

TECHNISCHE UNIVERSITÄT MÜNCHEN

Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse und Chemische Lebensmitteltechnologie

Beeinflussung der Interaktion von Dendritischen Zellen und T Zellen durch Pollenbestandteile  
in der allergischen Immunantwort und Charakterisierung eines murinen  
Hyposensibilisierungsmodells

Mayte Gertraud Bewersdorff

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung,  
Landnutzung und Umwelt der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen  
Grades eines

Doktors der Naturwissenschaften

genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. K.-H. Engel

Prüfer der Dissertation:

1. Univ.-Prof. Dr. Dr. h.c. H. Parlar
2. apl. Prof. Dr. M. Mempel
3. apl. Prof. Dr. A. Görg, (i. R.)

Die Dissertation wurde am 13.11.2009 bei der Technischen Universität München eingereicht und  
durch die Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
am 25.02.2010 angenommen.



Die vorgelegte wissenschaftliche Arbeit wurde betreut von  
Prof. Dr.med. Martin Mempel und Univ.-Prof. Dr.med. Thilo Jakob.

Die Labortätigkeiten wurden durchgeführt in der  
Klinischen Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie,  
Helmholtz Zentrum München –  
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt, GmbH/

ZAUM – Zentrum für Allergie und Umwelt  
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein  
Technische Universität München

unter der Leitung von

Univ.-Prof. Dr.med. Heidrun Behrendt

**HelmholtzZentrum münchen**  
Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und Umwelt



Die universitäre Betreuung wurde von

Univ.-Prof. Dr.rer.nat. Dr.agr.habil. Dr.h.c. Harun Parlar

Lehrstuhl für Chemisch-Technische Analyse  
am

Wissenschaftszentrum Weihenstephan  
für Ernährung, Landnutzung und Umwelt  
der Technischen Universität München



übernommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>V</b>
<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
<i>1.1. Das Immunsystem.....</i>	<i>1</i>
1.1.1. Dendritische Zellen.....	1
1.1.1.1. Subpopulationen.....	1
1.1.1.2. Ontogenese.....	2
1.1.1.3. Aktivierung von DC.....	3
1.1.1.4. Antigenpräsentation.....	8
1.1.1.5. Interaktion der DC mit adaptiven Immunzellen.....	10
1.1.1.6. Tolerogene DC.....	13
1.1.2. T Zellen.....	14
1.1.2.1. Th1 Zellen.....	15
1.1.2.2. Th2 Zellen.....	15
1.1.2.3. Th17 Zellen.....	15
1.1.2.4. Regulatorische T Zellen.....	16
1.1.2.5. Zytotoxische T Zellen.....	17
1.1.2.6. NKT Zellen.....	18
<i>1.2. Allergien.....</i>	<i>19</i>
1.2.1. Klassifizierung der Hypersensitivitätsreaktionen.....	20
1.2.2. Pollen und Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALMs).....	21
<i>1.3. Spezifische Immuntherapie.....</i>	<i>23</i>
1.3.1. Einführung zur spezifischen Immuntherapie.....	23
1.3.2. Wirkmechanismen der spezifischen Immuntherapie.....	24
<i>1.4. Aufgabenstellung dieser Arbeit.....</i>	<i>25</i>
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>26</b>
2.1. <i>Material.....</i>	<i>26</i>
2.1.1. Geräte.....	26
2.1.2. Spezielle Materialien.....	28
2.1.3. Reagenzien.....	29
2.1.4. Puffer und Lösungen.....	31
2.1.5. Nährmedien.....	35
2.1.6. Antikörper.....	36
2.1.7. Oligonukleotide.....	38
2.1.8. Hybridome und Mauslinien.....	38
2.1.9. Verwendete Analysekits.....	40
2.2. <i>Methoden.....</i>	<i>40</i>
2.2.1. allgemeine Zellzählung.....	40

2.2.2.	Herstellung des wässrigen Birkenpollenextrakts .....	40
2.2.3.	Generierung von GM-CSF Überstand .....	41
2.2.4.	Generierung von Dendritischen Zellen .....	41
2.2.5.	Isolierung von primären Lymphozyten aus verschiedenen Geweben .....	42
2.2.5.1.	Herstellung einer Einzelzellsuspension aus der Milz .....	42
2.2.5.2.	Anreicherung von CD4 <sup>+</sup> T Zellen aus der Milz mittels MACS-Technik .....	42
2.2.5.3.	Isolierung von mononukleären Zellen aus der Leber mittels Percoll-Dichtegradient .....	43
2.2.6.	Stimulationsassays .....	44
2.2.7.	DC – T Zell-Kokulturen .....	46
2.2.7.1.	Allogene DC – T Zell-Kokultur .....	46
2.2.7.2.	Antigenspezifische DC – T Zell-Kokultur .....	47
2.2.7.3.	DC – NKT Zell-Kokultur .....	48
2.2.8.	Durchflusszytometrische Analysen .....	48
2.2.8.1.	Färbung von Oberflächenmarkern .....	48
2.2.8.2.	Toxizitätsmessung .....	50
2.2.8.3.	Proliferationsmessung .....	50
2.2.8.4.	Intrazellulärer Zytokinnachweis .....	51
2.2.9.	Endotoxinentfernung .....	52
2.2.10.	Endotoxinbestimmung .....	52
2.2.11.	Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA) .....	53
2.2.11.1.	Zytokinbestimmungen .....	54
2.2.11.2.	Immunglobulinbestimmungen .....	55
2.2.11.3.	Test auf Mykoplasmen .....	56
2.2.12.	Aufreinigung des Anti-IL-10 Rezeptor Antikörpers .....	57
2.2.13.	Protokoll zur <i>in vivo</i> Immuntherapie .....	57
2.2.14.	DNA-Isolierung aus Gewebe .....	58
2.2.15.	Polymerase Kettenreaktion zur Klassifizierung der konditionellen <i>knock out</i> Mäuse .....	59
2.2.16.	Bronchoalveoläre Lavage (BAL) .....	60
2.2.17.	Zelldifferenzierung der BAL .....	60
2.2.18.	Histologische Analysen .....	61
2.2.18.1.	Einbettung und Schnitte .....	61
2.2.18.2.	Histologische Übersichtsfärbungen .....	61
2.2.19.	Statistische Analyse .....	62
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>63</b>
3.1.	<i>Beeinflussung der Interaktion von Dendritischen Zellen und T Zellen durch Pollenbestandteile in der allergischen Immunantwort .....</i>	<i>63</i>
3.1.1.	Funktionelle und phänotypische Veränderung von murinen DC Subtypen durch <i>Bet.</i> -APE und ausgewählten PALMs .....	63
3.1.1.1.	Einfluss von <i>Bet.</i> -APE und PPE <sub>1</sub> auf pDC .....	63
3.1.1.2.	Einfluss von <i>Bet.</i> -APE, PPE <sub>1</sub> und PPF <sub>1</sub> auf cDC .....	65
3.1.2.	Direkter und indirekter Einfluss von <i>Bet.</i> -APE auf die immunologische T Zell-Antwort .....	72
3.1.2.1.	Allogene DC-T Zell-Kokultur .....	72
3.1.2.2.	Antigenspezifische DC-T Zell-Kokultur .....	78
3.1.2.3.	Einfluss von <i>Bet.</i> -APE auf NKT Zellen .....	82
3.1.2.4.	Direkter und indirekter Einfluss von <i>Bet.</i> -APE auf ein NKT Zell Hybridom .....	87

3.2.	<i>Charakterisierung eines murinen Hyposensibilisierungsmodells</i> .....	90
3.2.1.	Antigenspezifische Wirkung der Hyposensibilisierung in C57BL/6 wt Mäusen.....	90
3.2.2.	Die Rolle von IL-10 auf die Wirkung der Immuntherapie.....	93
3.2.3.	Die Rolle von T Zell produziertem IL-10 auf die Hyposensibilisierung .....	95
3.2.4.	Die Rolle von NKT Zellen bei der Immuntherapie.....	101
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b> .....	<b>105</b>
4.1.	<i>Funktionelle Modulation von pDC und cDC durch wässrigen Birkenpollenextrakt</i> .....	105
4.1.1.	Einfluss von <i>Bet.</i> -APE auf die Funktion der pDC in einem <i>in vitro</i> Modell.....	105
4.1.2.	Funktionelle Modulation der cDC durch <i>Bet.</i> -APE .....	106
4.1.2.1.	Ursachen für differenzielle Effekte zwischen dem humanen und murinen System .....	107
4.1.2.2.	Phytosteran E <sub>1</sub> : nur eine wirksame Substanz des <i>Bet.</i> -APE.....	108
4.1.2.3.	Mögliche Rezeptoren für die wirksamen Komponenten des <i>Bet.</i> -APE auf cDC .....	108
4.1.2.4.	Regulation der differenziellen Zytokinsekretion .....	109
4.2.	<i>Auswirkungen des wässrigen Pollenextrakts auf die Interaktion von cDC mit T Zellen</i> .....	111
4.2.1.	Indirekter Einfluss von <i>Bet.</i> -APE auf die allogene und antigenspezifische T Zell-Proliferation.....	112
4.2.2.	Indirekter Einfluss von <i>Bet.</i> -APE auf die allogene und antigenspezifische T Zell-Zytokinsekretion.....	112
4.2.2.1.	Toleranz statt Th2 Polarisierung durch <i>Bet.</i> -APE behandelte cDC? .....	112
4.2.2.2.	Einfluss der eingesetzten Antigenkonzentration auf die T Zell-Polarisierung .....	113
4.2.2.3.	Einfluss des Stimulator-Responder Verhältnisses in der Kokultur auf die T Zell-Polarisierung ..	113
4.2.2.4.	Einfluss von GM-CSF in der cDC-Kultur auf die T Zell-Polarisierung.....	114
4.2.2.5.	Einfluss des Maturationsgrades der cDC auf die T Zell-Polarisierung .....	114
4.2.2.6.	Einfluss von IL-2 auf die T Zell-Polarisierung .....	115
4.2.2.7.	Einfluss des Mausstamms auf die T Zell-Polarisierung .....	115
4.2.3.	Direkter und indirekter Einfluss von <i>Bet.</i> -APE auf NKT Zellen .....	116
4.2.3.1.	Indirekter Einfluss von <i>Bet.</i> -APE auf NKT Zellen durch modulierte cDC .....	116
4.2.3.2.	Direkter Einfluss von <i>Bet.</i> -APE auf NKT Zellen .....	118
4.2.3.3.	Auswirkungen von <i>Bet.</i> -APE auf NKT Zellen aus Leber und Milz.....	118
4.3.	<i>Der Einfluss von T Zell-unabhängigem und aus T Zellen stammendem IL-10 auf die Immuntherapie</i> .....	119
4.3.1.	Rolle von Gesamt-IL-10 bei der Immuntherapie .....	120
4.3.2.	Rolle von T Zell-abhängigem IL-10 in der Immuntherapie.....	121
4.3.3.	T Zell-unabhängiges IL-10 in der Immuntherapie.....	122
4.3.3.1.	B Zellen als Quelle des IL-10.....	122
4.3.3.2.	DC als Quelle des IL-10.....	123
4.3.3.3.	Monozyten und Makrophagen als Quelle des IL-10 .....	124
4.3.3.4.	Mastzellen als Quelle des IL-10 .....	124
4.3.4.	Bedeutung von OVA-spezifischem IgG1 während der IT .....	125
4.3.5.	Bedeutung von OVA-spezifischem IgE in der IT .....	126
4.3.6.	Die Rolle von IL-13 in der IT .....	126
4.4.	<i>NKT Zellen in der Immuntherapie</i> .....	127
4.5.	<i>Fazit</i> .....	128
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>129</b>
<b>6.</b>	<b>Summary</b> .....	<b>131</b>

---

<b>7. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>133</b>
<b>8. Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>154</b>
<b>9. Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>156</b>
<b>10. Anhang.....</b>	<b>157</b>
10.1. Datenanhang.....	157
10.2. Exemplarische FACS-Analysen.....	216
10.3. Endotoxinbestimmung und Mykoplasmen-Test.....	220
<b>DANKSAGUNG.....</b>	<b>221</b>
<b>PUBLIKATIONEN &amp; KONFERENZEN.....</b>	<b>223</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$ -GalCer	$\alpha$ -Galactosylceramid
AHR	Atemwegs-Hyperreagibilität ( <i>airway hyperresponsiveness</i> )
AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse ( <i>analysis of variance</i> )
APC	Antigenpräsentierende Zellen
APC <sub>AK</sub>	Allophycocyanin
ar ham	<i>Armenian Hamster</i>
ASGPR	Asialoglycoprotein Rezeptoren
ATP	Adenosintriphosphat
BAL	Bronchoalveolare Lavage
BALF	Bronchoalveolare Lavage-Flüssigkeit
Bet.-APE	wässriger Birkenpollenextrakt ( <i>Betula alba aqueous pollen extract</i> )
Bio	Biotinyliert
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serumalbumin
cAMP	Zyklische Adenosinmonophosphat
CCL2	Chemokin Ligand 2 (CCL2)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDC	Konventionelle DC
CEACAM-1	<i>Carcinoembryonic Antigen-related Cell Adhesion Molecule 1</i>
CFSE	<i>Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester</i>
CLP	Gewöhnliche lymphoide Vorläuferzelle ( <i>common lymphoid precursor</i> )
CLR	C-Typ Lektin Rezeptoren
CMP	Myeloiden Vorläuferzellen
CTL	Zytotoxische T Lymphozyten
CTLA	Zytotoxisches T Lymphozyten Antigen
CTLD	C-Typ Lektin ähnliche Domänen
DAMP	Defektassoziierte molekulare Muster ( <i>damage-associated molecular pattern</i> )
DC	Dendritische Zellen
DC-SIGN	DC-spezifisches ICAM-3-aufnehmendes Nicht-Integrin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DN	Doppelt negativ
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme Linked Immunosorbent Assay</i>
ERK	<i>Extracellular-signal Regulated Kinase</i>
EU	Endotoxin Unit
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorting</i>
FCS	Fötale Kälberserum
FITC	<i>Fluorescein Isothiocyanat</i>



---

FL	Fluoreszenz
Flt3	<i>FMS-like tyrosine kinase 3</i>
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor</i>
HAT	<i>Hypoxanthine Aminopterin Thymidine</i>
HLA	Humane Leukozytenantigene
HODE	<i>Hydroxy Octadecadienoic Acid</i>
HOTE	<i>Hydroxy Octadecatrienoic Acid</i>
HSC	Hämatopoetischen Stammzellen
ICAM	Intrazelluläres Adhäsionsmolekül
ICOS-L	Induzierbarer Kostimulatorischer Ligand
IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
iGb3	Isoglobotrihexosylceramid
IL	Interleukin
ILT	<i>Immunoglobulin-like transcript</i>
iNKT Zellen	invariante NKT Zellen
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
IT	Immuntherapie
iTregs	induzierbare regulatorische T Zellen
IZ	Intrazellulärer Zytokinnachweis
JAK	Janus Kinase
k.o.	<i>knock out</i>
LAL	<i>Limulus Amebocyte Lysate</i>
LC	Langerhans Zellen
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
LNIT	Lokale nasale IT
Lox-1	<i>Low density lipoprotein receptor-1</i>
LPS	Lipopolysaccharide
LRR	Leucin-reiche Wiederholungsmotive
LTB4	Leukotrien B4
Mac-1	Makrophagen Antigen-1
MACS	<i>Magnetic-activated cell sorting</i>
M-CSFR	<i>Macrophage Colony-Stimulating Factor Receptor</i>
mDC	Myeloide Dendritische Zellen
MDC	<i>Macrophage-Derived Chemokine</i>
MFI	Durchschnittliche Fluoreszenzintensität ( <i>mean fluorescence intensity</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>Major Histocompatibility Complex</i> ).
MIP-2	Makrophagen inflammatorisches Protein-2
MLR	Gemischten Lymphozytenreaktion
MMR	Makrophagen Mannose Rezeptor

---

MNC	Mononukleären Zellen
MR	Mannose Rezeptor
ms	Maus
MW	Mittelwert
MyD88	<i>Myeloid Differentiation primary response gene (88)</i>
n.s.	nicht signifikant
NADP	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NALP	NACHT (=NOD)-LRR-Pyrin Domäne-enthaltendes Protein
NF- $\kappa$ B	<i>Nuclear Factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells</i>
NK Zellen	Natürlichen Killerzellen
NKT Zellen	Natürliche Killer T Zellen
NLR	NOD-ähnliche Rezeptoren
NOD	Nucleotid-bindende Oligomerisations-Domäne
OAP	OVA Aerosol Provokation
OT	Objektträger
OVA	Ovalbumin
PALMs	Pollen-assoziierte Lipidmediatoren
PAMPs	Pathogen assoziierte molekulare Muster ( <i>pathogen-associated molecular patterns</i> )
PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pDC	Plasmazytoide DC
PD-L	<i>Programmed Death Ligand</i>
PE	Phycoerythrin
Pen-Strep	Penicillin-Streptomycin
PG	Prostaglandin
PI	Propidiumiodid
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
PPAR	Peroxisom-Proliferator-aktivierte Rezeptoren
PPE1	Phytoprostan E1
PRR	Mustererkennende Rezeptoren ( <i>pattern recognition receptors</i> )
PVP	<i>Polyvinylpyrrolidone</i>
RAGE	<i>Receptor for Advanced Glycation End products</i>
RANTES	<i>Regulated upon Activation, Normal T-cell Expressed, and Secreted</i>
rat	Ratte
RIG	Retinolsäure-induzierbares Gen
RLR	RIG-ähnlichen Rezeptoren
RNA	Ribonukleinsäure
ROR	<i>Receptor tyrosine kinase-like Orphan Receptor</i>
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Umdrehung pro Minute
RT	Raumtemperatur

---

SA	Streptavidin
SCIT	Subkutanen IT
SD	Standardabweichung
SDS	Natriumdodecylsulfat
SEM	Standardfehler ( <i>standard error of the mean</i> )
SIT	spezifische Immuntherapie
SLIT	Sublinguale IT
STAT	<i>Signal transducer and activator of transcription</i>
TARC	<i>Thymic and Activation-Regulated Chemokine</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TCR	T Zellrezeptor
Teff	Effektor-T Zellen
TGF	<i>Transforming Growth Factor</i>
TIR	Toll/ IL-1 Rezeptor
TIRAP	Toll/IL-1 Rezeptor-Domäne enthaltendes Adapterprotein
TLR	Toll-like Rezeptoren
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAF	<i>TNF Receptor-Associated Factor</i>
TRAM	TRIF-verwandtes Adaptermolekül
Tregs	Regulatorische T Zellen
TRIF	Toll/IL-1 Rezeptor-Domäne enthaltener IFN- $\beta$ induzierender Adapter
TSLP	<i>Thymic Stromal Lymphopoietin</i>
V	Versuch
wt	Wildtyp
ZKÜ	Zellkulturüberstand

# 1. Einleitung

## 1.1. Das Immunsystem

Das Immunsystem dient in erster Linie dem Schutz und der Erhaltung aller Funktionen des Organismus. Das beinhaltet die zügige Erkennung eingedrungener Pathogene oder verletzten Gewebes und die Fähigkeit, diese Signale zu verarbeiten und eine passende Immunantwort zu induzieren. Hierbei wirkt zunächst die angeborene Immunantwort, die antigenunspezifisch über mustererkennende Rezeptoren (PRR: *pattern recognition receptors*) die Pathogen assoziierten molekularen Muster (PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*) erkennt. Mit Hilfe von phagozytierenden Zellen (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Dendritische Zellen) und natürlichen Killerzellen (NK Zellen) wird während der angeborenen Immunantwort durch das Komplementsystem und die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen eine Entzündung hervorgerufen. Im nächsten Schritt wird mit Hilfe von antigenpräsentierenden Zellen (APC) die adaptive Immunantwort induziert. Diese antigenspezifische Immunreaktion wird zum einen von der humoralen (B Zellen) und zum anderen von der zellulären Immunantwort (T Zellen) getragen [153].

### 1.1.1. Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) stellen eine sehr heterogene und kleine Zellpopulation des Immunsystems dar [287]. Bereits im Jahre 1868 wurde die erste Population von DC in der Haut, die sogenannten Langerhans Zellen, von dem deutschen Pathologen und Biologen Paul Langerhans entdeckt. Erst viele Jahre später, im Jahr 1973, begann auch die funktionelle Charakterisierung der DC [300]. DC sind im peripheren Gewebe mit stark migratorischem Potenzial und im lymphatischen Gewebe mit stationärem Charakter angesiedelt [288]. Sie sind in der Lage, Antigene aufzunehmen, zu prozessieren und naiven T Zellen zu präsentieren und diese zu polarisieren. Auf indirektem Weg über aktivierte T Zellen oder über sekretierte Mediatoren aktivieren sie auch B Zellen und natürliche Killer T Zellen (NKT Zellen). DC stellen als professionelle APC ein Verbindungsglied zwischen angeborener und spezifischer Immunantwort dar. Abhängig von der jeweiligen DC Subpopulation und ihrem Aktivierungsgrad verändert sich die resultierende Immunantwort [152, 256].

