung und den fachlichen Beistand

Georg und Sylva Fischborn dafür, dass sie im ursprünglichsten Sinne diese Arbeit überhaupt erst auf den Weg gebracht haben und für ihre immerwährende Unterstützung

Dr. med. Sonja Fischborn für ihre fortwährenden Ermunterungen und Aufforderungen sowie den notwendigen Druck, ohne beides wäre diese Arbeit wahrscheinlich nie zu Ende geschrieben worden. Danke für Deine Geduld und Deine Liebe! Dir gebührt für diese Arbeit (fast) ein zweiter Titel.

Fr. Christiane Schick für ihren unermüdlichen Einsatz um diese Arbeit und den involvierten Computer. Ohne sie wäre ein Abschluss der Arbeit noch lange, lange nicht in Sicht!

weiterer Dank gilt:

Nikolaus Antony für die umgehende „Pedeheffisierung“ und hervorragenden Einsatz am Stuckkogel; dem „Brohmonnium-Ion“ [sic.]; Felix Fischborn dafür dass es ihn gibt: Werd glücklich: in London oder wo auch immer; Markus Frey für tief greifenden fachlichen Beistand und weit reichende Erweiterung des Allgemeinwissens; Frederik Knauf für eine lange Freundschaft; Yuri Mendoza für viele kurzweilige Stunden der Zusammenarbeit im Labor und während des Studiums überhaupt, ohne unsere Zusammenarbeit wären wir beide nicht da wo wir jetzt sind; Sandra Opper für ihren Hilfe bei TaqMan und Sequenzierung und die gute Einarbeitung in viele der hier angewandten Techniken; *www.samurai.fm* für die beste Musik während sämtlicher Zeit im Netz, beim Schreiben und während der Korrekturen; Prof. Dr. H. Stiegler dafür, dass er mir das Leben als Arzt von einer nicht gekannten Seite hat zeigen können; Thomas „ttt123“ Tapmeier für das „Brohmonnium-Ion“ [sic.] und für die ultimative Durchhaltungsmusik im Labor; Dr. med. Dominik Weller für seine Freundschaft auch über hunderte Kilometer, eine grandiose gemeinsame Studienzeit und und die schnellste Korrektur überhaupt; den Wittelsbachern für Ihre hervorragende Fortführung klösterlicher Traditionen seit 1817; Florian Zinner für wertvolle Stunden ohne seine Christiane ,die sie an dieser Arbeit saß und seinen nachdrücklichen Ansporn endlich fertig zu werden

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Medizin Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel „Toll-like-Rezeptor Expression humaner dendritischer Zellen – differentielle Expression von Toll-Like-Rezeptoren durch humane myeloide dendritische Zellen und Einfluss der Expression auf die Funktion beispielhaft an den TLR2, 3, 4 und 9“ im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Prof. Dr. Heeg mit Unterstützung von Dr. Bartz ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe. Ich habe bisher an keinem in- und ausländischen Medizinischen Fachbereich ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht noch die vorliegende oder eine andere Arbeit als Dissertation vorgelegt. Vorliegende Arbeit wird in der Universitätsbibliothek veröffentlicht werden, teilergebnisse dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht (s. gesonderte Auflistung).

Marburg, den

G. T.Fishborn

Veröffentlichungen

Teilergebnisse dieser Arbeit waren Teil folgender Veröffentlichungen:

„Human monocytes but not monocyte-derived dendritic cells express Toll-like receptor 9-mRNA and can be activated by CpG-ODN“

H. Bartz, A. Dalpke, T. Fischborn, S. Zimmermann, K. Heeg

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie

September 2001, Dresden

„CpG-DNA does not effect the functional maturation but the morphology of human monocyte-derived dendritic cells“

Bartz, H., Dalpke, A., Fischborn, T., Zimmermann, S., Heeg, K.

Jahrestagung der “European macrophage society”

Oktober 2001, Wien

„Expression and function of Toll-like receptors on human dendritic cells during their development from CD34+ hematopoietic stem cells“

H. Bartz, A. Dalpke, T. Roethoeft, T. Fischborn, K. Heeg, U. Schauer

Jahrestagung der deutschen Gesellschaft für Immunologie

September 2002, Marburg

„Expression and function of Toll-like receptors on human stem cell derived dendritic cells and macrophages“

H. Bartz, A. Dalpke, T. Roethoeft, T. Fischborn, K. Heeg, U. Schauer

Jahrestagung der „European macrophage society“

Oktober 2002, Basel

„Human dendritic cells are activated and their Toll-like receptor expression is regulated by pathogen associated molecular patterns“

Fischborn, T., Bartz, H., Dalpke, A., Heeg, K.

European students conference,

Oktober 2002, Berlin

„Poly-guanosine strings improve cellular uptake and stimulatory activity of phosphodiester CpG oligonucleotides in human leukocytes”

Bartz H, Mendoza Y, Gebker M, Fischborn T, Heeg K and Dalpke A

Vaccine 23 (2004) 148–155