#### 1.1.1.1. Subpopulationen

Die Einteilung der verschiedenen DC Subpopulationen stellt sich kompliziert dar. Man muss nicht nur zwischen den DC, die während der stationären Ruhephase, und denen, die während einer inflammatorischen Immunantwort auftreten, unterscheiden, sondern auch berücksichtigen, ob sie im peripheren oder lymphoiden Gewebe zu finden sind. Diese vielschichtigen DC Populationen

wurden vor kurzem sowohl von Shortman als auch Ueno et al. sehr übersichtlich dargestellt [288, 317].

Eine erste klassische Einteilung der DC Subtypen erfolgt in konventionelle und plasmazytoide DC (cDC und pDC).

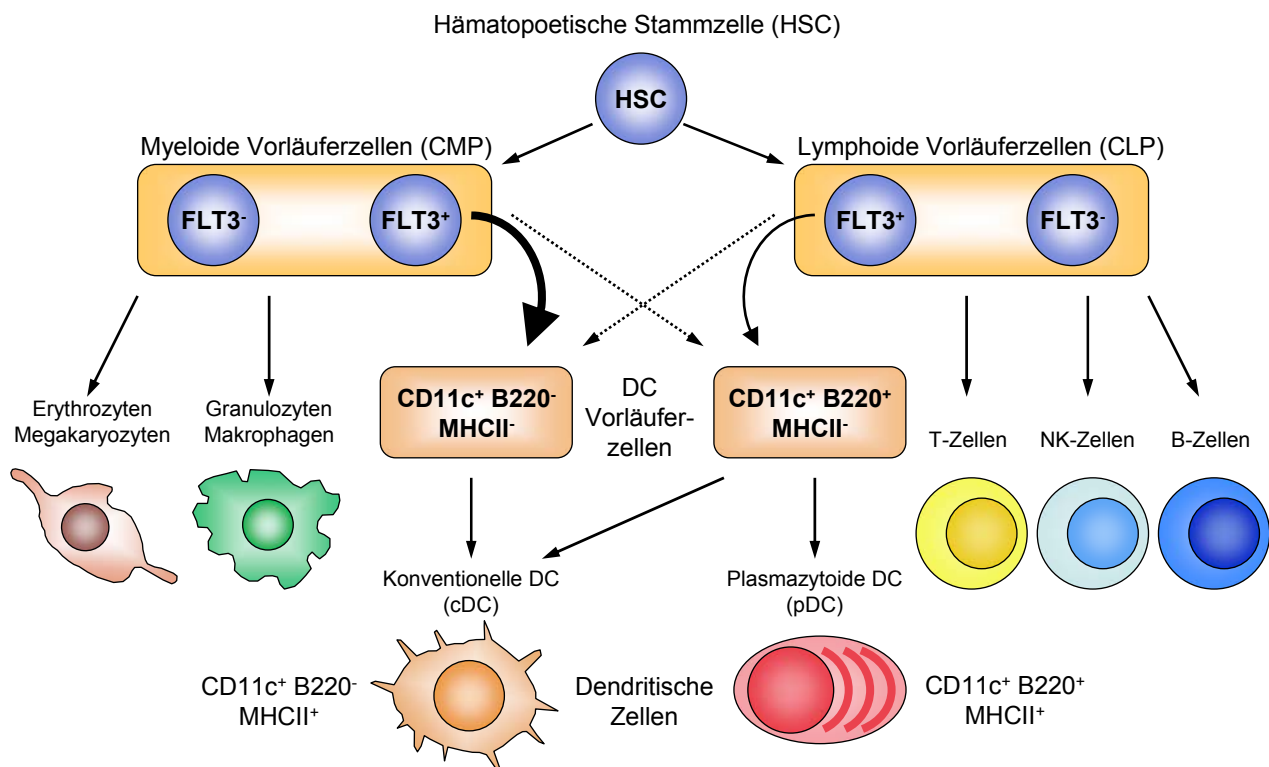
Die konventionellen DC lassen sich in weitere Subklassen unterteilen. Dazu zählen zum einen die migratorischen DC im peripheren Gewebe und zum anderen die stationären DC im lymphoiden Gewebe [288]. Im peripheren Gewebe unterscheidet man zusätzlich zwischen den epidermalen Langerhans Zellen (LC), die sich unter anderem durch die Expression von Langerin auf der Zelloberfläche auszeichnen, und den dermalen, auch interstitiellen DC in der Dermis [319]. Sowohl die migratorischen DC als auch die stationären DC im lymphoiden Gewebe lassen sich in  $CD8^+$  und  $CD8^-$  DC Subpopulationen einteilen, wovon sich die  $CD8^-$  nochmals in  $CD4^+CD8^-$  und  $CD4^-CD8^-$  untergruppieren lassen [334, 335].

Plasmazytoide DC stellen eine besondere Klasse der DC dar. Sie sind ihrem Namen nach als runde Zellen mit plasmazellähnlicher Morphologie charakterisiert und kommen im stationären Ruhezustand in geringer Anzahl in den primären und sekundären lymphoiden Organen und im Blut vor. Gleichzeitig produzieren sie insbesondere nach viraler Stimulation im Vergleich zu anderen Zellpopulationen sehr große Mengen an Typ I Interferonen [202, 289]. Durch verschiedene mikrobielle Stimuli, wie z.B. Herpes Simplex Virus, Influenza Virus oder durch IL-3, können pDC zu klassischen DC ausdifferenzieren. Sie weisen dann eine typisch dendritische Morphologie auf und exprimieren MHC Klasse II Moleküle konstitutiv. In diesem Entwicklungsstadium können sie in einer gemischten Lymphozytenreaktion (MLR) naive  $CD4^+$  und  $CD8^+$  T Zellen stimulieren [61, 111, 121, 269]. Die Analyse von pDC nach morphologischen und funktionellen Gesichtspunkten ergibt zwei verschiedene Entwicklungsstadien für pDC, die plasmazytoide und die dendritische Form, die bei einer Zelle nicht gleichzeitig auftreten können.

### ***1.1.1.2. Ontogenese***

DC haben ihren Ursprung in hämatopoetischen Stammzellen (HSC) des Knochenmarks. Bei der Differenzierung der Zellen werden zunächst aus den HSC myeloide oder lymphoide Vorläuferzellen gebildet [8, 183]. Es zeigte sich, dass sämtliche analysierten DC Subpopulationen sowohl aus den gewöhnlichen myeloiden als auch lymphoiden Vorläuferzellen (CMP und CLP) entstehen können [57, 211, 351]. Wie in Abbildung 1.1 dargestellt ist, spielt für die Entwicklung von DC die Expression des Flt3-Rezeptors auf den Vorläuferzellen eine wichtige Rolle. Der myeloide oder lymphoide Ursprung verliert an Bedeutung, weshalb die Bezeichnung myeloide DC (mDC) durch konventionelle DC (cDC) ersetzt wurde [66, 173]. Im weiteren Verlauf der Entwicklung lassen sich in der Maus zwei Klassen von DC Vorläuferzellen anhand der B220 Expression unterscheiden (siehe Abbildung 1.1). An dieser Stelle kommt es zur Teilung der Entwicklungswege von cDC und pDC. Die Vorläuferzellen der cDC lassen sich im Knochenmark

und in der Milz detektieren. Die endgültige Differenzierung findet primär in den peripheren lymphoiden Organen statt. Eine Klassifizierung der Subpopulationen erfolgt anhand der Expression von CD4 und CD8 [77, 78, 243]. Der Großteil der  $CD11^+B220^+$  Vorläuferzellen entwickelt sich zu pDC und ein kleiner Anteil zu cDC. Die in der Milz befindlichen pDC stammen vermutlich von pDC des Knochenmarks ab, unterscheiden sich von diesen allerdings durch einen veränderten Maturations- und Aktivierungsgrad [251, 254].



Adaptiert von Shortman K and Naik SH. *Nat Rev Immunol*, 2007, 7: 19-30 und Diao J et al. *J Immunol*, 2004, 173: 1826-1833

### Abbildung 1.1 Differenzierung von Dendritischen Zellen aus Knochenmarkszellen

Dargestellt ist die Entwicklung der DC aus hämatopoetischen Vorläuferzellen in Abhängigkeit der Expression des Flt3-Rezeptors auf den Vorläuferzellen unabhängig vom myeloiden oder lymphoiden Ursprung. (Quellen: [78, 288])

Die Abstammung der Langerhans Zellen, die in der Epidermis der Haut auftreten und als klassisches Modell der peripheren cDC mit stark migratorischem Potential dienen, scheint auf Monozyten zu beruhen. Den indirekten Beweis dafür lieferte die Analyse von M-CSFR-defizienten Mäusen, die neben einer Monozyten-Defizienz auch keine Langerhans Zellen aufweisen [112].

#### 1.1.1.3. Aktivierung von DC

Wenn sich DC im stationären Ruhezustand im peripheren Gewebe befinden, besteht ihre Aufgabe als Sentinel des Immunsystems darin, endogene und exogene Signale zu erkennen und weiterzuleiten. In diesem immaturren Stadium besitzen sie eine hohe Phagozytose-, Endozytose- und Makropinozytoseaktivität, um potentielle Antigene aufzunehmen [149, 266, 277]. Die Antigenaufnahme kann ein erstes Maturationsignal darstellen und wird z.B. über C-Typ Lektin

Rezeptoren wie dem Makrophagen Mannose Rezeptor und dem DEC-205, als auch den Fc $\gamma$ - und Fc $\epsilon$ -Rezeptoren vermittelt [158, 277, 278].

Für die Aktivierung der DC existieren verschiedene Oberflächen- und intrazelluläre PRR. Jeder PRR erkennt spezifische PAMPs, die für den Mikroorganismus lebenswichtig sind und sich somit evolutionär sehr langsam verändern. Des Weiteren erkennen sie defektassoziierte molekulare Muster (DAMP: *damage-associated molecular pattern*), zu denen z. B. Hitzeschockproteine,  $\beta$ -Defensin, ATP und nekrotisch gestorbene Zellen zählen. Über die jeweiligen PRR werden in den entsprechenden Zellen festgelegte Signalwege aktiviert, die eine Immunantwort bewirken [17, 106, 317].

Zu den Oberflächenrezeptoren der PRR zählen die Toll-like Rezeptoren (TLR) und die C-Typ Lektin Rezeptoren (CLR). Intrazellulär sind ebenfalls einige der TLR, sowie die NOD (Nucleotid-bindende Oligomerisations-Domäne)-ähnlichen Rezeptoren (NLR) und die RIG (Retinolsäure-induzierbares Gen)-ähnlichen Rezeptoren (RLR) als PRR beschrieben.

Weitere Rezeptoren, die eine Aktivierung von DC bewirken, sind CD36, CD40, CD91, CCR5, Lox-1 (*low density lipoprotein receptor-1*), RAGE (*receptor for advanced glycation end products*), Fc-Rezeptoren, sowie P2X und P2Y-Rezeptoren. Die wichtigsten Rezeptoren werden im Folgenden genauer erläutert.

**TLR** sind Typ I integrale Membranproteine mit variierender Anzahl an Leucin-reichen Wiederholungsmotiven (LRR) und einer zum IL-1 Rezeptor homologen zytoplasmatischen Signaldomäne, auch Toll/IL-1R (TIR) homologe Domäne genannt [44]. Sie erkennen in der ersten Phase der Immunabwehr vielfältige mikrobielle Strukturen. Dazu zählen Gram-positive und Gram-negative Bakterien, Mykobakterien, ihre RNA (Ribonukleinsäure) und DNA (Desoxyribonukleinsäure), Viren, Pilze und Protozoen, was eine Aktivierung vieler immunologisch und inflammatorisch wichtiger Gene bewirkt [63].

Der erste TLR wurde 1996 in *Drosophila*, die ausschließlich über eine innate Immunabwehr verfügt, entdeckt. Bereits ein Jahr später wurde das humane Homolog beschrieben [196, 226]. Bis heute wurden mindestens 11 Mitglieder der TLR-Familie in Säugern identifiziert. Säuger TLR, insbesondere TLR1-9 liegen zwischen Mensch und Maus konserviert vor. TLR10 scheint nur im Menschen, nicht aber im murinen System funktionell zu sein [17, 309].

TLR werden von vielen verschiedenen Zelltypen, wie DC, Makrophagen, B Zellen, spezifische Subpopulationen von T Zellen, Fibroblasten und Epithelzellen exprimiert. Dabei ist das Expressionsmuster für jeden Zelltyp verschieden. Hinzu kommt, dass Zellen die Expression der TLR äußeren Bedingungen, wie z.B. anwesenden Pathogenen, Zytokinen und umweltbedingtem Stress, anpassen und nicht immer konstitutiv exprimieren [17]. Tabelle 1.1 zeigt, dass auch zwischen den Spezies Unterschiede in der Expression der TLR bestehen. Besonders hervorzuheben ist hierbei die im humanen nicht beobachtete Expression von TLR9 in murinen cDC [87, 167].

TLR	Humane DC Subtypen				Murine DC	
	pDC	cDC (Blut)	LC	Int DC	cDC	pDC
TLR1	+	+	+		+	+
TLR2	-	+	+	+	+	+
TLR3	-	+	+	-	+	-
TLR4	-	+	-	+	+	-/+
TLR5	-	+	-	+	+	+
TLR6	+	+	+	-	+	+
TLR7	+	+	?	-	+	+
TLR8	-	+	?	-	+	+
TLR9	+	-	-	-	+	+
TLR10	+	+	+	-	-	-

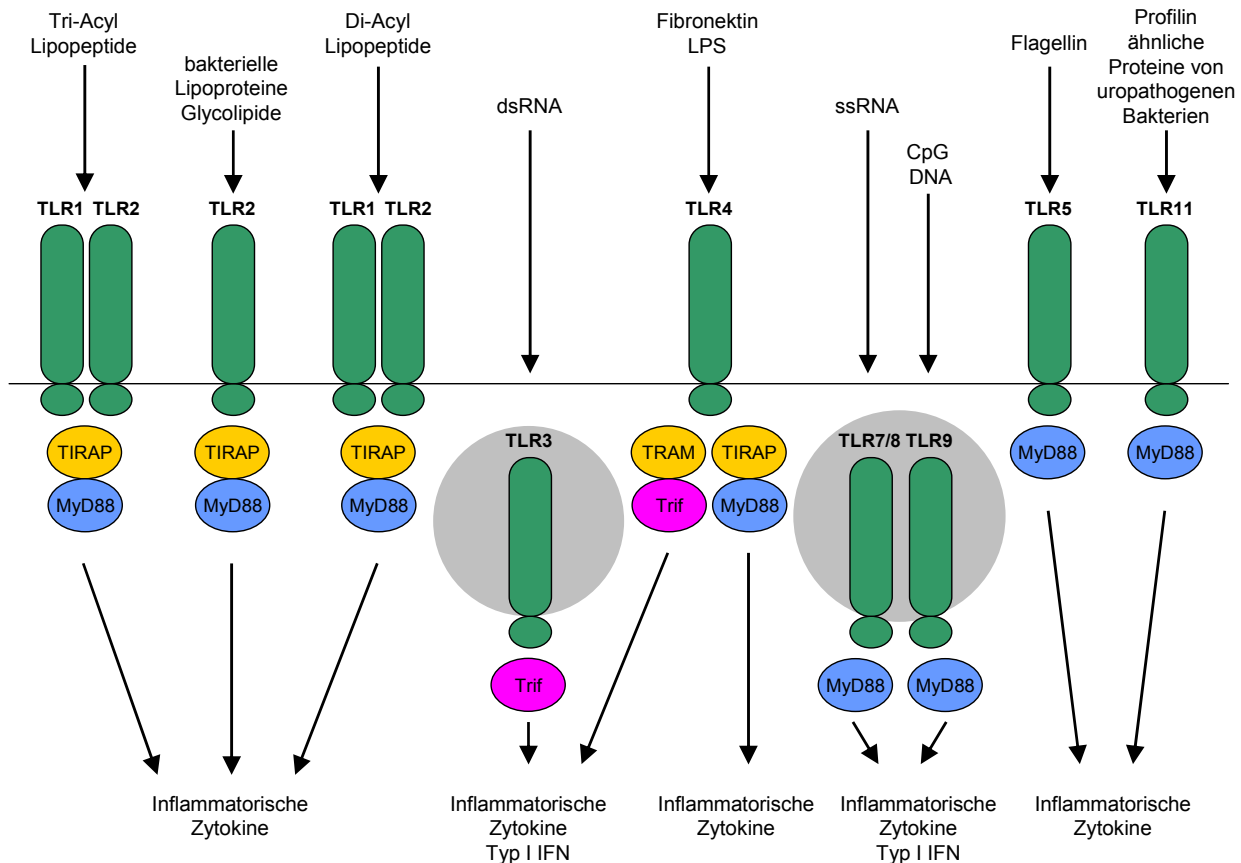
**Tabelle 1.1 TLR Expression in humanen und murinen DC Subtypen**

(Tabelle erstellt aus folgenden Quellen: [87, 95, 167, 320])

Die verschiedenen TLR werden zum einen nach ihrem zellulären Auftreten klassifiziert. Hierbei differenziert man zwischen extrazellulär an der Zelloberfläche exprimierten (TLR1, 2, 4, 5 und 6) und intrazellulär endosomal auftretenden TLR (TLR 3, 7, 8 und 9). Zum anderen erfolgt die Einteilung in Subgruppen in Abhängigkeit von ihrer Primärstruktur und den von ihnen erkannten Liganden. Als Beispiel erkennt TLR4 unter anderem Lipopolysaccharide (LPS). TLR9 ist zuständig für die Bindung von viraler DNA, die gehäuft CpG-DNA-Motive enthält. Manche TLR sind im Stande, auch mehrere strukturell verschiedene Liganden zu erkennen (siehe Abbildung 1.2) [17].

Abhängig von der Aktivierung der TLR werden verschiedene Signalkaskaden induziert. So ist z.B. TLR4 in der Lage, verschiedene Adaptermoleküle, wie MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene (88)*) mit TIRAP (Toll/IL-1 Rezeptor-Domäne enthaltendes Adapterprotein) oder TRAM (TRIF-verwandtes Adaptermolekül) mit TRIF zur Signalweiterleitung zu nutzen. TLR7/8, TLR9 und TLR11 vermitteln die Signale ausschließlich über MyD88. Über diese Signalwege werden inflammatorische Zytokine und Typ I Interferone induziert (siehe Abbildung 1.2).





Adaptiert von Kawait T et Akira S. *Cell Death Differ*, 2006, 13:816-825

**Abbildung 1.2 Die verschiedenen TLR mit ihren Liganden und ihren induzierten Signalwegen**

In die Gruppe der **CLR** fallen alle Proteine, die eine oder mehrere C-Typ Lektin ähnliche Domänen (CTLD) aufweisen [354]. CLR werden als lösliche oder transmembran gebundene Proteine gebildet. Insbesondere durch die Charakterisierung verschiedener transmembraner CLR konnte die Expression einiger CLR spezifisch für bestimmte DC Populationen detektiert werden [94, 317]. Diese lassen sich anhand der molekularen Ausrichtung des Amino-N-Terminus in zwei Hauptgruppen einteilen. Zu den Typ I CLR zählen die Mannose Rezeptoren (MR), wie z.B. MMR (Makrophagen Mannose Rezeptor, auch CD206) oder DEC-205 [84]. Zur Gruppe der Typ II CLR gehören die Asialoglycoprotein Rezeptoren (ASGPR). Hierzu zählen unter anderem der DC-SIGN (CD209) und das Langerin (CD207) [94, 170]. Beide Gruppen von CLR sind in der Lage, vielfältige Strukturen wie Kohlenhydrate, Proteine und Lipide von verschiedenen Pathogenen, als auch Strukturen von endogenen Molekülen zu binden und so multiple Funktionen zu vermitteln. Sie wirken als Adhäsionsmolekül zwischen DC und anderen Zellpopulationen und können über die Antigenaufnahme und -präsentation mittels MHC Klasse I und II die T Zell-Polarisierung beeinflussen [324]. Wie auch bei den TLR werden die CLR spezifisch auf bestimmten DC-Populationen exprimiert. So wird Langerin spezifisch von LC und DC-SIGN spezifisch von cDC exprimiert [317, 324].

**NLR** liegen intrazellulär vor. Mittlerweile wurden mehr als 23 NLR-Proteine im humanen Genom detektiert, wovon einige eine wichtige funktionelle Rolle in der Regulation proinflammatorischer Zytokine spielen [311]. Die Aktivierung von NLR durch die Bindung von Liganden, wie z.B. PAMPs, kann zwei Signalwege einschalten. Der eine signalisiert über den heterodimeren Transkriptionsfaktor NF- $\kappa$ B, der eine Schlüsselrolle in der Regulation der proinflammatorischen Immunantwort spielt, und der andere über das Inflammasom, das sich aus einem Multiprotein-Komplex zusammensetzt und unter anderem die Aktivierung von proinflammatorischen Caspasen bewirkt. So könnte die Erkennung von PAMPs über NLR eine Verstärkung der TLR-abhängigen Signalwege bewirken [73, 214]. DC und Makrophagen exprimieren die NLR NOD 1 und 2. LC bilden NALP1. Allerdings ist die Expression der NLR von DC noch nicht vollständig aufgeklärt [317]. Polymorphismen in den NLR-Genen wird eine Rolle bei der Entstehung von Asthma zugeschrieben [147].

**RLR** sind intrazelluläre, im Zytoplasma situierte Rezeptoren für virale doppel- und einzelsträngige RNA. Da allerdings in DC die intrazellulären TLR die Aufgabe der Erkennung von viralen Nukleinsäuren übernehmen, spielen RLR in DC nur eine untergeordnete Rolle [63, 73].

DC werden aber nicht nur über die beschriebenen PRR, sondern auch über Signale von Immunzellen der angeborenen Immunantwort aktiviert. So können Neutrophile, deren Aufgabe in der Phagozytose und dem Abtöten von Bakterien liegt, durch die Sekretion von  $\beta$ -Defensinen oder durch die Interaktion von DC-SIGN mit Mac-1/ CEACAM-1 DC aktivieren und zur IL-12 Sekretion anregen [227, 322].

Ein weiteres Aktivierungssignal für DC ist TSLP (*thymic stromal lymphopoietin*). Es wird von Epithelzellen, insbesondere von Keratinozyten atopischer Patienten, sekretiert. Diese TSLP-aktivierten DC sekretieren daraufhin die Chemokine TARC (*thymic and activation-regulated chemokine*) und MDC (*macrophage-derived chemokine*), die naive T Zellen in Richtung Th2 polarisieren und Th2 polarisierte T Zellen rekrutieren können [297]. Neben TSLP bilden Keratinozyten in Abhängigkeit vom Aktivierungssignal auch Typ I Interferone und IL-18, worüber sie die Maturation und funktionelle Polarisierung der DC in Richtung Th1 lenken [194].

Aktivierte Mastzellen setzen verschiedene Mediatoren wie TNF (Tumor Nekrose Faktor)- $\alpha$  oder Histamin und Proteasen aus Zytoplasmakörnchen frei. Zeitversetzt werden weitere Zytokine wie z.B. IL-4, IL-5, GM-CSF, Prostaglandine oder TSLP sekretiert. Viele dieser Mediatoren beeinflussen die Maturation, die Migration oder das Zytokinprofil der DC, z.B. durch Inhibierung von IL-12 und IL-6, was eine Th2 polarisierende Wirkung auf T Zellen unterstützt [105, 223].

Auch Zellen des angeborenen Immunsystems, wie NK Zellen, NKT Zellen und  $\gamma\delta$ -T Zellen, können DC aktivieren und die Maturation beeinflussen. Dies ist häufig lokal auf den Bereich der Lymphozytenaktivierung begrenzt und tritt meist frühzeitig während der induzierten Immunreaktion auf. Nach Aktivierung der Lymphozyten bewirken diese über Zytokine wie z.B. TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  oder über direkten Zellkontakt einen Anstieg der IL-12 Sekretion und eine

Maturation der DC gekennzeichnet durch eine erhöhte CD86 Expression, wodurch DC eine Th1 Polarisierung naiver T Zellen begünstigen. Die Aktivierung der DC durch Lymphozyten ist jedoch nicht einseitig, sondern eine reziproke Interaktion zwischen den Zellpopulationen [101, 109, 197].

#### ***1.1.1.4. Antigenpräsentation***

Die in Kapitel 1.1.1.3 beschriebene Aktivierung der DC bewirkt eine Reifung der Zelle. Dadurch verlagert sich ihre primäre Aufgabe der Antigenaufnahme in Richtung Antigenpräsentation.

Für die Peptidpräsentation existiert der aus Glykoproteinen aufgebaute Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC: Major Histocompatibility Complex). Dieser MHC wird in Klasse I, II und III unterteilt. MHC Klasse III spielt für die Antigenpräsentation jedoch keine Rolle und wird hier nicht weiter ausgeführt. Für die Lipidpräsentation dient die CD1-Familie, die sich im Humansystem aus fünf Mitgliedern (CD1a – CD1e), im murinen System aus nur einem Mitglied, dem CD1d, zusammensetzt.

##### **1.1.1.4.1. MHC**

MHC Moleküle sind sowohl polygen als auch polymorph. Diese beiden Eigenschaften ermöglichen jedem Individuum eine große Vielfalt an Peptidbindungs- und Präsentationsmöglichkeiten, um möglichst viele Pathogene erkennen und bekämpfen zu können. Ursprünglich wurden die MHC Antigene als humane Leukozytenantigene (HLA), in der Maus als H-2 bezeichnet. Verschiedene Gene kodieren für die MHC Klasse I und Klasse II Region.

MHC Klasse I und Klasse II Moleküle werden aufgrund ihrer Präsentationseigenschaften von bestimmten Zelltypen exprimiert. So wird MHC Klasse I von allen kernhaltigen Zellen, insbesondere hämatopoetischen Zellen gebildet. Er dient der Präsentation von intrazellulären Peptiden. Dies kann durch z.B. fehlerhaft synthetisierte Peptide oder virale Fragmente eine Aktivierung der CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T Zellen zur Folge haben, wodurch die infizierten oder defekten Zellen beseitigt werden. Endogene Peptide bewirken keine Aktivierung der zytotoxischen T Zellen [153].

Im Gegensatz zu MHC Klasse I wird MHC Klasse II hauptsächlich von professionellen APC, wie DC, B Zellen oder Makrophagen exprimiert. Das MHC Klasse II Molekül wird mit durch Proteasen gespaltenen Peptiden von extrazellulär aufgenommenen Proteinen beladen und zur Antigenpräsentation an die Zelloberfläche befördert. Die präsentierten Peptide können durch Kontakt mit entsprechenden CD4<sup>+</sup> T Zellen die adaptive Immunantwort aktivieren [125].

Eine weitere Möglichkeit, exogene Peptide zu präsentieren, ist die Kreuzpräsentation. Sie ist von großer Bedeutung für die Induktion einer Immunantwort gegenüber Tumorantigenen und gegenüber der Infektion von Nicht-Immunzellen mit Mikroorganismen [36, 37]. DC nehmen diese infizierten Nicht-Immunzellen auf, bauen sie ab und präsentieren Fragmente dieser Zellen über MHC Klasse I

anstatt über MHC Klasse II, wodurch eine zytotoxische Immunantwort durch Aktivierung von CD8<sup>+</sup> Zellen induziert wird [18]. Die Kreuzpräsentation von Antigenen ist eine spezielle Eigenschaft von DC, obwohl auch Makrophagen und andere Zelltypen ein geringes Potential zur Kreuzpräsentation aufweisen [4].

#### 1.1.1.4.2. CD1

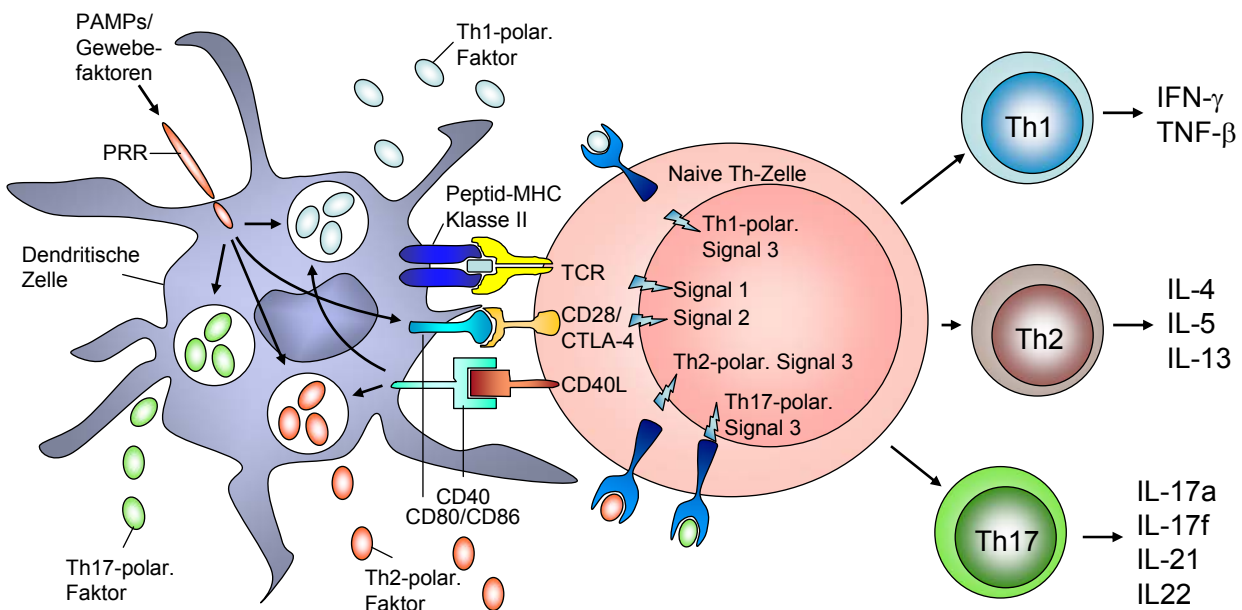
Neben dem System für die Peptidpräsentation existiert ein System zur Lipid- und Glycolipidpräsentation, das CD1-System. Im humanen System wurden bisher fünf CD1-Gene, CD1a bis CD1e, detektiert. Im murinen System wurden nur zwei CD1-Gene, beide Homologe zum CD1d-Gen, bestimmt. Im Gegensatz zu den MHC-Genen sind die CD1-Gene nicht polymorph. Sie weisen eine den MHC Klasse I Genen ähnliche Struktur auf und werden anhand ihrer Homologien in drei Gruppen unterteilt (Gruppe 1: CD1a, b und c; Gruppe 2: CD1d; Gruppe 3: CD1e). Die CD1-Moleküle werden von APC, wie z.B. DC, B Zellen und Makrophagen, aber auch von kortikalen Thymozyten, Kupffer Zellen und Endothelzellen gebildet. CD1a bis CD1d werden auf der Zelloberfläche exprimiert. CD1e verbleibt im endosomalen Raum und bindet in seiner löslichen Form zelleigene Glycosphingolipide und mykobakterielle Antigene. Zusätzlich unterstützt es die Aktivität der  $\alpha$ -Mannosidase und vermutlich auch anderer Hydrolasen bei der Prozessierung von Lipiden [22, 68, 69]. Durch CD1a - c werden verschiedene T Zellklone aktiviert. Lipide, die über CD1d-Moleküle präsentiert werden, aktivieren vornehmlich NKT Zellen, insbesondere die Klasse der invarianten NKT Zellen (vgl. Kapitel 1.1.2.6). Als Liganden für CD1-Moleküle wurden sowohl Lipide von bestimmten Mikroorganismen, wie z.B. von *Mycobacterium tuberculosis*, als auch Lipide aus Pollen, wie z.B. Phospholipide [5] und endogene Lipide, entdeckt. Viele verschiedene Lipid-Klassen können über CD1-Moleküle präsentiert werden. Insbesondere das synthetisch hergestellte, ursprünglich aus Meeresschwämmen isolierte  $\alpha$ -Galactosylceramid ( $\alpha$ -GalCer) dient derzeit als Modellantigen zur Aktivierung von NKT Zellen [27]. Die CD1-Moleküle binden die hydrophoben Alkylketten ihrer Liganden in hydrophoben Bindungstaschen. Abhängig vom CD1-Molekül ist eine unterschiedliche Anzahl an Kanälen vorhanden, die verschieden lange und verschieden viele Alkylketten binden können. Die hydrophile Kopfgruppe des Lipidantigens ragt aus der Bindungstasche heraus [27, 356]. Die Aufnahme der Lipide erfolgt über verschiedene Wege. Zum einen können Lipide von apoptotischen Zellen oder bakteriellen Zellen über Phagozytose während einer Infektion aufgenommen werden. Zum anderen können extrazelluläre Lipide, die im Serum gebunden an Apolipoproteine als Lipid-Transport Partikel vorliegen, z.B. über LDL (*low density lipoprotein*)-Rezeptoren internalisiert werden. In verschiedenen Zellkompartimenten, wie dem Endosom oder Lysosom, erfolgt die Beladung der CD1-Moleküle mit Lipidantigen [27, 69].

### 1.1.1.5. Interaktion der DC mit adaptiven Immunzellen

Nach der in Kapitel 1.1.1.3 beschriebenen Aktivierung der DC verlagert sich nicht nur die primäre Aufgabe der DC von der Antigenaufnahme in Richtung Antigenpräsentation (vgl. Kapitel 1.1.1.4), sondern es verändert sich auch die Morphologie der Zelle. Die Endozytose- und Phagozytose-Aktivität verringert sich, Chemokine zur Anlockung benötigter Immunzellen werden sekretiert, kostimulatorische Moleküle werden exprimiert und Zytokine zur Differenzierung und Polarisierung der angelockten Immunzellen werden sekretiert [317]. Die daraus resultierenden Interaktionsmöglichkeiten mit adaptiven Immunzellen sind im Folgenden dargestellt.

#### 1.1.1.5.1. T Zell-Polarisierung

Für eine optimale Differenzierung und Polarisierung naiver T Zellen durch aktivierte DC sind zeitgleich verschiedene Signale notwendig, die mit Hilfe der 3-Signal Hypothese beschrieben werden (siehe Abbildung 1.3).



Adaptiert von Kapsenberg ML. *Nat Rev Immunol*, 2003, 3(12): 984-93

Abbildung 1.3 T Zell-Polarisierung durch DC: Die 3-Signal Hypothese

**1. Signal - das antigenspezifische Signal** (siehe Kapitel 1.1.1.4.1): Hierbei werden Antigene über den MHC Klasse II Komplex naiver T Zellen präsentiert. Das Antigen wird durch die Interaktion mit dem T Zellrezeptor (TCR) erkannt, wodurch die naiven T Zellen aktiviert und zur Proliferation angeregt werden. Die Dauer und die Affinität der TCR-MHC-Interaktion können die T Zell-Polarisierung beeinflussen. Eine lang anhaltende Interaktion mit geringer Affinität unterstützt die Entwicklung einer Th2 Antwort, eine kurze Interaktion mit hoher Affinität eine Th1 Antwort. Bei

einer hohen Bindungsstärke des TCR kann dieses Signal allein für eine T Zellaktivierung genügen [62, 172].

**2. Signal – das kostimulatorische Signal** (siehe Kapitel 1.1.1.5.2): Hierbei interagieren kostimulatorische Moleküle, wie CD40, CD80, CD86 der DC mit Oberflächenmolekülen auf T Zellen. Es werden sowohl stimulatorische als auch inhibitorische Signale vermittelt, so dass das Gleichgewicht zwischen Immunität und immunologischer Toleranz reguliert werden kann. Die Interaktionen von CD40 mit CD40-Ligand oder CD80 mit CD28 fördert eine Th1-Polarisierung, wohingegen die Interaktion von CD86 mit CD28 oder OX40-Ligand mit OX40 eine Th2-Polarisierung begünstigt [26, 65].

**3. Signal – das polarisierende Signal:** Abhängig von der Polarisierung der DC bilden sie zellpolarisierende Moleküle, wie lösliche oder membrangebundene Faktoren, welche die resultierende Immunantwort beeinflussen und somit entweder eine Th1, Th2, Th17 oder regulatorische T Zellantwort bewirken. Th1 polarisierende Signale sind z.B. IL-12, IL-23, IL-27, Typ I Interferone oder ICAM-1. Chemokin Ligand 2 (CCL2), PGE<sub>2</sub> und Histamin sind Beispiele für Th2 polarisierende Faktoren. Zu Th17 polarisierenden Molekülen zählen z.B. IL-6 und TGF-β. TGF-β wird neben IL-10 auch als Signal für regulatorische T Zellen beschrieben [35, 152, 169, 172, 210].

Die verschiedenen Effektor-T Zellen und deren sekretierte Zytokine wirken antagonistisch zueinander. Aus diesem Grund wird immer nur eine Effektor-T Zellpopulation zu einem Zeitpunkt dominierend die resultierende Immunantwort bestimmen [168]. Allerdings lassen sich die polarisierenden Faktoren nicht immer eindeutig in Th1, Th2, Th17 oder regulatorisch einteilen. So bewirkt z.B. eine hohe LPS Dosis die erwartete Th1 Polarisierung, eine niedrige LPS Dosis hingegen begünstigt eine Th2 Polarisierung [89]. Ähnlich verhält es sich mit der Konzentration an IL-4 während der DC Differenzierung aus Monozyten. Eine geringe IL-4 Konzentration begünstigt eine Th2, eine hohe Konzentration eine Th1 Polarisierung [124]. Neben der Konzentration spielt auch der Zeitpunkt der Signale eine Rolle bei der resultierenden Immunantwort. So können DC eine Th1 polarisierende Wirkung entfalten, wenn IL-4 während der initialen Aktivierung der DC durch Pathogene anwesend ist. Zu einem späteren Zeitpunkt, wenn bereits die T Zell-Polarisierung stattfindet, bewirkt die Anwesenheit von IL-4 eine Th2 Polarisierung [38]. Neben dem Zeitpunkt und der Konzentration eines Signals hat auch das Verhältnis von Effektor- zu Responderzellen einen Einfluss auf die T Zell-Polarisierung. Hierbei begünstigt ein niedriges DC-T Zell-Verhältnis eine Th2, ein hohes DC-T Zell-Verhältnis eine Th1 Immunantwort [152]

#### **1.1.1.5.2. Interaktion über kostimulatorische Moleküle**

Wie schon in Kapitel 1.1.1.5.1 kurz beschrieben, spielen kostimulatorische Moleküle eine wichtige Rolle bei der T Zellaktivierung und -polarisierung. Eine Vielzahl der kostimulatorischen Moleküle gehört zur TNF-Superfamilie oder zur Immunglobulin-Superfamilie, zu der die B7-Familie und

CD28-Familie zählen. Aufgrund ihrer Funktionalität können die Moleküle als kostimulatorische Faktoren, die die TCR-vermittelte Antwort verstärken, oder als koinhibitorische Faktoren, die die TCR-vermittelte Antwort inhibieren, klassifiziert werden. In Abhängigkeit vom Stand der induzierten T Zellantwort und der inflammatorischen Umgebung kann die Expression der kostimulatorischen Moleküle variieren und differentielle Immunantworten induzieren.

DC exprimieren induzierbare Oberflächenmoleküle der B7-Familie, mit denen sie durch direkten Zellkontakt die T Zell-vermittelte Immunantwort nach TCR-Interaktion regulieren können. Bisher konnten sieben Mitglieder der B7-Familie identifiziert werden. Dazu zählen CD80 (B7-1), CD86 (B7-2), der induzierbare kostimulatorische Ligand (ICOS-L), PD-L1 und PD-L2 (*programmed death ligand*), sowie B7-H3 und B7-H4. Sie können sowohl von DC als auch Makrophagen exprimiert werden. Insbesondere CD80 und CD86 werden bei der Analyse von DC häufig als Maturationsmarker herangezogen. CD86 wird in schwacher Ausprägung konstitutiv exprimiert und nach Aktivierung schnell hochreguliert, wohingegen CD80 erst im Verlauf der Aktivierung induziert wird. Beide Moleküle zeichnen sich durch eine duale Spezifität für den stimulatorischen Rezeptor CD28 und den inhibitorischen Rezeptor CTLA-4 (zytotoxisches T Lymphozyten Antigen 4) auf T Zellen aus. CD80 und CD86 besitzen eine höhere Bindungsaffinität zu CTLA-4. Dieser Rezeptor wird im Gegensatz zum konstitutiv exprimierten CD28 erst nach Aktivierung der T Zellen exprimiert [286].

ICOS-L wird neben DC und Makrophagen auch von B Zellen, CD3<sup>+</sup> T Zell-Subpopulationen, Endothel- und Epithelzellen exprimiert. Im Gegensatz zu CD80 und CD86 ist die Expression von ICOS-L unabhängig von NF- $\kappa$ B und wird nicht durch CD40 Ligation induziert [7, 286]. Es konnte gezeigt werden, dass der Signalweg über ICOS-L in Anwesenheit von IL-10 eine wichtige Rolle für die Induktion von IL-10 produzierenden regulatorischen T Zellen spielt und die Entstehung von Atemwegserkrankungen und Atemwegshyperreaktivität positiv beeinflusst [11, 150].

PD-L1 wird im Gegensatz zu PD-L2, der durch die Induktion von Zytokinen auf DC und Makrophagen exprimiert wird, auf B Zellen, T Zellen, DC als auch auf nicht hämatopoetischen Zellen und nicht lymphoiden Organen exprimiert. Der Einfluss dieser beiden Liganden auf die immunologische T Zellantwort in Interaktion mit PD-1 wird in der Literatur kontrovers dargestellt. Zum einen wird eine Rolle in der Regulation der Toleranz aufgrund von inhibierter T Zellproliferation und verminderter Zytokinsekretion vorgeschlagen. Zum anderen wurde durch PD-1 Liganden auch eine T Zellaktivierung beobachtet [80, 99, 118, 192].

Die TNFR / TNF-Familie setzt sich aus derzeit 29 Rezeptoren zusammen und formt mit den bisher 19 bekannten Liganden über 40 verschiedene Rezeptor-Ligand Verbindungen, die über die Aktivierung verschiedener Signalwege Apoptose, Zellüberleben, -differenzierung und -proliferation induzieren können. Die TNF-Rezeptoren werden von einer sehr großen Bandbreite von Zellen exprimiert, wohingegen fast alle Liganden hauptsächlich von Immunzellen, wie B Zellen, T Zellen, NK Zellen, Monozyten und DC gebildet werden [6]. Vereinfacht betrachtet werden die Liganden

meist von APC und die Rezeptoren von T Zellen exprimiert, jedoch können T Zellen ebenfalls TNF Liganden exprimieren und somit durch direkte T Zellinteraktion die von APC induzierten Signale verstärken. Ein Beispiel der TNFR / TNF-Familie ist CD40 / CD40L. Die Interaktion von CD40 mit CD40L induziert die Expression von CD80 und CD86 auf DC und führt zur IL-12 Sekretion der DC [54]. Ein weiteres Beispiel für eine kostimulatorische Interaktion der TNFR / TNF-Familie stellt OX40 / OX40L dar. Die Expression von OX40L auf DC wird erst durch DC aktivierende Signale über CD40, LPS oder den B Zellrezeptor induziert. Diese Interaktion begünstigt eine Th2 Polarisierung und scheint einen Einfluss auf die Entwicklung von allergischem Asthma auszuüben [64, 276].

#### **1.1.1.5.3. Interaktion über Zytokine**

Neben den kostimulatorischen Molekülen sekretieren DC verschiedene Zytokine, durch die sie die Immunantwort ebenfalls regulieren können und die Polarisierung der T Zellen beeinflussen (siehe Kapitel 1.1.1.5.1 Signal 3). DC sind in der Lage, u.a. in Abhängigkeit der jeweiligen TLR Aktivierung verschiedene Zytokine zu sekretieren. Dazu zählen IL-1 $\alpha/\beta$ , IL-2, IL-6, IL-10, TNF- $\alpha$  und Mitglieder der IL-12 Familie [72, 117, 221, 295]. Typ I Interferone werden insbesondere von pDC nach viraler Aktivierung produziert [23]. Die Mitglieder der IL-12 Familie IL-12p70, IL-23, IL-27, aber auch IL-1 $\alpha/\beta$  und IL-6 wurden mit einer Th1 Polarisierung naiver T Zellen in Verbindung gebracht [138, 316]. Eine Th2 Polarisierung naiver T Zellen wird durch eine gehemmte Sekretion von IL-12 begünstigt [155]. Des Weiteren wurde gezeigt, dass das von pulmonalen DC sekretierte IL-10 in der Lage ist, die Induktion von regulatorischen T Zellen zu unterstützen [9].

#### **1.1.1.6. Tolerogene DC**

Neben der Aktivierung der adaptiven Immunantwort und der Polarisierung entsprechender Effektor-T Zellen sind DC für die Erhaltung der peripheren und zentralen Toleranz gegenüber körpereigenen und harmlosen Umweltantigenen verantwortlich. Sowohl der Aktivierungsgrad und der funktionelle Status der DC als auch verschiedene DC Subtypen haben einen Einfluss auf die Toleranzerhaltung. Hierbei handelt es sich nicht nur um eine einseitige Signalübermittlung durch die DC, sondern eine bidirektionale Interaktion von DC mit regulatorischen T Zellen. Die Mechanismen der Toleranzerhaltung stellen sich sehr komplex dar und werden sowohl über direkten Zellkontakt als auch über lösliche Faktoren vermittelt [146]. Insbesondere immature cDC spielen eine wichtige Rolle bei der immunologischen Toleranz. So wurde z.B. *in vivo* gezeigt, dass immature stationäre cDC während der Antigenpräsentation in Abwesenheit von kostimulatorischen Molekülen Toleranz durch klonale T Zelldeletion oder durch die Induktion von regulatorischen T Zellen aufrecht erhalten [41, 134, 284]. Auch durch direkten Zellkontakt von immaturren cDC mit peripheren CD4<sup>+</sup> T Zellen wurde eine tolerogene Wirkung der DC beobachtet. Nach wiederholter *in vitro* Stimulation der CD4<sup>+</sup> T Zellen mit alloge-nen immaturren cDC zeigte sich eine Inhibierung der T Zellproliferation, sowie eine Induktion von IL-10 sekretierenden T Zellen [162]. Ein Ansatz zur



Generierung von tolerogenen DC stellt die Behandlung von immaturren cDC mit Reagenzien, die deren Maturation, Differenzierung und Aktivierung inhibieren, wie z.B. Vitamin D3 oder IL-10, auch in Kombination mit TGF- $\beta$  dar. Die mit diesen Reagenzien behandelten DC weisen eine verringerte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und kostimulatorischen Molekülen auf und zeigen eine verminderte Fähigkeit zur Aktivierung von alloreaktiven T Zellen [261, 279, 299].

Auch semi-mature DC besitzen ein regulatorisches Potential. Sie exprimieren zwar bereits kostimulatorische Moleküle, aber nur geringe Mengen an Zytokinen oder polarisierenden Signalen. In diesem Aktivierungsgrad sind sie in der Lage, die Entwicklung von adaptiven regulatorischen T Zellen zu begünstigen. Diese DC behalten die Fähigkeit, zu maturated DC auszureifen und Effektor-T Zellen zu induzieren [206].

Neben immaturren cDC können auch immature pDC über Zellinteraktion mit antigenspezifischen CD4<sup>+</sup> Zellen eine Anergie in diesen erzeugen. Aber auch aktivierte pDC können zusätzlich zur Sekretion von Typ I Interferonen als Antwort auf eine virale oder bakterielle Infektion regulatorische T Zellen induzieren [189]. Dies hängt von der Art des Aktivierungsstimulus ab. So begünstigen pDC, die z.B. mit Typ B CpG- Oligonukleotiden aktiviert wurden, die Entwicklung von naiven T Zellen zu CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen [235]. Ein spezieller Marker für tolerogene pDC stellt deren Expression von Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) dar. IDO baut die für die Proliferation und Aktivierung von T Zellen wichtige Aminosäure Tryptophan ab. Hierdurch werden sowohl Apoptose in T Zellen als auch regulatorische T Zellen induziert [229]. Neben pDC exprimieren auch cDC IDO. Nachdem cDC mit PGE<sub>2</sub> und TNF- $\alpha$  stimuliert wurden, wird die Expression von IDO in diesen Zellen hochreguliert und eine tolerogene Wirkung erzeugt [45]. ILT-3 und ILT-4 sind weitere Moleküle, die eine tolerogene Eigenschaft der DC andeuten. Die Expression dieser Moleküle wird zum einen nach Interaktion mit CD8<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> T Zellen als auch nach exogener Gabe von IL-10 und IFN- $\alpha$  auf den DC induziert [209, 332].

### 1.1.2. T Zellen

T Zellen stellen eine zentrale Zellpopulation des Immunsystems dar, die sich durch die Expression eines  $\alpha/\beta$  oder  $\gamma/\delta$  TCR auszeichnen. Die  $\gamma/\delta$  T Zellen sind für diese Arbeit von untergeordnetem Interesse und werden nicht weiter ausgeführt.

$\alpha/\beta$  T Zellen kommen hauptsächlich in den lymphoiden Organen vor. Sie gliedern sich in weitere Subpopulationen, wie z.B. den CD4<sup>+</sup>, den CD8<sup>+</sup>, den NKT oder regulatorischen T Zellen. Sie werden im Thymus aus pluripotenten Stammzellen, die aus dem Knochenmark oder aus der fetalen Leber stammen und über die Blutbahn zum Thymus migrieren, gebildet. Beim Eintritt in den Thymus exprimieren die Vorläuferzellen noch keine T Zell-spezifischen Oberflächenmoleküle. Sie werden als doppelt negativ (DN) aufgrund fehlender CD4 und CD8 Expression bezeichnet. Im Thymus beginnt die Differenzierung der T Zellen mit der  $\beta$ -Selektion. Dieser Schritt zeichnet sich durch zahlreiche Rekombinationsvorgänge zur Bildung des  $\alpha/\beta$  TCR aus. Erweist sich der Rezeptor

als nicht funktionell, wird während der  $\beta$ -Selektion Apoptose in dieser Zelle induziert. Im nächsten Differenzierungsschritt exprimieren die Zellen sowohl CD4 als auch CD8. In diesem Stadium durchlaufen sie die Positivselektion. Hierbei erhalten sie in Abhängigkeit von ihrer Interaktion mit entweder MHC Klasse I oder II gebundenen, endogenen Peptiden ein Signal, die Expression des CD4 oder CD8 Korezeptors einzustellen. Diejenigen Zellen, die mit ihrem TCR nicht binden können, sterben durch Apoptose. Im letzten Schritt der Differenzierung durchlaufen die CD4 bzw. CD8 einzel-positiven Zellen nun noch die Negativselektion. Bei diesem Schritt werden mögliche autoreaktive Zellen anhand einer starken Affinität ihrer TCR mit endogenen Peptiden durch Apoptose aussortiert. Zellen, die diese Selektionsschritte überstanden haben, verlassen den Thymus als naive T Zellen [246, 272].

Die auf diesem Weg neben  $CD8^+$  Zellen gebildeten naiven  $CD4^+$  Zellen differenzieren nun in Abhängigkeit der parallel zum ersten Antigenkontakt auftretenden Signale in verschiedene Effektorzellen (siehe Kapitel 1.1.1.5.1), wie den Th1, Th2 oder Th17 Zellen.

### ***1.1.2.1. Th1 Zellen***

Th1 Zellen spielen eine wichtige Rolle bei der zellvermittelten Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene, wie Viren, (myko-)bakterielle Infektionen und Protozoen, sowie bei der Induktion von einigen Autoimmunerkrankungen. Sie zeichnen sich durch die Sekretion verschiedener Zytokine wie z.B.  $IFN-\gamma$  zur Aktivierung von Makrophagen oder IL-2 als wichtiger Faktor für die Entwicklung von CD4 Gedächtniszellen aus. Der Transkriptionsfaktor T-bet wird während der Th1-Differenzierung hochreguliert und gilt als wichtigster Differenzierungsmarker für Th1 Zellen [3, 145, 304].

### ***1.1.2.2. Th2 Zellen***

Th2 Zellen beeinflussen die Immunreaktion gegenüber extrazellulären Parasiten wie z.B. Würmern und induzieren und verstärken die allergische Immunantwort [236]. Die Differenzierung naiver T Zellen zu Th2 Zellen kann durch IL-4 bedingte Aktivierung von STAT6 (*Signal transducer and activator of transcription 6*) unterstützt werden, indem STAT6 die Expression des für die Th2 Differenzierung wichtigen Transkriptionsfaktors GATA-3 induziert [171, 359]. Th2 Zellen sekretieren verschiedene Zytokine, wie z.B. IL-4, -5, -9, -10, -13 und -25. IL-4 bewirkt hierbei durch positive Rückkopplung die Differenzierung weiterer Th2 Zellen und unterstützt gleichzeitig den IgE Klassenwechsel in B Zellen [193, 303]. IL-5 dient der Rekrutierung von Eosinophilen [59] und IL-9 verstärkt die Mukusproduktion von Epithelzellen während einer allergischen Immunreaktion [203].

### ***1.1.2.3. Th17 Zellen***

Th17 Zellen wurden erst kürzlich beschrieben und ergänzen die Klasse der Th1 und Th2 Zellen. Sie verstärken die Immunantwort gegenüber bestimmten Pilz- und bakteriellen Infektionen und können

organspezifische Autoimmunität bewirken [342]. Für ihre Differenzierung werden sowohl TGF- $\beta$  [210] als auch die Transkriptionsfaktoren ROR- $\gamma$ t [151], STAT3 [352], sowie IRF-4 (*Interferon Regulatory Factor-4*) [50] benötigt. IL-6, -21 und -23 aktivieren STAT3 und spielen somit für die Differenzierung ebenfalls eine wichtige Rolle, wohingegen IL-4 und IFN- $\gamma$  die Differenzierung hemmen. Th17 Zellen produzieren unter anderem IL-17a, -17f, -21, -22 und TNF- $\alpha$  (Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$ ). IL-21 wirkt hierbei als positives Rückkopplungssignal für die Differenzierung weiterer Th17 Zellen. IL-17a und -17f wirken aktivierend auf die angeborene Immunantwort und die Immunabwehr, indem sie die Expression von verschiedenen Zytokinen und Chemokinen induzieren und die Rekrutierung und Aktivierung von Neutrophilen unterstützen [182]. IL-22 wird durch die Aktivierung von STAT3 induziert und verstärkt unter anderem in Kooperation mit IL-17a und -17f die Immunreaktion [199].

#### ***1.1.2.4. Regulatorische T Zellen***

Eine wichtige Aufgabe des Immunsystems besteht nicht nur in der Induktion einer funktionellen Immunabwehr, sondern auch in der Erhaltung der peripheren Toleranz. Natürlich auftretende und induzierbare regulatorische T Zellen (Tregs) spielen hierbei eine große Rolle. Die natürlichen Tregs (nTregs) werden im Thymus gebildet und machen 5-10% der murinen peripheren CD4<sup>+</sup> T Zellpopulation aus. Fast alle nTregs exprimieren im Gegensatz zu aktivierten T Zellen CD25 konstitutiv und mit hoher Intensität [275]. Zur Charakterisierung dieser CD4<sup>+</sup>CD25<sup>hi</sup> Treg Population dient der Transkriptionsfaktor Forkhead box P3 (Foxp3) als Schlüsselregulator für die nTreg Differenzierung und Funktion [143]. Hierbei ist zu beachten, dass im Gegensatz zur Maus im humanen System nicht nur regulatorische T Zellen, sondern auch CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> und CD8<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T Zellen nach Aktivierung über den TCR temporär Foxp3 exprimieren und sich dieser Marker somit im humanen System zur Charakterisierung von Tregs nicht als günstig erweist [20].

Induzierbare Tregs (iTregs) können in der Peripherie aus naiven T Zellen entstehen und exprimieren meist kein Foxp3. Allerdings ist es möglich, durch Stimulation des TCR in Anwesenheit von TGF- $\beta$  aus naiven CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>Foxp3<sup>-</sup> T Zellen regulatorische CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup> Tregs zu generieren [55]. Die orale Antigenapplikation stellt eine weitere Methode dar, regulatorische T Zellen zu induzieren. Diese CD4<sup>+</sup> TGF- $\beta$  produzierenden Tregs werden als Th3 Zellen beschrieben. Des Weiteren bilden sich durch Stimulation mit Antigen und IL-10 aus naiven CD4<sup>+</sup> T Zellen sogenannte Tr1 Zellen (Foxp3<sup>-</sup>), die ihre tolerogene Wirkung durch Sekretion von IL-10 und TGF- $\beta$  vermitteln und ähnlich effektiv wie nTregs die T Zellproliferation hemmen. Auch IL-10 unabhängige, aber Zellkontakt abhängige regulatorische Wirkungsweisen wurden beschrieben [56, 122, 328]. Es ist nicht geklärt, ob Tr1 Zellen tatsächlich eine definierte Subpopulation darstellen, da auch CD4<sup>+</sup> Th1, Th2 und Th17 Zellen unter bestimmten Bedingungen IL-10 produzieren [21, 154, 224].

Um die Toleranz aufrecht zu erhalten und inflammatorische Reaktionen zu hemmen, nutzen Tregs verschiedene Mechanismen. Durch die Sekretion verschiedener Zytokine wie z.B. IL-10, TGF- $\beta$  oder IL-35 können Tregs ihre regulatorische Wirkung vermitteln. Hinzu kommt, dass TGF- $\beta$  die Differenzierung weiterer Tregs begünstigt [60, 135, 159]. Ein weiterer Mechanismus umfasst die zytotoxische Wirkung der Tregs, die diese durch die Sekretion von Granzymen und Perforin, als auch durch Galectin auf Effektor-T Zellen (Teff) und APC ausüben [108, 116, 120]. Tregs beeinflussen Effektorzellen ebenfalls durch metabolische Veränderungen. So wird durch die hohe Expression von CD25 auf vielen Tregs IL-2 lokal gebunden, wodurch die Proliferation von Teff durch einen Mangel an verfügbarem IL-2 unterbunden, aber gleichzeitig die Expansion der Tregs begünstigt wird [257]. Die Expression von CD39 und CD73 auf der Zelloberfläche von Tregs katalysiert die Bildung von Adenosin, welches die Funktion von Teff durch Bindung an den Adenosin Rezeptor 2A blockiert [71]. Auch das intrazelluläre zyklische Adenosinmonophosphat (cAMP) kann von Tregs direkt in Teff durch *Gap Junctions* transferiert werden und dadurch die Effektorfunktion hemmen [43]. Die regulatorischen Mechanismen der Tregs beschränken sich nicht nur auf die Interaktionen mit Teff, sondern werden auch über Dendritische Zellen mediiert. Das von regulatorischen T Zellen konstitutiv exprimierte CTLA-4 spielt hierbei eine wichtige Rolle. Die Bedeutung wurde indirekt durch das Blockieren des kostimulatorischen Moleküls CTLA-4 auf Tregs belegt, da dies eine geringere Herunterregulation von CD80 und CD86 auf DC und somit eine verminderte Suppressionsfähigkeit der DC auf die Effektor-T Zell-Funktion zur Folge hatte [252, 265, 308]. Des Weiteren induzieren Tregs in CTLA-4-abhängiger WeiseIDO in DC, welches ebenfalls die Effektorfunktion der T Zellen hemmt [90]. Tregs sind somit in der Lage, die Proliferation und Zytokinsekretion von Teff, sowie die Differenzierung von CD8<sup>+</sup> Zellen zu zytotoxischen T Lymphozyten (CTL) direkt als auch indirekt zu beeinflussen, wobei das Mikromilieu von großer Bedeutung ist.

Neben den CD4<sup>+</sup> regulatorischen T Zell-Subpopulationen existieren auch diverse CD8<sup>+</sup> regulatorische T Zellen, die weniger als 1% der CD8<sup>+</sup> T Zellen ausmachen [293]. CD8<sup>+</sup> Tregs weisen keine zytotoxische Wirkung auf. Stattdessen sekretieren sie sowohl IL-10 als auch TGF- $\beta$ . Einige der CD8<sup>+</sup> Tregs scheinen durch antigenaktivierte CD4<sup>+</sup> T Zellen TCR-abhängig und MHC Klasse Ib beschränkt ihre regulatorische Funktion zu erlangen. Andere CD8<sup>+</sup> Tregs bilden durch Erkennung bestimmter Immunglobulinepitope TGF- $\beta$  und vermitteln so ihre regulatorische Wirkung [130, 157]. Eine weitere CD8<sup>+</sup> Treg-Subpopulation (CD122<sup>+</sup>) weist Ähnlichkeiten zur CD4<sup>+</sup> Tr1 Population auf, da ihre regulatorische Funktion durch die Sekretion großer Mengen an IL-10 eine Hemmung der Proliferation und IFN- $\gamma$  Produktion von Teff Zellen bewirkt [111, 267].

#### ***1.1.2.5. Zytotoxische T Zellen***

Die bereits erwähnte CD8<sup>+</sup> T Zell-Population wird wie CD4<sup>+</sup> T Zellen im Thymus gebildet und als CTL bezeichnet. Sie sind Teil der adaptiven Immunabwehr und wirken gegen intrazelluläre Pathogene und gegen Tumore, indem sie körpereigene infizierte oder veränderte Zellen nach

Aktivierung über MHC Klasse I präsentierte Antigene erkennen und in diesen Zellen Apoptose induzieren [153].

### 1.1.2.6. NKT Zellen

Die NKT Zellen stellen innerhalb der Gruppe der  $\alpha/\beta$  T Zellen eine besondere Klasse dar. Sie werden anhand ihres TCR Repertoires klassifiziert und in zwei weitere Untergruppen eingeteilt. Die Klasse I der NKT Zellen wird auch als invariante oder semi-invariante NKT (iNKT) Klasse bezeichnet, da sich ihr TCR aus einer invarianten TCR  $\alpha$ -Kette (murin: V $\alpha$ 14-J $\alpha$ 18 [191]; human: V $\alpha$ 24-J $\alpha$ 18 [74]) und einer V $\beta$ 8.2, V $\beta$ 7, V $\beta$ 2 -Kette im murinen oder einer V $\beta$ 11-Kette im humanen System zusammensetzt. Diese iNKT Zellen sind in ihrer Aktivierung durch das MHC Klasse I ähnliche Molekül CD1d beschränkt [34]. Sie erkennen insbesondere Glycolipide wie z.B.  $\alpha$ -GalCer (siehe Abbildung 1.4), worüber sie durch Bindung an ein CD1d Tetramer gut charakterisiert werden können [219]. Die Klasse II der NKT Zellen ist ebenfalls CD1d abhängig, exprimiert allerdings verschiedene TCR V $\alpha$ -Ketten und lässt sich aufgrund fehlender Kenntnisse bezüglich eindeutiger Charakterisierungsmarker noch schwierig analysieren [53, 114].

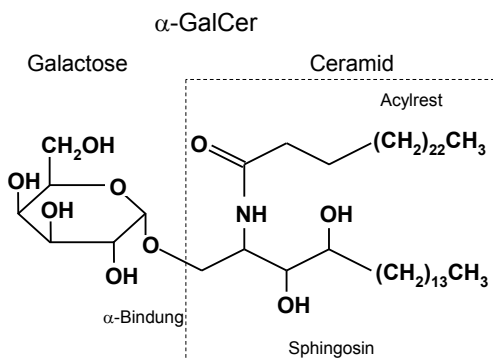


Abbildung 1.4 Chemische Struktur des  $\alpha$ -Galactosylceramid

Der prozentuale Anteil an iNKT Zellen bezogen auf die Lymphozyten in den verschiedenen Organen von Mensch und Maus ist meist gering. Eine Ausnahme stellt die murine Leber dar, in der iNKT Zellen einen Anteil von bis zu 40 % ausmachen können (siehe Tabelle 1.2). Die Anzahl an iNKT Zellen im Menschen liegt häufig deutlich unter dem murinen Anteil. Allerdings existieren im Menschen große Variabilitäten zwischen den Individuen [113].

**Tabelle 1.2 Prozentualer Anteil an iNKT Zellen von Lymphozyten in verschiedenen Organen von Maus und Mensch**

Anteil an iNKT Zellen in	Maus	Mensch
<b>Thymus</b>	~0,2-0,5%	~0,001-0,01%
<b>Blut</b>	~0,2-0,5%	~0,001-1%
<b>Milz</b>	~1%	nicht detektiert
<b>Leber</b>	~20-40%	~1%

iNKT Zellen werden vielseitige Funktionen zugeschrieben. Nach Aktivierung sekretieren sie große Mengen an IL-4 und IFN- $\gamma$ . Neben diesen Zytokinen bilden sie auch IL-2, -5, -6, -10, -13, -17, -21, TNF- $\alpha$ , TGF- $\beta$ , GM-CSF und verschiedene Chemokine. Durch diese zum Teil sehr rasche Zytokinsekretion beeinflussen iNKT Zellen die Funktion vieler Zellpopulationen, wie NK Zellen, konventionelle CD4<sup>+</sup> und CD8<sup>+</sup> T Zellen, Makrophagen, B Zellen und DC. Durch diese vielfältigen Mechanismen können iNKT Zellen sowohl allergische Reaktionen oder mikrobielle Immunantworten verstärken, als auch Toleranz begünstigen oder Autoimmunerkrankungen unterdrücken. Sie stellen somit wie DC ein wichtiges Verbindungsglied zwischen der angeborenen und erlernten Immunantwort dar [187, 218].

Wie auch die konventionellen T Zellen werden NKT Zellen im Thymus selektiert. Die Mechanismen sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Es ist sicher, dass die Entwicklung der NKT Zellen während des doppelpositiven Stadiums im Thymus von den konventionellen T Zellen abzweigt [88, 107]. Hierbei erfolgt die Positivselektion über doppelpositive Thymozyten, die CD1d exprimieren. Als körpereigenes Antigen wird Isoglobotrihexosylceramid (iGb3) für die Selektion kontrovers diskutiert [264, 358]. Für die Negativselektion gibt es erste Hinweise, dass sie unabhängig voneinander über Thymozyten oder APC selektiert werden [283]. Im murinen System existieren sowohl CD4<sup>+</sup> als auch doppeltnegative NKT Zellen. Im humanen System konnten auch CD8<sup>+</sup> NKT Zellen detektiert werden [113].

## 1.2. Allergien

Das Wort Allergie leitet sich vom altgriechischen Wort allos – anders, fremd und ergon – Arbeit/ Reaktion ab. Clemens von Pirquet führte das Wort Allergie im Jahre 1906 ein, als er es zur Beschreibung einer Immunreaktion gegenüber fremden, aber harmlosen Substanzen verwendete. Er nutzte das Wort Allergie als Synonym für Hypersensitivitätsreaktionen des Immunsystems [174]. Heutzutage beschränkt sich das Wort Allergie meist auf die IgE vermittelte Typ I Hypersensitivität (siehe Kapitel 1.2.1).

Die Verbreitung von Allergien und Asthma ist weltweit, insbesondere in den westlichen Ländern, in den letzten Jahrzehnten stark angestiegen. Als mögliche Gründe für die Zunahme von Allergien werden verschiedene Faktoren, wie z.B. genetische Prädispositionen [327] und verschiedene Umwelteinflüsse, genannt. Zu diesen Umwelteinflüssen zählen sowohl die Belastung mit Zigarettenrauch, Umweltverschmutzung und Allergenen, Übergewicht und Ernährung, als auch eine veränderte Exposition mit Mikroorganismen und daraus resultierenden Infektionen [86].

### 1.2.1. Klassifizierung der Hypersensitivitätsreaktionen

Überempfindlichkeitsreaktionen des Immunsystems können zu schweren Erkrankungen des Organismus führen. Diese Hypersensitivitätsreaktionen wurden von Coombs und Gell nach ihrem Effektormechanismus in Abhängigkeit der auslösenden Substanz in vier Gruppen unterteilt. Bei Typ I bis III handelt es sich um eine antikörpervermittelte, bei Typ IV um eine T Zell-vermittelte Effektorreaktion.

Die **Typ I** Hypersensitivität, auch Soforttyp-Reaktion genannt, zeichnet sich durch eine IgE-vermittelte Reaktion aus. Bei einer ersten oder wiederholten Exposition mit dem Antigen sensibilisiert sich der Organismus (**Sensibilisierungsphase**). Hierbei kommt es in den B Zellen zu einem Klassenwechsel und es werden verstärkt antigenspezifische IgE Antikörper gebildet, die mit ihrer Fc-Domäne an die Fcε-Rezeptoren auf Mastzellen und Basophilen binden. Bei einem erneuten Kontakt mit dem Antigen (**Effektorphase**) wird dieses rasch von den IgE-Antikörpern gebunden, was eine Kreuzvernetzung der IgE-Antikörper bewirkt und zu einer sofortigen Degranulation der Mastzelle und somit zu einer Freisetzung immunologisch wirksamer Substanzen, wie z.B. Histamin oder Leukotrienen, sowie verschiedenen Zytokinen und Chemokinen führt. Zu den daraus resultierenden lokal auftretenden Erkrankungen zählen die allergische Rhinitis, Urtikaria und Asthma. Im Falle einer systemischen Reaktion spricht man vom anaphylaktischen Schock, der zum Tod führen kann. Eine Veranlagung zur Ausbildung von Hypersensitivitäten haben Atopiker, die sich durch eine krankhaft erhöhte Bildung von IgE-Antikörpern auszeichnen.

Bei der **Typ II** Hypersensitivität bildet der Organismus IgG- oder IgM-Antikörper gegen körpereigene zell- oder matrixassoziierte Antigene oder Zelloberflächenrezeptoren, wodurch entweder eine zytotoxische Wirkung oder eine veränderte Signalübertragung der Zelle induziert wird. Die zytotoxische Wirkung wird entweder durch Komplementaktivierung oder durch antikörperabhängige zellvermittelte Zytotoxizität mediiert. Beispiele hierfür stellen Transfusionszwischenfälle zweier nicht kompatibler Spender und verschiedene Autoimmunerkrankungen, wie die Basedow-Krankheit, dar.

Die **Typ III** Hypersensitivität bildet, wie auch die Typ II Hypersensitivität, IgG- oder IgM-Antikörper, allerdings gegen lösliche endogene Antigene. Die Antikörper binden an diese Antigene und bilden mit ihnen zirkulierende Antigen-Antikörper-Immunkomplexe. Diese Komplexe können zum einen Komplement aktivieren und sich zum anderen in Geweben oder der Oberfläche von

Blutgefäßen ablagern und zu Entzündungsreaktionen führen. Ein klassisches Beispiel hierfür ist die Arthus-Reaktion, die bei stark sensibilisierten Menschen bei Injektion von Antigen durch die Aktivierung von Komplement eine Rekrutierung von Neutrophilen bewirkt, die durch Freisetzung von Mediatoren eine Entzündungsreaktion an der Injektionsstelle hervorrufen.

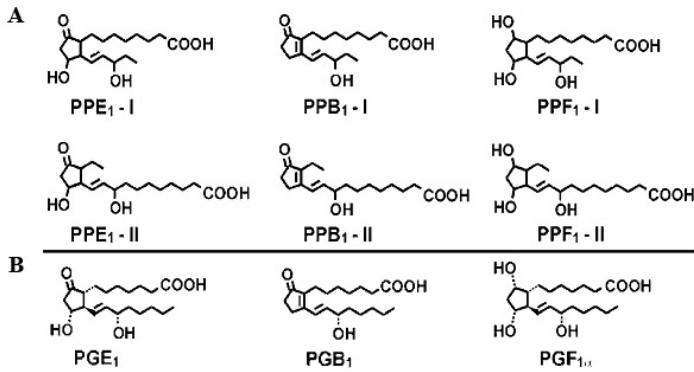
Die **Typ IV** Hypersensitivität wird durch die Aktivierung von antigenspezifischen T Zellen über lösliche oder zellassozierte Antigene vermittelt und kann in drei Unterklassen eingeteilt werden. Bei der ersten Untergruppe wird eine Reaktion durch Makrophagen, die über Th1 Zellen aktiviert wurden, hervorgerufen (z.B. Kontaktdermatitis). In der zweiten Untergruppe wird eine Entzündungsreaktion über die Aktivierung von Eosinophilen und die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren durch Th2 Zellen vermittelt. Hierzu zählen das chronische Asthma und die atopische Dermatitis. In der dritten Untergruppe werden CTL aktiviert, die ihre Wirkung gegen Zell-assoziierte Antigene richten und die Lyse der entsprechenden Zelle bewirken. Diese Reaktion tritt ebenfalls bei der Kontaktdermatitis auf [153, 161, 268].

### **1.2.2. Pollen und Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALMs)**

Bei der Entstehung von vornehmlich respiratorischen allergischen Erkrankungen spielen Pollen eine wichtige Rolle. Insbesondere die in den Pollen eingeschlossenen Proteine, die sogenannten Allergene, sind häufig die Ursache für die Sensibilisierung und die Entwicklung einer Hypersensitivität vom Typ I gegenüber den verschiedenen Pflanzen [28]. Die Freisetzung der Allergene aus den Pollen kann zum einen in der Schleimhaut der oberen Atemwege und zum anderen bereits in der Umgebungsluft erfolgen. Allerdings werden diese Allergene selten isoliert freigesetzt, sondern in Verbindung mit Partikeln [314], wie z.B. mit Pollenkörnern, Stärkekörnchen [281] oder assoziiert mit Dieselruß [28, 178]. Die Freisetzung der Allergene wird durch verschiedene Bedingungen beeinflusst. Aufgrund der hohen Wasserlöslichkeit der Allergene wird die Freisetzung besonders durch eine hohe Luftfeuchtigkeit, starken Regen und Gewitter begünstigt, sowie durch Luftverschmutzung gefördert [29]. Es wurde gezeigt, dass diese Freisetzung pH- und Temperatur-abhängig ist und die optimalen Bedingungen für die Freisetzung des Birkenpollenallergens Bet v 1 bei einem pH von 7,4 und einer Temperatur von 37°C liegen [31]. Unter natürlichen Bedingungen erfolgt die Freisetzung der Pollenbestandteile bei der Bestäubung der Blüten ebenfalls im wässrigen Milieu [28]. Neben Proteinen setzen die Pollen hierbei auch bioaktive Lipidmediatoren frei. Diese Lipidmediatoren weisen ähnliche Strukturen wie Eicosanoide auf, da sie starke Kreuzreaktivitäten sowohl im Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>)- als auch im Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>)-ELISA zeigten [30]. Prostaglandine und Leukotriene werden aus Arachidonsäure synthetisiert [294]. Prostaglandine werden von den meisten Zellen im Körper nach Bedarf gebildet und wirken autokrin oder parakrin meist in räumlicher Nähe zum Ort ihrer Synthese. Sie weisen verschiedene biologische Funktionen auf und spielen bei einer Vielzahl von Entzündungsreaktionen eine Rolle [102]. Da höhere Pflanzen nicht in der Lage sind, Arachidonsäure und somit auch keine Prostaglandine und Leukotriene zu bilden, verwenden sie stattdessen zur Synthese von



Prostaglandin-ähnlichen Verbindungen  $\alpha$ -Linolensäure, die neben Linolsäure eine der häufigsten ungesättigten Fettsäuren in pflanzlichen Membranen darstellt [238]. Ein aus Birkenpollen durch Hexan-Isopropanol extrahiertes Lipid-Gemisch, welches große Mengen  $\alpha$ -Linolensäure, Linolsäure und deren Octadecanoid Derivate (9-, 12-, 13- 16-HOTE; 9-,13-HODE) enthält [313, 314] übt eine aktivierende und rekrutierende Wirkung auf Granulozyten aus [313]. Weitere Analysen der biologischen Effekte der im Pollen enthaltenen Lipidmediatoren mit wässrigen Pollenextrakten ergaben sowohl eine Aktivierung von Neutrophilen und Eosinophilen, als auch einen Einfluss auf die Maturation und die Zytokinsekretion von DC, die eine verstärkte Th2-Polarisierung von naiven T Zellen bewirkten [30, 213, 263, 313, 315]. Es zeigte sich, dass die Freisetzung der immunmodulatorisch wirkenden Substanzen aus Pollen, die in der Nähe von stark befahrenen Straßen gesammelt wurden, deutlich höher ausfiel als aus Pollen von ländlich gelegenen Bäumen, was eine stärkere proinflammatorische Wirkung der ersteren andeutet [30]. Da der wässrige Pollenextrakt ein Gemisch aus einer Vielzahl an Substanzen darstellt und somit die beobachtete Wirkung des wässrigen Pollenextrakts nicht unmittelbar einer oder mehreren Verbindungen zugeschrieben werden konnte, wurde der Extrakt mittels negativ-chemischer Ionisation gekoppelt an Gaschromatographie mit Massenspektrometrie analysiert. Hierbei konnten Spuren der verschiedenen Phytoprostane (PP) E<sub>1</sub>, F<sub>1</sub> und A<sub>1</sub>/B<sub>1</sub> nachgewiesen werden. Jedes der auftretenden Phytoprostane liegt in zwei Regioisomeren (I und II) vor (siehe Abbildung 1.5 A, Quelle: [315]). Durch nicht-enzymatische Autoxidation von  $\alpha$ -Linolensäure werden Isoprostanoide, auch Phytoprostane genannt, erzeugt [258]. Vom Phytoprostan G<sub>1</sub> (PPG<sub>1</sub>) gelangt man auf nicht-enzymatischem Wege über PPH<sub>1</sub> zu weiteren Phytoprostan-Ringstrukturen, wie z.B. zum PPE<sub>1</sub> oder auch PPF<sub>1</sub> [148, 238]. Die pflanzlichen Phytoprostane stellen die strukturellen Analoga zu den humanen Prostaglandinen dar (siehe Abbildung 1.5 B). Allerdings liegen bisher nur wenige Daten bezüglich der physiologischen Rolle der Phytoprostane, insbesondere des Einflusses auf die humane Immunantwort vor. Es konnte gezeigt werden, dass PPE<sub>1</sub> in ähnlichem Maße wie der wässrige Pollenextrakt dosisabhängig die IL-12 Produktion von humanen DC hemmt [315]. Nachdem die Th2-polarisierenden Effekte von wässrigem Birkenpollenextrakt und PPE<sub>1</sub> im humanen *in vitro*-System detektiert wurden, konnte im murinen *in vivo*-System eine Th2-polarisierende Wirkung durch *Bet.*-APE in den drainierenden Lymphknoten der Schleimhäute beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führten PPE<sub>1</sub> und PPF<sub>1</sub> zu einer Inhibierung sowohl der Th1 als auch Th2 sekretierten Zytokine von *in vitro* restimulierten Zellen der drainierenden Lymphknoten [126].



**Abbildung 1.5 Chemische Strukturen pflanzlicher Phytoprostane (A) und den homologen humanen Prostaglandinen (B)**

Quelle: Traidl-Hoffmann C et al. J Exp Med, 2005, 201 (4): 627-36 [315]

## 1.3. Spezifische Immuntherapie

### 1.3.1. Einführung zur spezifischen Immuntherapie

Die spezifische Immuntherapie (SIT) ist die bisher einzige kausale Behandlungsmethode für die Typ I vermittelte Hypersensitivität und verhindert möglicherweise die Sensibilisierung gegen weitere Allergene. Durch die wiederholte vornehmlich subkutane Applikation des reaktiven Allergens wird eine Immunmodulation im Organismus induziert, die zu einer verbesserten Toleranz gegenüber dem Allergen führt und eine über den Behandlungszeitraum reichende verbesserte Symptomatik bewirkt [82, 255, 338].

Bereits im Jahre 1911 wurde die erste Immuntherapie (IT) gegen eine Gräserpollen-Allergie durchgeführt [247]. Zunächst schwankte die Wirksamkeit der SIT häufig aufgrund von nicht standardisierten Extrakten und Protokollen. So variierten die Mengen der enthaltenen Allergene und auch deren biologische Aktivitäten, sowie der Gesamtproteingehalt der Extrakte in hohem Maße. Eine starke Verbesserung konnte durch die rekombinante Expression der häufigsten Allergene, insbesondere in nativer Form, erzielt werden [165, 318]. Neben der Zusammensetzung der verwendeten Extrakte existieren weitere Parameter, die den Erfolg der IT beeinflussen können, wie z.B. die gewählte Applikationsroute, die verwendeten Adjuvantien, die Dauer der Behandlung und natürlich auch mögliche Nebenwirkungen [13].

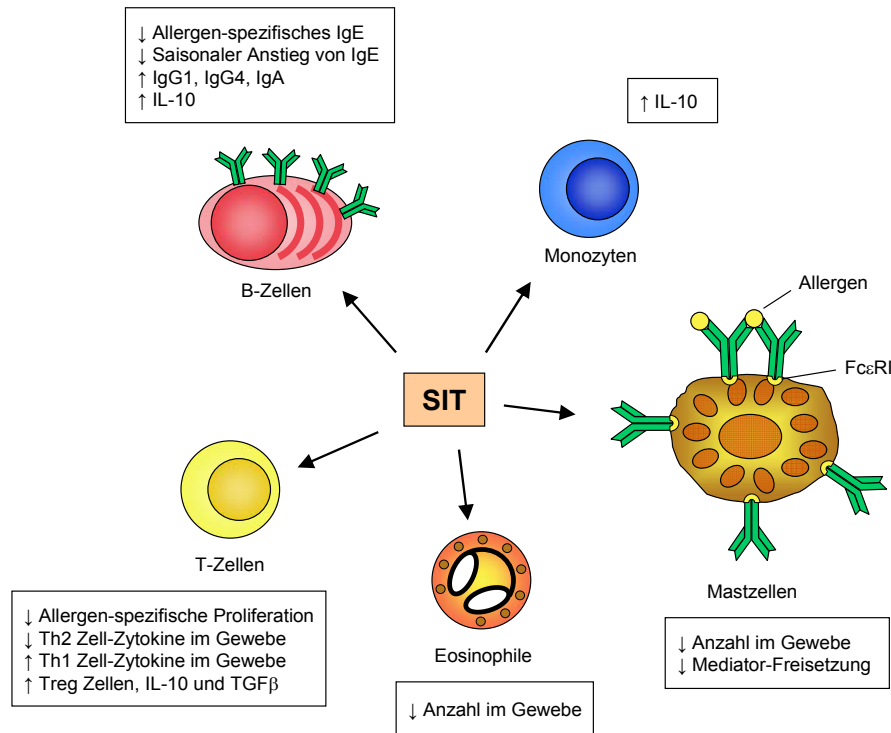
Die häufigste verwendete Applikationsroute für eine IT ist die subkutane Injektion des Allergens. Neben dieser Methode wurden im Laufe des letzten Jahrhunderts auch alternative Routen vorgeschlagen. Dazu gehörte die lokale bronchiale oder nasale, als auch orale oder sublinguale Applikation der Allergene. Von diesen Methoden wurden 1998 die lokale nasale IT (LNIT) und die sublinguale IT (SLIT) von der Weltgesundheitsorganisation WHO als geeignete Alternativen zur subkutanen IT (SCIT) empfohlen, doch wird aufgrund von technischen Einschränkungen bei der LNIT nur die SLIT verbreitet weiterentwickelt [51].

### 1.3.2. Wirkmechanismen der spezifischen Immuntherapie

Die exakten Wirkmechanismen der SIT sind bisher noch nicht vollständig aufgeklärt. Es zeigte sich, dass die SIT einen Einfluss auf verschiedene Zellen des Immunsystems, wie APC, T Zellen und B Zellen ausübt und insbesondere die Anzahl und Funktion der Effektorzellen, die die allergische Reaktion vermitteln, verringert (siehe Abbildung 1.6). So wurden in Patienten, die eine SIT erhalten hatten, bei erneuter Allergenexposition weniger Mastzellen in der Haut und weniger Basophile und Eosinophile in den nasalen Schleimhäuten nachgewiesen [81, 83, 345]. Durch eine SIT wird die allergenspezifische T Zellantwort moduliert, was sich anhand verschiedener Parameter zeigt. Zum einen wird die Allergen induzierte T Zellproliferation gehemmt und zum anderen verschiebt sich das Th1/ Th2 Zytokin-Verhältnis im Blut und in der Peripherie in Richtung Th1 Zytokine. Dies zeigt sich durch Reduktion der Th2 Zytokine IL-4, -5, -13 und -9 und durch einen Anstieg des Th1 Zytokins IFN- $\gamma$ . [85, 103, 166, 248, 325]. Gleichzeitig werden auch verstärkt regulatorische Zytokine wie IL-10 oder TGF- $\beta$ , sowie allergenspezifische regulatorische T Zellen detektiert. [15, 16, 33, 98, 164]. IL-10 weist hierbei vielfältige Wirkungen auf. Während einer allergischen Entzündung verändert es die Funktion der Effektorzellen. So werden die IgE abhängige Aktivierung der humanen Mastzellen, als auch die IL-5 Produktion von humanen Th2 Zellen, sowie die GM-CSF Sekretion und die CD40 Expression von aktivierten Eosinophilen durch IL-10 gehemmt [253, 273, 280].

Eine mögliche Rolle bei der Wirkungsweise der SIT könnte der Histaminrezeptor HR2 spielen. Er wird verstärkt auf IL-4 produzierenden T Zellen von mehrfach gestochenen Imkern exprimiert. Nach Kontakt mit Histamin sekretieren diese Zellen verstärkt IL-10, was sich hemmend auf die Proliferation von allergenspezifischen T Zellen ausübt. [228]. Imker zeigen selten allergische Reaktionen auf Bienengift. Sie unterliegen aufgrund der häufigen Exposition mit Bienengift einer natürlichen Immunmodulation und können somit Aufschlüsse über die Mechanismen der IT geben [239]. Auch CTLA-4 und PD-1 scheinen am Wirkmechanismus beteiligt zu sein. Neutralisiert man diese Rezeptoren, wird die Hemmung der Proliferation von antigenspezifischen T Zellen aufgehoben [228].

Neben diesen veränderten zellulären Reaktionen zeigt die SIT auch einen Effekt auf die humorale Immunantwort, primär durch die Induktion von IgG. Dieses durch die SIT induzierte IgG kann die allergische Entzündungsreaktion z.B. durch eine verminderte IgE vermittelte Degranulation von Mastzellen und Basophilen verbessern [237, 330]. Allerdings wird die Wirkung des induzierten IgG kontrovers diskutiert, da nicht immer die Serumkonzentration mit einer klinisch verbesserten Symptomatik einhergeht [79]. Doch auch bei den Imkern ist eine deutliche Induktion des IgG mit einer langfristigen Verlagerung von IgG1 zu IgG4 zu beobachten [1]. IL-10 könnte hier ebenfalls eine Rolle spielen. So beeinflusst IL-10 den Klassenwechsel der B Zellen zu IgG1 und es unterstützt die Bildung von IgG4 mit zeitgleicher Inhibierung des IL-4 vermittelten Klassenwechsels zu IgE [47, 156]. Neben IgG gibt es Hinweise, dass auch IgA nach einer SIT verstärkt im Serum detektierbar ist und somit eine Rolle beim Wirkmechanismus der SIT spielen könnte [164].



**Abbildung 1.6 Funktionelle Veränderungen der Immunzellen durch die spezifische Immuntherapie (SIT)**

Grafik adaptiert aus Holgate, S.T. and Polosa, Nat. Rev. Immunol, 2008, 8 (3): 218-30 [141]

## 1.4. Aufgabenstellung dieser Arbeit

Die Prävalenz von Allergien steigt bei weiten Teilen der Bevölkerung stetig an, so dass Allergien zusehends eine verbreitete Volkskrankheit darstellen. Daher sind sowohl die genauen Mechanismen der Entstehung als auch die Mechanismen der einzigen kausalen Behandlungsmethode, der spezifischen IT, für die Entwicklung neuartiger und verbesserter Behandlungsstrategien von großer Bedeutung. Wie in Abschnitt 1.2.2 und 1.3.2 beschrieben, existieren verschiedene Studien, die diese Wirkmechanismen analysiert haben, aber bis zum jetzigen Zeitpunkt nur Teile davon aufklären konnten.

Zur weiterführenden Aufklärung dieser Mechanismen werden folgende Fragestellungen in dieser Arbeit untersucht.

1. Welchen Einfluss haben wässrige Pollenbestandteile und ausgewählte Phytoprostane auf die funktionelle und phänotypische Maturation von verschiedenen DC Subtypen?
2. Welchen Einfluss haben die durch wässrige Pollenbestandteile modulierten DC auf die Interaktion mit verschiedenen T Zellpopulationen und die daraus resultierende T Zell-Polarisierung?
3. Welche Rolle spielt das aus T Zellen stammende IL-10 bei der spezifischen IT?
4. Spielen NKT Zellen eine Rolle bei der Wirkung einer spezifischen IT?

## 2. Material und Methoden

### 2.1. Material

#### 2.1.1. Geräte

Geräte	Bezeichnung	Hersteller
CO <sub>2</sub> -Inkubatoren	a) Inkubator MCO-17 AIC	Sanyo Fisher
	b) Inkubator BB 6220 CU	Hereaus Instruments
Durchflusszytometer	BD FACSCalibur	BD Biosciences
Durchlichtmikroskop	a) aufrechtes Mikroskop: DM LB	Leica
	b) inverses Mikroskop: Axiovert 40 CFL	Zeiss
Flüssigstickstoffbehälter	Thermolyne Locator 6 Plus/ Liquid Nitrogen Monitor	Barnstead International
Geldokumentationssystem	BioRad Gel Doc 1000	Bio-Rad Laboratories
Gelelektrophoreseapparatur	i-Mupid Mini Agarose Gelelektrophorese	Cosmo Bio Co. Ltd.
Heiz- und Magnetrührer	RCT basic IKAMAG	IKA Labortechnik
Heizschüttler	HLC BlockThermostate HTM 130 LP	HLC Bit Tech
Kreisschüttler	MS1 Minishaker	IKA Labortechnik
Laborkäfige	Ventrirack VRClassic (IVC: individually ventilated cage rack)	BioZone
magnetischer Zellseparator	VarioMACS Separator	Miltenyi Biotec
Mikrotiterplattenphotometer	Multiskan Ascent	Labsystems
Paraffineinbettungsgerät	EG 1150 C	Leica Co.
Pari-Boy Vernebler	LC Sprint Junior	Pari GmbH
PCR-Thermocycler	GeneAmp PCR System 2700	Applied Biosystems
pH-Meter	CG-841pH-Meter	Schott Instruments
Pipettierhilfen	a) Accu Jet	Brand

<b>Geräte</b>	<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>
Pipettierhilfen	b) Pipetboy acu	Integra Biosciences
	c) Swift Pet	Abimed
Reinstwasseranlage	Easy Pure UV Compact ultrapure water system	Barnstedt, Iowa, USA
Reinwasseranlage	Reverse-Osmose Anlage RO3 Plus	Wilhelm Werner GmbH
Rotoren	a) Ausschwingrotor (#75008179) mit runden Bechern (#75008172) Einsatz für konische 15 ml Röhren (#75008197) Einsatz für konische 50 ml Röhren (#75008183)	Hereaus Instruments
	b) Mikrotiterschaukel	Hereaus Instruments
Schüttelwasserbad	Schüttelwasserbad 1083	GFL
Schüttler	Micromix 5	DPC Biermann GmbH
Schüttler (dreidimensional taumelnd)	Polymax 1040	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG
Sterilbank	HeraSafe HS 15	Hereaus Instruments
Ultraschallgerät	Sonorex Super RK 52	Bandelin
Waagen	a) PB 303 Delta Range	Mettler Toledo
	b) Scaltec SBC31	Scaltec Instruments GmbH
Zentrifugen	a) Heraeus Megafuge 1.0 R	Thermo Scientific
	b) Labofuge 400R	Hereaus Instruments
	c) Biofuge micro	Hereaus Instruments
Zytozentrifuge	Shandon Cytospin 3 Zentrifuge	Shandon

### 2.1.2. Spezielle Materialien

Materialbezeichnung	Bemerkung	Hersteller	Bestellnummer
6-Loch Platten	Nuclon™ 6-well MultiDish	NUNC	140675
96 mm Platten	TC Dish 92×17	NUNC	150350
96-Loch Flachbodenplatten	TC Microwell 96 U	NUNC	163320
96-Loch Rundbodenplatten	TC Microwell 96 U	NUNC	167008
Abklebefolie	Easypeal-easyseal	NUNC	236707
Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel	10 ml	Pierce	20339
Disposable Polypropylene Columns	2 - 10 ml Volumen/ 100 Stk.	Thermo Scientific	29924
Einwegskalpell Figuration 23		Feather Safty Razor Co. Ltd.	
Filtropur V 50	Filtrationseinheiten 0,2 µm 500 ml	Sarstedt	831.823.001
Histosette I	Tissue processing/ embedding cassette	Simport	M490-12
Infusionskanüle 20GA	1,1x32 mm BD Venflon Pro	BD Vialon	393204
LS-Säulen		Miltenyi Biotec	130-042-401
LS-Säulen mit Röhrchen		Miltenyi Biotec	130-041-306
Mikroröhrchen, 1,2 ml	FACS-Röhrchen	alpha laboratories	QS845
NUNC 96-well Flachboden	steril, pyrogenfrei	NUNC	167008
NUNC Maxi Sorp 96 well U- Form		NUNC	449824
Omnifix F Solo 1 ml 0,01 ml	Einmalspritze	B. Braun Petzold GmbH	9161406
PCR Gefäße	0,2 ml Thermo-Strip	Abgene	AB-0266
Röhrchen mit Schraubdeckel, 1,5 ml	steril, pyrogenfrei	Sarstedt	72694006
SoLo Flasks T185	Nunclon™Δ Surface	NUNC	144903
Sterican Kanülen 17	lila Ø 0,55 x 25mm 24G 1"	B. Braun Petzold GmbH	4657675
Sterican Kanülen 20	grau Ø 0,40 x 20mm 27G 3/4"	B. Braun Petzold GmbH	4657705
Zellsieb 70 µm, weiß	BD Falcon™	BD Biosciences	352350

**2.1.3. Reagenzien**

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
100 bp DNA ladder (100-1500 bp, 600 bp fett, 2072 bp)	Invitrogen	15628-019
2-Mercaptoethanol (14,3 M)	SIGMA-Aldrich	M6250
2-Propanol	VWR	20922364
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine	SIGMA-Aldrich	87748
Advanced RPMI 1640	Invitrogen	12633-012
$\alpha$ -Galactosylceramide	Alexis Biochemicals	306-027
Agarose für DNA Elektrophorese	SERVA	11404
Albumin Fraktion V	Carl Roth	8076.2
Albumin von Hühnereiweiß Klasse V	SIGMA-Aldrich	A5503
Albumin von Hühnereiweiß Klasse VI	SIGMA-Aldrich	A2512
Ammoniumchlorid (NH <sub>4</sub> Cl)	SIGMA-Aldrich	A5666
Aqua ad injectabilia	DeltaSelect GmbH	8770973
Bromphenol Blue–Xylene Cyanole Dye solution (lyophilized powder)	SIGMA-Aldrich	B3269
Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester (CFSE)	SIGMA-Aldrich	21888
Chloralhydrat	Carl Roth	K318.1
Dimethylsulfoxid	Merck	1.096.780.100
Entellan	Merck	107.960.100
Ethanol absolut zur Analyse	Merck	1.009.832.500
Ethidiumbromid 10 mg/ml Lösung	Bio-Rad	161-0433
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), 0,5 M pH 8,0	Invitrogen	15575020
Flt3-Ligand (zur Verfügung gestellt von H. Hochrein, Bavarian Nordic, Martinsried, Deutschland)		
Formaldehyd 34/40%	Staub & Co. Chemie-handelsges. mbH	437031
Fötales Kälberserum (FCS), PAA Clone EU approved, Batch: A04104-120	PAA	A15-041
Gentamycin (10 mg/ml)	PAA	P11-004
GlutaMAX™ - I Supplement, 200 mM	Invitrogen	35050-038
Glycerin zur Analyse (~86%)	Merck	1.096.781.000
Go Taq Flexi DNA Polymerase	Promega	M8301



<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Hämatoxylin krist. für die Mikroskopie	Merck	1.043.020.025
HEPES (1M)	Gibco-Invitrogen	15630
illustra DNA Polymerization mix 20 mM/ dNTP	GE Healthcare	272094
Imject Alum Adjuvant, 50 ml	Thermo Scientific	77161
Ionomycin Calciumsalz, in Ethanol gelöst	SIGMA-Aldrich	I0634
Kaliumaluminiumsulfat-Dodecahydrat	Carl Roth	8896.1
Kaliumchlorid	Merck	1.049.330.500
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Merck	1.048.731.000
Kaliumhydroxid	Merck	1.050.210.250
Ketamin 10%-Lösung	WDT eG	
L-Glutamin (100x, 200 mM)	Gibco-Invitrogen	25030
LPS-EK ultrapure; ultra pure <i>E. coli</i> K12 LPS (5 mg)	Invivogen	tlrl-eklps
MEM-Nicht essentielle Aminosäuren (NEAA) (100x)	Gibco-Invitrogen	11140
murines rekombinantes GM-CSF	Peprotech	315-03
murines rekombinantes IL-10	Peprotech	210-10
murines rekombinantes IL-12	Peprotech	210-12
murines rekombinantes IL-2	Peprotech	212-12
murines rekombinantes IL-4	Peprotech	214-14
Natriumazid	Carl Roth	K305.1
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	SIGMA-Aldrich	S7795
Natriumchlorid	SIGMA-Aldrich	S9888
Natriumdeoxycholat-Monohydrat	SIGMA-Aldrich	D5670
Natriumdodecylsulfat (SDS) -Lösung, 10% in H <sub>2</sub> O	SIGMA-Aldrich	71736
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	Merck	1.063.290.500
Natriumiodat	Merck	1.065.250.100
Natriumphosphat (NaHPO <sub>4</sub> ) Dibasic	SIGMA-Aldrich	S9763
Natriumpyruvat (100 mM) MEM	Invitrogen	11360-039
Nutridoma-SP	Roche Applied Science	1 011 375
Penicillin-Streptomycin (100x)	Invitrogen	15140-122

<b>Bezeichnung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Percoll	GE Healthcare	17-0891-01
Periodsäure	SIGMA-Aldrich	P7875
Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), in Ethanol gelöst	SIGMA-Aldrich	P1585
Pollen from <i>Betula Alba</i> (white birch)	SIGMA-Aldrich	P6770
Propidiumiodid	CARL ROTH	CN74
Prostaglandin E2	Cayman Chemicals	14010
Proteinkinase K	SIGMA-Aldrich	P6556
Xylazin 2%-Lösung	Medica	
RPMI 1640 mit L-Glutamin	Invitrogen	21875-034
RPMI 1640 ohne L-Glutamin	Invitrogen	21870-084
Salzsäure (HCl) 32%	Merck	1.003.192.511
Schiffsches Reagenz	SIGMA-Aldrich	3952016
Schwefelsäure (95-97%)	Merck	1.007.312.500
Streptavidin-Peroxidase	Calbiochem	189733
Tris-Borate-EDTA Buffer for Gel Electrophoresis	SIGMA-Aldrich	T3913
Trizma Base	SIGMA-Aldrich	T6066
Trypanblau 0,5% in NaCl 0,9%	Boehringer Mannheim	295833
Tween 20	SIGMA-Aldrich	P7949
Xylol	Merck	1.086.852.500
Zitronensäure-Monohydrat	SIGMA-Aldrich	C1909

#### **2.1.4. Puffer und Lösungen**

##### Erythrozyten-Lysepuffer 10 × Lösung

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
Ammoniumchlorid NH <sub>4</sub> Cl	1,5 M	80,2 g
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	100 mM	8,4 g
0,5 M EDTA pH 8,0	10 mM	20 ml
Aqua dest. pH 7,4		Ad. 1000 ml

Lyse-Puffer (DNA)

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
0,5 M Tris-HCl, pH 8,0	100 mM	50 ml
NaCl	200 mM	2,92 g
0,5 M EDTA	5 mM	2,5 ml
10 % SDS	0,2 %	5 ml
Aqua dest.		Ad. 200 ml

Kurz vor Gebrauch wurden dem Lyse-Puffer 200 µg/ml Proteinase K zugesetzt.

TE-Puffer

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
0,5 M Tris-HCl, pH 7,4	10 mM	2 ml
0,5 M EDTA	1 mM	0,2 ml
Aqua dest.		Ad. 100 ml

MACS (Magnetic-activated cell sorting)-Puffer

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
PBS (w/o Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )		47,3 ml
FCS	0,5 %	2,5 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	2 mM	0,2 ml

Vor Gebrauch durch einen 0,2 µm Spritzenfilter sterilfiltriert und für 15 Minuten im Ultraschallbad entgast.

FACS (Fluorescence activated cell sorting) -Puffer

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
PBS (w/o Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )		474 ml
FCS	5 %	25 ml
Natriumazid (10 % w/v)	0,02 %	1 ml

IZ-Puffer (intrazellulärer Zytokinnachweis)

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
PBS (w/o Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )		494 ml
FCS	1 %	5 ml
Natriumazid (10% w/v)	0,02 %	1 ml

5 mM EDTA/ PBS-Lösung

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
PBS (w/o Mg <sup>2+</sup> , Ca <sup>2+</sup> )		50 ml
0,5 M EDTA pH 8,0	5 mM	0,5 ml

Herstellung der Percoll-Lösungen

100% Percoll:	Percoll-Stammlösung	1:10	in <b>10×PBS</b> verdünnen.
80% Percoll-Lösung:	100% Percoll	1:1,25	in <b>1×PBS</b> verdünnen.
40% Percoll-Lösung:	100% Percoll	1:2,5	in <b>1×PBS</b> verdünnen.

Gel-Lade-Puffer

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
Bromphenolblau und Xylencyanol (lyophilisiertes Pulver)	je 0,25%	
DNase und RNase freies Wasser		7 ml
Glycerol	30%	3 ml

Es wurden 2 µl des Gel-Lade-Puffers zu 15 µl PCR-Produkt gegeben und auf das 1,8% Agarosegel aufgetragen.

Hämalaun nach P. Mayer

<b>Reagenz</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
Haematoxylin	1 g
Aqua dest	Ad. 1000 ml
Natriumiodad	0,2 g
Kaliumaluminiumsulfat	50 g
	→ RT rühren und lösen
Chloralhydrat	50 g
Citronensäure	1 g

Die Lösung nahm eine rotbraune bis violette Färbung an.

Coating Puffer

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO <sub>3</sub> )	100 mM	4,2 g
Natriumcarbonat (Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> )	33,6 mM	1,78 g
Aqua dest.		Ad. 500 ml

10×PBS

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
Natriumchlorid (NaCl)	1,37 M	80 g
Natriumhydrogenphosphat (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ) dibasic	81,7 mM	11,6 g
Kaliumdihydrogenphosphat (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	14,7 mM	2 g
Kaliumchlorid (KCl)	26,8 mM	2 g
Aqua dest., pH 7,4 mit 4 M KOH		Ad. 1000 ml

Zytokin-ELISA-Waschpuffer

10×PBS mit Aqua dest. zu 1×PBS verdünnt und mit 0,05% Tween 20 versetzt.

Zytokin-ELISA-Verdünnungspuffer

1×PBS mit 10% FCS versetzt und 0,02% Natriumazid zugegeben.

0,5 M Tris-HCl pH 7,4

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
Trisma Base	0,5 M	60,55 g
Aqua dest. pH 7,4 mit 5 M HCl		Ad. 1000 ml

Immunglobulin-ELISA-Waschpuffer

50 mM Tris-HCl pH 7,4 mit 1% Tween 20 versetzt.

Immunglobulin-ELISA-Verdünnungspuffer

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
Albumin Fraktion V	3%	3 g
50 mM Tris-HCl pH 7,4		1000 ml

Citrat-Puffer (Galatti-Puffer)

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
Citronensäure-Monohydrat	200 mM	8,41 g
Aqua dest., pH 3,95 mit 4 M KOH		Ad. 200 ml

ELISA Substratlösung

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB)	100 mM	24 mg
Ethanol absolut		500 µl
Dimethylsulfoxid (DMSO)		500 µl

Narkosemittel

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
PBS		10 ml
Ketamin 10%	1,0%	1 ml
Xylazin 2%	0,02%	0,1 ml

4% Formaldehydlösung

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
10×PBS	1×	100 ml
Formaldehyd 34/40%	4%	100 ml
Aqua dest.		Ad. 1000 ml

**2.1.5. Nährmedien**RPMI DC-Medium

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
RPMI1640 mit L-Glutamin		440 ml
200 mM L-Glutamin	2 mM	5 ml
Pen-Strep (100-fach)	1 %	5 ml
FCS	10 %	50 ml
0,5 M 2-Mercaptoethanol	0,5 mM	0,5 ml

RPMI DC-Vollmedium

RPMI-DC-Medium + 10% GM-CSF Zellkulturüberstand einer GM-CSF produzierenden Zelllinie

RPMI Vollmedium

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
RPMI1640 mit L-Glutamin		417 ml
200 mM L-Glutamin	2 mM	5 ml

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
Pen-Strep (100-fach)	1 %	5 ml
FCS	10 %	50 ml
1 M HEPES	25 mM	12,5 ml
Nicht essentielle Aminosäuren (100-fach)	1 %	5 ml
100 mM Natriumpyruvat	1 mM	5 ml
0,5 M 2-Mercaptoethanol	0,5 mM	0,5 ml

#### Basales Hybridoma-Medium

<b>Reagenz</b>	<b>Endkonzentration</b>	<b>eingesetzte Quantität</b>
Advanced RPMI 1640		487,5 ml
200 mM L-GlutaMAX™	2 mM	5 ml
→ in sterile Glasflasche sterilfiltrieren		
Nutridoma-SP	1%	5 ml
FCS	0,5%	2,5 ml

### **2.1.6. Antikörper**

#### Antikörper für die Durchflusszytometrie

##### **Biotinylierte Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotype</b>	<b>Bestellnr.</b>	<b>Hersteller</b>	<b>eingesetzte Konzentration</b>
CD4 (L3T4)	GK1.5	rat IgG2b	553728	BD Pharmingen	5 µg/ml
CD80 (B7-1)	16-10A1	ar ham IgG2,κ	553767	BD Pharmingen	10 µg/ml
βTCR	H57-597	ar ham IgG2,λ	553169	BD Pharmingen	10 µg/ml

##### **FITC (Fluorescein Isothiocyanat) gekoppelte Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotype</b>	<b>Bestellnr.</b>	<b>Hersteller</b>	<b>eingesetzte Konzentration</b>
CD11b	M1/70	rat IgG2b,κ	557396	BD Pharmingen	2 µg/ml
CD4	GK1.5	rat IgG2b,κ	553729	BD Pharmingen	10 µg/ml
CD69	H1.2F3	ar ham IgG1,λ	553236	BD Pharmingen	10 µg/ml
CD86 (B7-2)	GL1	rat IgG2a,κ	553691	BD Pharmingen	5 µg/ml
I-A <sup>d</sup> /I-E <sup>d</sup>	2G9	rat IgG2a,κ	553623	BD Pharmingen	10 µg/ml
IFNγ	XMG1.2	rat IgG1	554411	BD Pharmingen	10 µg/ml

**PE (Phycoerythrin) gekoppelte Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotype</b>	<b>Bestellnr.</b>	<b>Hersteller</b>	<b>eingesetzte Konzentration</b>
CD40	3/23	rat IgG2a, $\kappa$	553791	BD Pharmingen	10 $\mu$ g/ml
CD45RA CD49b (Pan-NK Cells)	14.8 DX5	ar ham IgG1, $\lambda$ rat IgM, $\kappa$	553380 553858	BD Pharmingen BD Pharmingen	2 $\mu$ g/ml 20 $\mu$ g/ml
DO11.10	KJ1-26	ms IgG2a, $\kappa$	551772	BD Pharmingen	10 $\mu$ g/ml
IL-10	JES5-16E3	rat IgG2b	554467	BD Pharmingen	10 $\mu$ g/ml
NK-1.1	PK136	ms IgG2a, $\kappa$	553165	BD Pharmingen	20 $\mu$ g/ml
Streptavidin			554061	BD Pharmingen	5 $\mu$ g/ml

**APC<sub>AK</sub> (Allophycocyanin) gekoppelte Antikörper**

<b>Antikörper</b>	<b>Klon</b>	<b>Isotype</b>	<b>Bestellnr.</b>	<b>Hersteller</b>	<b>eingesetzte Konzentration</b>
CD11c	HL3	ar ham IgG1, $\lambda$	550261	BD Pharmingen	10 $\mu$ g/ml
CD45R/B220	RA3-6B2	rat IgG2a, $\kappa$	553092	BD Pharmingen	2 $\mu$ g/ml
DO11.10	KJ1-26	ms IgG2a, $\kappa$	MM7505	Caltag	20 $\mu$ g/ml
IL-4	11B11	rat IgG1	554436	BD Pharmingen	10 $\mu$ g/ml
Streptavidin			554067	BD Pharmingen	5 $\mu$ g/ml

Allgemein verwendete Antikörper

<b>Bezeichnung</b>	<b>Bemerkung</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Bestellnummer</b>
Biotin Ratten Anti-Maus IgE, monoklonal, Klon R35-118	sekundärer AK ELISA	BD Pharmingen	553419
Biotin Ratten Anti-Maus IgG1, monoklonal, Klon A85-1	sekundärer AK ELISA	BD Pharmingen	553441
Maus Anti-Ovalbumin IgE 0,1 mg	Standard für OVA spez. IgE ELISA	Biozol	BZL05775
monoklonales Anti-Hühnerei Albumin, Klon OVA 14	Standard für OVA spez. IgG1 ELISA	SIGMA-Aldrich	A6075
murines rekombinantes Anti-IL-12	Stimulus intrazelluläre Zytokinakkumulation	Peptotech	500-P155G
murines rekombinantes Anti-IL-4	Stimulus intra- zelluläre Zytokinakkumulation	Peptotech	500-P54



Bezeichnung	Bemerkung	Hersteller	Bestellnummer
Rat Anti-Maus CD16/CD32,	Fc Block, aufgereinigt	BD Pharmingen	553142
Rat IgG, ChromPure	<i>in vivo</i> Isotypenkontrolle	Jackson Immuno Research Laboratories	012-000-003

### 2.1.7. Oligonukleotide

Bezeichnung	Nukleotidsequenz	Endkonzentration	Hersteller
CpG2216	gsgsg ggA CgA TCg TCg sgsosg sgs	500 nM	TIB MOLBIOL

Primerpaar FLOX: IL-10 floxed Allel (wt 480 bp/ FL 514 bp)

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
Flox_forw	CCA GCA TAG AGA GCT TGC ATT ACA
Flox_rev	GAG TCG GTT AGC AGT ATG TTG TCC AG

Primerpaar CRE: Cre Allel (630 bp)

Bezeichnung	Nukleotidsequenz
Cre_forw	GGA AAT GGT TTC CCG CAG AAC CTG A
Cre_rev	GAT GAG TTG CTT CAA AAA TCC CTT CCA

### 2.1.8. Hybridome und Mauslinien

Tabelle 2.1 Übersicht der verwendeten Hybridome

Bezeichnung	Beschreibung	Herkunft
DN32.D3	NKT Hybridom mit V $\alpha$ 14-J281 invariante $\alpha$ -Kette des TCR [191]	A. Bendelac, Howard Hughes Medical Institute, Committee on Immunology, Department of Pathology, University of Chicago, Chicago, IL 60637, USA
HB-12538	Klon: 1B1.3a, Ratten Anti-Maus IL-10 Rezeptor, bindet an die extrazelluläre Region des Maus IL-10R CD210 [250]	ATCC über LGC Promochem GmbH, Wesel, Deutschland

Tabelle 2.2 Übersicht der verwendeten Mauslinien

Bezeichnung	Beschreibung	Mausstamm	Herkunft
wt BALB/c	Wildtyp	BALB/c	Charles River Sulzfeld, Deutschland
wt C57BL/6	Wildtyp	C57BL/6	Charles River Sulzfeld, Deutschland
DO11.10	Transgener TCR für Peptid 323-339 von Hühnerovalbumin	BALB/c	Dr Dennis Loh, Howard Hughes Medical Institute, St Louis, Mo [241]
IL-10 <sup>FL/FL</sup> CD4-Cre <sup>+</sup>	Konditionelles Ausschalten des IL-10 Gens in T Zellen durch Cre-LoxP System	C57BL/6	PD Dr Axel Roers, Klinik für Dermatologie, Universität zu Köln, Deutschland [271]
IL-10 <sup>FL/FL</sup>	IL-10 Gen flankiert mit loxP-Sequenz	C57BL/6	PD Dr Axel Roers, Klinik für Dermatologie, Universität zu Köln, Deutschland [271]
CD4-Cre [195]	Expression der Cre-Rekombinase unter CD4 regulatorischen Elemente	C57BL/6	PD Dr. Axel Roers, Klinik für Dermatologie, Universität zu Köln, Deutschland
IL-10 k.o. [188]	Erstes Exon des <i>IL-10</i> Gens durch Einfügen eines Terminations-Codons und einer <i>neo</i> Expressionskassette unterbrochen, Einfügen eines Terminations-Codons im dritten Exon	C57BL/6	Gesellschaft für Biotechnologische Forschung, Braunschweig über PD Dr. Axel Roers, Klinik für Dermatologie, Universität zu Köln, Deutschland
CD1d k.o.	Drittes Exon des <i>CD1d1</i> Gens durch Neomycin-Resistenzkassette ersetzt	C57BL/6	Dr. Luc Van Kaer, Department of Microbiology and Immunology, Vanderbilt University School of Medicine, Nashville, TN [230]

### 2.1.9. Verwendete Analysekits

Bezeichnung	Hersteller	Bestellnummer
BD Cytotfix/ Cytoperm Plus Fixation/ Permeabilization Kit	BD Biosciences	555028
BD OptEIA™ Set Maus IFN-g	BD Biosciences	555138
BD OptEIA™ Set Maus IL-10	BD Biosciences	555252
BD OptEIA™ Set Maus IL-12p70	BD Biosciences	555256
BD OptEIA™ Set Maus IL-4	BD Biosciences	555232
BD OptEIA™ Set Maus IL-5	BD Biosciences	555236
BD OptEIA™ Set Maus IL-6	BD Biosciences	555240
CD4+ T cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec	130-090-860
Diff Quik	Medion Diagnostics	130832
Maus IL-13 CytoSet	Invitrogen	CMC2223
Mycoplasma Detection Kit	Roche Applied Science	11 296 744 001
QCL-1000 Chromogenic LAL (Limulus Amebocyte Lysate)	Lonza	50-647U

## 2.2. Methoden

### 2.2.1. allgemeine Zellzählung

Die zu zählende Zellsuspension wurde mit einer Trypanblau-Lösung zum Ausschluss von toten Zellen verdünnt. Es wurden jeweils mindestens zwei unabhängige Zellzählungen von je vier Großquadraten einer Neubauer-Zählkammer durchgeführt, von denen vor Berechnung der absoluten Zellzahl der Mittelwert bestimmt wurde. Die absolute Zellzahl wurde wie folgt berechnet:

$$Zellzahl_{absolut} = \frac{Zellen_{gezählt}}{4} \times Suspensionsvolumen[ml] \times Verdünnungsfaktor \times 10^4$$

### 2.2.2. Herstellung des wässrigen Birkenpollenextrakts

Der in wasserarmer Umgebung gelagerte Pollen wurde in 15 ml Polypropylen-Röhrchen eingewogen. Mit dem im entsprechenden Versuch eingesetzten Nährmedium wurde eine Konzentration von 10 mg/ml eingestellt und die Lösung gründlich mit einem sogenannten Vortex

durchmischt. Anschließend wurde diese Lösung bei 37°C im Schüttelwasserbad für 30 Min. inkubiert. Währenddessen wurde die Lösung jeweils im Abstand von 10 Min. zusätzlich mittels Vortex durchmischt. Zur Abtrennung der Pollen vom wässrigen Extrakt wurde die Lösung für 10 Min. bei 4°C und 4000 rpm in einem Ausschwingrotor einer Heraeus Labofuge 400R, Thermo Scientific, zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig, ohne die Pollenschicht zu berühren, mit einer Kanüle 20G 1 1/2" –Nr.1 an einer 5 ml Spritze abgezogen und mittels eines 0,2 µm Spritzenfilters sterilfiltriert. Dieser so erzeugte Extrakt stellte die fertige Gebrauchslösung des wässrigen Birkenpollenextrakts dar.

### **2.2.3. Generierung von GM-CSF Überstand**

Die GM-CSF produzierende Zelllinie wurde unserem Labor von Manfred Lutz, Erlangen, zur Verfügung gestellt. Hierbei handelte es sich um eine Hypoxanthine Aminopterin Thymidine (HAT)- sensitive Ag8653 Myelomzelllinie, die mit muriner GM-CSF-cDNA transfiziert wurde [301]. Von diesen Zellen wurden ca.  $5 \times 10^6$  Zellen in 100 ml RPMI DC-Medium in einer T185-Flasche (SoLo Flask NUNC) eingesät und bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert, bis das Medium eine stark gelbe Färbung aufwies. Die Zellen wurden bei 1200 rpm für 10 Min. bei 4°C abzentrifugiert. Der GM-CSF enthaltende Überstand wurde mittels Vakuumpumpe sterilfiltriert und in Aliquots bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Die Zellen wurden im Verhältnis 1:2 bis 1:4 gesplittet und in frischem Medium weiter kultiviert, bis das Medium wieder eine stark gelbe Färbung aufwies.

Wäre der GM-CSF-Gehalt im Zellkulturüberstand zu gering geworden, hätten die transfizierten Zellen durch Zusatz von 1 mg/ml des Antibiotikums G418 (Geneticin™) erneut selektiert werden müssen.

### **2.2.4. Generierung von Dendritischen Zellen**

Die Dendritischen Zellen wurden aus dem Knochenmark der Maus unter Zusatz von GM-CSF oder Flt3-Ligand generiert.

Zur Gewinnung des Knochenmarks wurden Tibia und Femur der Hinterbeine einer Maus vollständig von Sehnen und Muskelgewebe befreit und in RPMI-DC-Medium auf Eis bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt. Die weiteren Arbeiten erfolgten unter der sterilen Arbeitsbank. Die Knochen wurden zur Desinfektion für 1 Minute in eine 70 % Isopropanollösung gegeben und anschließend in frisches RPMI-DC-Medium transferiert. Nun wurden die Knochen an beiden Enden mit einer scharfen Schere geöffnet und das Knochenmark mittels RPMI-DC-Medium aus einer 20 ml Einmalspritze herausgespült. Hierbei wurde für den Femur eine Sterican Kanüle Gr. 17 - lila Ø 0,55 x 25mm 24G 1" und für die Tibia eine Sterican Kanüle Gr. 20 - grau Ø 0,40 x 20mm 27G 3/4" verwendet. Das Knochenmark wurde in einem 50 ml Röhrchen gesammelt und für 10 Min. bei 4°C und 1200 rpm in einem Ausschwingrotor einer Heraeus Labofuge 400R oder einer Heraeus Megafuge 1.0 R zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zur Lyse der Erythrozyten wurden

pro vier durchspülter Knochen jeweils 10 ml Erythrozyten-Lysepuffer verwendet. Die Lyse erfolgte für 6 Min. und wurde durch Auffüllen des Röhrchens mit RPMI-DC-Medium beendet. Zum Sedimentieren der Zellen folgte ein Zentrifugationsschritt für 10 Min. bei 4°C und 1200 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 5 ml RPMI-DC-Medium pro vier durchspülter Knochen resuspendiert und durch ein 70 µm Zellsieb gegeben. Anschließend wurde mit dem gleichen Volumen das Zellsieb nachgespült. Nach gründlichem Resuspendieren wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Neubauer-Kammer ermittelt (siehe Kapitel 2.2.1).

Zur Ausdifferenzierung der Knochenmarkszellen zu cDC wurden  $3 \times 10^6$  Zellen aus Mäusen mit BALB/c-Hintergrund und  $2 \times 10^6$  Zellen aus Mäusen mit C57BL/6-Hintergrund in eine 96 mm Zellkultur-Platte in 10 ml RPMI-DC-Medium mit 10% GM-CSF Zellkulturüberstand (ZKÜ) (siehe Kapitel 2.2.3) für 8 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. An Tag 3 wurden 10 ml RPMI-DC-Medium mit 20% GM-CSF ZKÜ (Endkonzentration 10% GM-CSF ZKÜ) dazugegeben. An Tag 6 wurden 10 ml Medium vorsichtig abpipettiert und durch 10 ml frisches RPMI-DC-Medium mit 20% GM-CSF ZKÜ ersetzt. Die semi-maturen cDC waren an Tag 8 ausdifferenziert und konnten für nachfolgende Experimente verwendet werden.

Knochenmarkszellen differenzieren unter Zugabe von Flt3-Ligand zu einem hohen Prozentsatz (durchschnittlich 50%) zu pDC. Hierfür wurden  $25 \times 10^6$  Zellen in 20 ml RPMI-DC-Medium in eine T75 Zellkulturflasche gegeben und mit 35 ng/ml Flt3-Ligand supplementiert. Ohne Mediumwechsel wurden die Zellen für 8 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert und anschließend für Experimente eingesetzt.

## **2.2.5. Isolierung von primären Lymphozyten aus verschiedenen Geweben**

### ***2.2.5.1. Herstellung einer Einzelzellsuspension aus der Milz***

Zur Erzeugung einer Einzelzellsuspension aus der Milz wurde diese zunächst auf ein 70 µm Zellsieb gegeben, eingeschnitten und mit dem Kolben einer 5 ml Spritze unter häufigem Spülen mit RPMI Vollmedium homogenisiert. Nach dem Pelletieren bei 1200 rpm für 10 Min. und 4°C erfolgte eine Erythrozytenlyse für ca. 6 Min. mit je 10 ml Lysepuffer pro Milz, die durch Zugabe von RPMI Vollmedium abgestoppt wurde.

### ***2.2.5.2. Anreicherung von CD4<sup>+</sup> T Zellen aus der Milz mittels MACS-Technik***

MACS steht für *magnetic-activated cell sorting*. Diese Technik wurde von dem Unternehmen Miltenyi Biotec entwickelt. Magnetische MACS-MicroBeads sind an Antikörper oder Proteine gebunden, die an die für die Isolierung der entsprechenden Zellpopulation spezifischen Marker binden. Werden die so markierten Zellen über eine MACS-Säule, die sich in einem starken

Magnetfeld befindet, gegeben, werden diese Zellen zurückgehalten. So können verschiedene Zellpopulationen entweder durch positive Selektion oder Depletion isoliert werden.

Es wurden aus primärem Milzgewebe von naiven wt Mäusen CD4<sup>+</sup>-Zellen indirekt über die MACS-Technik angereichert, um einen hohen Anteil an CD4<sup>+</sup> Zellen für die *in vitro* Analyse der allogenen T Zell-DC Interaktion zu erhalten. Für die antigenspezifischen Kokulturen wurden CD4<sup>+</sup> T Zellen aus Milzen von TCR-transgenen Mäusen (DO11.10) mit einem hohen prozentualen Anteil an spezifischen T Zellen für das Ovalbuminpeptid OVA<sub>323-339</sub> (ca.80%) angereichert.

Hierfür wurde zunächst eine Einzelzellsuspension der Milzen hergestellt (siehe Kapitel 2.2.5.1). Die Zellsuspension wurde nach einem weiteren Zentrifugationsschritt in 250 µl MACS-Puffer pro Milz resuspendiert. Um den Anteil an CD4<sup>+</sup> Zellen zu bestimmen, wurde eine kleine Probe der Zellen für eine FACS-Analyse (siehe Kapitel 2.2.8.1) abgenommen.

Die Markierung und Aufreinigung der Zellen wurden gemäß dem Datenblatt 130-090-860 des Unternehmens Miltenyi Biotec durchgeführt. Als Abweichung des Protokolls ist anzumerken, dass die Zellen über eine mit MACS-Puffer befeuchtete LS-Säule gegeben und zweimal mit je 6 ml Puffer gewaschen wurden. Die hierbei eluierten Zellen enthielten die CD4<sup>+</sup> T Zellen. Um die Reinheit der CD4<sup>+</sup> Zellen zu bestimmen, wurde eine Probe für die durchflusszytometrische Messung abgenommen. Die angereicherten CD4<sup>+</sup> Zellen wurden für die Experimente der DC –T Zell-Kokulturen (siehe Kapitel 2.2.7) verwendet.

### ***2.2.5.3. Isolierung von mononukleären Zellen aus der Leber mittels Percoll-Dichtegradient***

Percoll besteht aus Siliziumpartikeln mit einem Durchmesser von 15-30 nm. Diese Partikel sind mit einer dünnen Schicht aus Polyvinylpyrrolidon (PVP) überzogen. Die Dichte beträgt  $1.13 \pm 0.005$  g/ml. Percoll weist eine relativ geringe Viskosität auf und ist osmotisch inert. Mit Hilfe eines Percoll-Dichtegradienten lassen sich unter anderem mononukleäre Zellen aus der Leber isolieren [357].

Vor der Entnahme der Leber wurde diese zunächst durch Injektion von 5-10 ml PBS in die *vena hepatica* perfundiert, zügig entnommen und in RPMI Vollmedium bis zur weiteren Verwendung auf Eis aufbewahrt. Zur Herstellung der Einzelzellsuspension wurde die Leber in ein 70 µm Zellsieb gegeben und mit dem Kolben einer 5 ml Spritze unter häufigem Spülen mit RPMI Vollmedium homogenisiert. Nach dem Pelletieren der Zellen wurden diese in 6,5 ml 80% Percoll-Lösung resuspendiert und mit 7,5 ml 40% Percoll-Lösung in einem 15 ml Röhrchen vorsichtig überschichtet. Dieser Dichtegradient wurde 30 Min. bei 20°C und 3000 rpm ohne Bremse in einem Ausschwingrotor einer Heraeus Labofuge 400R oder einer Heraeus Megafuge 1.0 R zentrifugiert. Die mononukleären Zellen (MNC) sammelten sich in einem Ring zwischen der 80% und 40% Percoll-Lösung und wurden mit Hilfe einer sterilen Pasteurpipette entnommen. Es wurde darauf geachtet, dass keine Verunreinigungen durch Hepatozyten von der Oberfläche des Gradienten

auftreten. Die MNC wurden mit RPMI Vollmedium gewaschen und gegebenenfalls bei Verunreinigung durch Erythrozyten eine Erythrozyten-Lyse mit 3 ml Lysepuffer für 2 Min. durchgeführt und abermals gewaschen. Eine Probe der Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie auf die Reinheit der zu analysierenden Zellpopulation untersucht (siehe Kapitel 2.2.8.1).

### 2.2.6. Stimulationsassays

#### Stimulation der pDC

Für die Stimulation von pDC wurden  $5 \times 10^5$  Zellen der generierten pDC (siehe Kapitel 2.2.4) in 100  $\mu$ l RMPI-DC Medium in 96-Loch Rundbodenplatten der Firma Greiner Bio One gegeben. Diese Zellen wurden vor dem Einsäen bei einer Konzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml mit 70 ng/ml Flt3-Ligand versetzt, um bei einem Endvolumen von 200  $\mu$ l im Napf eine Endkonzentration von 35 ng/ml zu erhalten. Zur Aktivierung der pDC wurde der TLR9-Ligand CpG2216 (siehe Tabelle 2.4) eingesetzt. Es wurde der Einfluss von *Bet.*-APE in verschiedenen Konzentrationen (siehe Tabelle 2.5), sowie der Einfluss von Phytoprostan  $E_1$  in verschiedenen Konzentrationen (siehe Tabelle 2.5) untersucht. Dieser Stimulationsansatz wurde für 20 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Der Zellkulturüberstand wurde zur Analyse von sekretierten Zytokinen verwendet (siehe Kapitel 2.2.11.1). Der Maturationsgrad der Zellen und die lebenden Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.8.1 und 2.2.8.2).

#### Stimulation der cDC

Für die Stimulation von cDC wurden  $1 \times 10^5$  Zellen der generierten cDC (siehe Kapitel 2.2.4) in RMPI-DC Medium in 96-Loch Flachbodenplatten der Firma Greiner Bio One gegeben. Das Endvolumen im Napf betrug je nach Versuch zwischen 280 - 320  $\mu$ l. Wurden die cDC für eine spätere Kokultur mit T Zellen stimuliert, erfolgte die Inkubation der Zellen in 6-Loch Zellkulturplatten mit  $0,75 - 1,0 \times 10^6$  Zellen pro Napf in einem Endvolumen von 1,6 ml. Für die Kokultur mit dem NKT-Hybridom DN32.D3 wurden  $2,0 \times 10^6$  cDC in einem Endvolumen von 2,0 ml stimuliert. Die eingesäten Zellen wurden vor der Stimulation mit GM-CSF versetzt, so dass später im Ansatz eine Endkonzentration von 50 ng/ml vorlag. Zur Aktivierung der cDC wurden der TLR4-Ligand LPS oder der TLR9-Ligand CpG2216 verwendet (siehe Tabelle 2.4). Die Zellen wurden mit verschiedenen Stimuli inkubiert, um deren Einfluss auf die funktionellen Eigenschaften der cDC zu untersuchen (siehe Tabelle 2.5). Der Stimulationsansatz wurde für 20 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert [190]. Wurden die cDC in einer späteren antigenspezifischen Kokultur mit T Zellen eingesetzt, wurde dem Stimulationsansatz für die Antigenpräsentation 1 mg/ml Ovalbumin Klasse VI (Endotoxin frei), als Kontrolle PBS zugesetzt. Wenn die stimulierten cDC für eine Kokultur mit spezifischer NKT Zellen Aktivierung vorgesehen waren, wurde dem Stimulationsansatz während der letzten 5 h 5  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -Galactosylceramid, als Kontrolle 0,5% DMSO zugesetzt. Alle Zellansätze, die in einer Kokultur eingesetzt wurden, wurden nach den 20 h Stimulation zweimal in 5 bis 7 ml RPMI-DC Medium oder Vollmedium gewaschen. Von allen

anderen Stimulationsansätzen wurde der Zellkulturüberstand zur Analyse von sekretierten Zytokinen verwendet (siehe Kapitel 2.2.11.1). Der Maturationsgrad der Zellen und der Anteil lebender Zellen wurden durchflusszytometrisch bestimmt (siehe Kapitel 2.2.8.1 und 2.2.8.2).

#### Stimulation der NKT-Zellen aus Leber oder Milz

Zur Analyse der funktionellen Veränderung von NKT Zellen durch *Bet.*-APE wurden entweder  $2 \times 10^5$  MNC aus der Leber (vgl. Kapitel 2.2.5.3) oder  $5 \times 10^5$  Zellen einer Einzelzellsuspension aus der Milz (vgl. Kapitel 2.2.5.1) in RPMI Vollmedium in 96-Loch Rundbodenplatten der Firma Greiner Bio One gegeben und mit *Bet.*-APE in Konzentrationen zwischen 0,1 - 0,6 mg Pollen/ ml in einem Endvolumen von 200  $\mu$ l für 62 h inkubiert. Nach 20 h Inkubation erfolgte die Zugabe von 5  $\mu$ g/ ml  $\alpha$ -GalCer oder 0,5% DMSO als Kontrolle. Dieser Ansatz wurde für weitere 42 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Die Zellen und der Zellkulturüberstand wurden für nachfolgende Analysen verwendet.

#### Stimulation der NKT Zell-Hybridome

Zur Analyse des spezifischen Einflusses von *Bet.*-APE auf NKT Zellen wurden je nach Versuch  $7 - 8 \times 10^5$  Zellen des NKT Zell-Hybridoms DN32.D3 in 4 ml RPMI Vollmedium mit Gentamycin in einem Napf einer 6-Loch Zellkulturplatte für 20 h in Ab- oder Anwesenheit von *Bet.*-APE in Konzentrationen zwischen 0,1 - 0,6 mg Pollen/ ml bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Diese stimulierten Zellen wurden im nachfolgenden mit  $\alpha$ -GalCer beladenen cDC kokultiviert (vgl. Kapitel 2.2.7.3).

**Tabelle 2.3** Verwendete Differenzierungsfaktoren für die Generierung von DC aus Knochenmark

Differenzierungsfaktor	Stock	Endkonzentration	Lösungsmittel
GM-CSF	10 $\mu$ g/ml	50 ng/ml	PBS
Flt3-Ligand	550 $\mu$ g/ml	35 ng/ml	PBS

**Tabelle 2.4** Verwendete TLR- und CD1d-Liganden

Ligand	Stock	Endkonzentration	Lösungsmittel
LPS	10 $\mu$ g/ml	100 ng/ml	PBS
CpG2216	500 $\mu$ M	500 nM	PBS
$\alpha$ -Galactosylceramid	1 mg/ml	5 $\mu$ g/ml	DMSO

**Tabelle 2.5** Verwendete Prostaglandin- und Phytoprostan-Stimuli

Stimulus	Stock	Endkonzentrationen	Lösungsmittel
PGE <sub>2</sub>	28,37 mM	$1 \times 10^{-7}$ - $1 \times 10^{-6}$ M	Ethanol
PPE <sub>1</sub>	$0,874 \times 10^{-3}$ M	$3 \times 10^{-7}$ - $3 \times 10^{-6}$ M	Methanol
PPF <sub>1</sub>	$1,98 \times 10^{-2}$ M	$1 \times 10^{-6}$ - $1 \times 10^{-5}$ M	Methanol
<i>Bet.</i> -APE	10 mg Pollen/ml	0,1 – 2,5 mg Pollen/ ml	RPMI-DC Medium



## 2.2.7. DC – T Zell-Kokulturen

### 2.2.7.1. Allogene DC – T Zell-Kokultur

Für die allogene DC – T Zell-Kokultur wurden jeweils die aus dem Knochenmark von wt C57BL/6 (bzw. wt BALB/c) Mäusen generierten cDC (vgl. Kapitel 2.2.4) mit den aus der Milz von wt BALB/c (bzw. wt C57BL/6) Mäusen mittels MACS angereicherten CD4<sup>+</sup> T Zellen (vgl. Kapitel 2.2.5.2) kokultiviert.

Die cDC wurden nach Stimulation mit *Bet.*-APE zweimal mit mindestens 5 ml RPMI DC-Medium gewaschen, gezählt und für den Einsatz in der Kokultur in eine entsprechende Zellzahl eingestellt.

Zur Analyse von Zytokinen wurden die cDC mit den CD4<sup>+</sup> T Zellen im Verhältnis 1:30 für 6 Tage in 200 µl RPMI Vollmedium mit 20 U/ml IL-2 in 96-Loch Rundbodenplatten der Firma Greiner Bio One bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Kontrolle wurden T Zellen ohne Zusatz von cDC mitgeführt. Die Kontrollen für eine mögliche Polarisierung des Systems in Richtung Th1 oder Th2 wurden durch Zusatz von 10 ng/ml rekombinatem IL-12 und 4 µg/ml α-IL-4 Antikörper als Th1-Kontrolle und durch Zusatz von 10 ng/ml rekombinatem IL-4 und 20 µg/ml α-IL-12 Antikörper (siehe Kapitel 2.1.6) als Th2-Kontrolle gewährleistet. Nach 4 Tagen wurden 100 µl Medium durch frisches RPMI Vollmedium mit 40 U/ml IL-2 ersetzt. Die 100 µl abgenommenen Mediums wurden bei -20°C oder -80°C für spätere Zytokinbestimmungen asserviert. Nach 6 Tagen wurden die Zellen für intrazelluläre Zytokinmessungen verwendet (siehe Kapitel 2.2.8.4).

Zur Bestimmung der Proliferation von CD4<sup>+</sup> T Zellen wurden 1×10<sup>5</sup> mittels MACS CD4<sup>+</sup> angereicherte Milzzellen mit CFSE gefärbt (siehe Kapitel 2.2.8.3) und mit der entsprechenden Anzahl an cDC (siehe Tabelle 2.6) in 96-Loch Rundbodenplatten in einem Endvolumen von 200 µl für 4 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kokultiviert und im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert.

**Tabelle 2.6 Übersicht der eingesetzten DC – T-Zell-Verhältnisse für den allogenen Proliferationsansatz**

DC – T Zell-Verhältnis	Anzahl cDC	Anzahl CD4 <sup>+</sup> T Zellen
1:300	3,3×10 <sup>2</sup>	1×10 <sup>5</sup>
1:100	1,0×10 <sup>3</sup>	1×10 <sup>5</sup>
1:30	3,3×10 <sup>3</sup>	1×10 <sup>5</sup>
1:10	1,0×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>
1:5	2,0×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>

### 2.2.7.2. Antigen-spezifische DC – T Zell-Kokultur

Für die antigen-spezifische DC – T Zell-Kokultur wurden die aus dem Knochenmark von wt BALB/c Mäusen generierten cDC (vgl. Kapitel 2.2.4) mit den aus der Milz von TCR-transgenen DO11.10 Mäusen (vgl. Kapitel 2.2.5.1) mittels MACS angereicherten CD4<sup>+</sup> T Zellen (vgl. Kapitel 2.2.5.2) kokultiviert.

Die cDC wurden nach Stimulation mit ansteigenden Konzentrationen von *Bet.*-APE und Zugabe von 1 mg/ml Ovalbumin Klasse VI (Endotoxin frei → vgl. Kapitel 2.2.9) bzw. als Kontrolle PBS für 20 h (vgl. Kapitel 2.2.6) zweimal mit mindestens 5 ml RPMI DC-Medium gewaschen, gezählt und für den Einsatz in der Kokultur in eine entsprechende Zellzahl eingestellt.

Zur Analyse von intrazellulären Zytokinen wurden die cDC mit den OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellen im Verhältnis 1:30 für 6 Tage in 200 µl RPMI Vollmedium mit 20 U/ml IL-2 in 96-Loch Rundbodenplatten bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Als Kontrolle für eine mögliche Polarisierung des Systems in Th1 Richtung wurden der Kultur 10 ng/ml IL-12 und 4 µg/ml α-IL-4 Antikörper zugesetzt. Für die Kontrolle einer Th2 Polarisierung wurden zum Ansatz 10 ng/ml IL-4 und 20 µg/ml α-IL-12 Antikörper (siehe Kapitel 2.1.6) gegeben. Nach 4 Tagen wurden 100 µl Medium durch frisches RPMI Vollmedium mit 40 U/ml IL-2 ersetzt. Nach 6 Tagen wurden die Zellen für intrazelluläre Zytokinmessungen verwendet (siehe Kapitel 2.2.8.4).

Zur Bestimmung der Proliferation der OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellen wurden 1×10<sup>5</sup> OVA-spezifische CD4<sup>+</sup> angereicherte und mit CFSE gefärbte T Zellen (siehe Kapitel 2.2.8.3) mit der entsprechenden Anzahl an cDC (siehe Tabelle 2.7) in 96-Loch Rundbodenplatten in einem Endvolumen von 200 µl für 4 Tage bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> kokultiviert und im Anschluss durchflusszytometrisch analysiert. Als Kontrollen wurden zum einen ohne OVA beladene cDC mit T Zellen und zum anderen T Zellen ohne cDC mitgeführt.

**Tabelle 2.7 Übersicht der eingesetzten DC – T-Zell-Verhältnisse für den antigen-spezifischen Proliferationsansatz**

DC – T Zell-Verhältnis	Anzahl cDC	Anzahl OVA-spezifische CD4 <sup>+</sup> T Zellen
1:100	1,0×10 <sup>3</sup>	1×10 <sup>5</sup>
1:30	3,3×10 <sup>3</sup>	1×10 <sup>5</sup>
1:10	1,0×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>
1:5	2,0×10 <sup>4</sup>	1×10 <sup>5</sup>

### **2.2.7.3. DC – NKT Zell-Kokultur**

Für die DC – NKT Zell-Kokultur wurden nicht aktivierte cDC mit *Bet.*-APE stimuliert, mit  $\alpha$ -GalCer beladen bzw. mit DMSO als Kontrolle inkubiert (vgl. Kapitel 2.2.6) und mit dem NKT-Hybridom DN32.D3 kokultiviert, um den indirekten Effekt von *Bet.*-APE auf NKT Zellen zu untersuchen. Hierfür wurden im Verhältnis 1:5  $3 \times 10^4$  cDC mit  $1,5 \times 10^5$  DN32.D3 Zellen in 96-Loch Flachbodenplatten in einem Endvolumen von 250  $\mu$ l für 23 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Des Weiteren wurde zur Analyse des direkten Effekts von *Bet.*-APE auf NKT Zellen das NKT-Hybridom DN32.D3 mit *Bet.*-APE stimuliert (vgl. Kapitel 2.2.6) und mit  $\alpha$ -GalCer beladenen cDC bzw. mit DMSO als Kontrolle inkubierten cDC kokultiviert. Hierfür wurden die cDC an Tag 8 der Generierung aus den 96 mm Zellkulturschalen geerntet. Jeweils  $5 \times 10^6$  cDC wurden in eine Vertiefung einer 6-Loch Platte mit 5 ml Medium und 5  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -GalCer gegeben und für 5 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Nach zwei Waschstritten mit je 5 – 7 ml RPMI DC-Medium wurden die cDC mit *Bet.*-APE stimulierten DN32.D3 Hybridom ( vgl. Kapitel 2.2.6) für weitere 23 h im Verhältnis 1:5, d.h.  $3 \times 10^4$  cDC mit  $1,5 \times 10^5$  DN32.D3 Zellen in 96-Loch Flachbodenplatten in einem Endvolumen von 250  $\mu$ l kokultiviert. Als Kontrolle für eine cDC unabhängige Zytokinproduktion durch den wässrigen Pollenextrakt wurde ein Ansatz des Hybridoms ohne cDC inkubiert.

## **2.2.8. Durchflusszytometrische Analysen**

### **2.2.8.1. Färbung von Oberflächenmarkern**

Zur Färbung von Oberflächenmarkern wurden die Zellen in 1,2 ml Mikro-Röhrchen der Firma Alpha Laboratories transferiert und zum Waschen mit 300  $\mu$ l FACS-Puffer (vgl. Kapitel 2.1.4) 5 Min. bei 1200 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Um unspezifisches Binden der Antikörper an die Fc Rezeptoren Fc $\gamma$ II oder Fc $\gamma$ III zu verringern, wurden die Zellen mit je 10  $\mu$ l einer 0,5  $\mu$ g/ml Ratten Anti-Maus CD16/CD32 Antikörper-Lösung als Fc-Block für 5 Min. bei 4°C inkubiert. Im Anschluss wurden ohne zu waschen jeweils 10  $\mu$ l der Oberflächenantikörper in den zuvor bestimmten optimalen Konzentrationen zugegeben und für 30 Min. bei 4°C inkubiert. Ein weiterer Waschschrift mit 300  $\mu$ l FACS-Puffer folgte. Falls ein sekundärer Antikörper für die Bindung an einen biotinylierten Antikörper für die Färbung benötigt wurde, wurde dieser für 10 Min. bei 4°C mit den Zellen inkubiert. Hierbei wurde ein Volumen von 10  $\mu$ l in einer Verdünnung von 1:100 appliziert. Nach einem weiteren Waschschrift wurden die Zellen in einem Volumen von 180 bis 200  $\mu$ l FACS-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen. Tote Zellen wurden anhand einer PI-Färbung (vgl. Kapitel 2.2.8.2) von der Analyse ausgeschlossen.

Für eine optimale Einstellung des Durchflusszytometers wurde zum einen zum Ausschluss von unspezifischen Bindungen von jedem Antikörper eine Fluorochrom gekoppelte Isotypenkontrolle gemessen und zum anderen jeder Fluorochrom gekoppelte Antikörper als Einzelfärbung analysiert.

### Bestimmung der Reinheit und Aktivierung von pDC

*In vitro* generierte pDC unter Verwendung von Flt3-Ligand lassen sich durchflusszytometrisch anhand der Expression folgender Marker detektieren: B220, CD45RA, CD11c. Für CD11b sind diese Zellen negativ [140]. Nach Ausschluss von toten Zellen mittels PI (siehe Kapitel 2.2.8.2) wurde anhand von CD45RA und CD11c positiven Zellen und CD11b negativen Zellen der Anteil an pDC in der Kultur bestimmt (siehe Anhang Abbildung 10.1).

Zur Bestimmung des Maturationsstatus wurden die Expression von CD69 und CD40 detektiert (siehe Anhang Abbildung 10.2).

### Bestimmung der Reinheit und Aktivierung von cDC

Der Anteil von *in vitro* generierten cDC unter Zusatz von GM-CSF lässt sich anhand der Expression von CD11c nach Ausschluss von toten Zellen mittels PI (siehe Kapitel 2.2.8.2) durchflusszytometrisch bestimmen.

Der Aktivierungsgrad der cDC wurde durch die Expression von CD40, CD80, CD86 und vom Haupthistokompatibilitätskomplex MHC Klasse II detektiert (siehe Anhang Abbildung 10.3).

Zur Detektion einer durch *Bet.*-APE veränderten Lipid-Antigenpräsentation von cDC wurde die Expression von CD1d bestimmt.

### Bestimmung der Reinheit von CD4<sup>+</sup> T Zellen

Zur Bestimmung der Reinheit von CD4<sup>+</sup> Zellen aus der Milz nach Anreicherung mittels MACS (siehe Kapitel 2.2.5.2) wurde ein Aliquot der Zellen vor der Aufreinigung und ein Aliquot nach der Aufreinigung mit Anti-CD4-FITC Antikörper gefärbt und nach Ausschluss von toten Zellen mittels PI (siehe Kapitel 2.2.8.2) der Anteil an CD4<sup>+</sup> Zellen bestimmt.

### Bestimmung der Reinheit von OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> T Zellen

Zur Bestimmung der Reinheit von OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> Zellen aus der Milz nach Anreicherung mittels MACS (siehe Kapitel 2.2.5.2) wurde ein Aliquot der Zellen vor der Aufreinigung und ein Aliquot nach der Aufreinigung mit Anti-CD4-FITC und Anti-DO11.10 clonotypic TCR-APC<sub>AK</sub> Antikörper gefärbt und nach Ausschluss von toten Zellen mittels PI (siehe Kapitel 2.2.8.2) der Anteil an OVA-spezifischen CD4<sup>+</sup> Zellen bestimmt.

### Bestimmung der Reinheit von NKT Zellen

Zur Bestimmung des Anteils an NKT-Zellen der mononukleären Zellen aus der Leber (vgl. Kapitel 2.2.5.3) oder aus der Milz (vgl. Kapitel 2.2.5.1) wurden die Zellen mit Anti- $\alpha\beta$  TCR und mit Anti-NK1.1 für Zellen aus C57BL/6 oder mit Anti-CD49/ Pan-NK-cells (DX-5) für Zellen aus BALB/c gefärbt und nach Ausschluss von toten Zellen mittels PI der Anteil an NKT-Zellen der mononukleären Zellen aus Leber und Milz bestimmt.

### 2.2.8.2. *Toxizitätsmessung*

Zur Bestimmung der Toxizität einer Substanz im Zellkulturansatz bot sich die schnelle Analyse mittels Propidiumiodidfärbung an. PI wird von toten oder absterbenden Zellen mit beschädigter Zellmembran aufgenommen und interkaliert in die DNA. Dies fluoresziert stärker als ungebundenes PI und lässt sich im Durchflusszytometer in FL-3 mit starker Strahlung in FL-2 messen. Hierfür wurden 10 µl einer 50 µg/ml PI-Lösung in PBS kurz vor der Messung zur Probe gegeben.

### 2.2.8.3. *Proliferationsmessung*

Zur Bestimmung der Proliferation von Zellen kann der Farbstoff CFDA-SE (5(6)-Carboxyfluorescein diacetate N-succinimidyl ester) verwendet werden. Dieser ist aufgrund seiner zwei Acetat-Seitenketten membranpermeabel. Diese Acetat-Ketten werden beim Eintritt ins Zytoplasma von intrazellulären Esterasen abgespalten, wodurch der fluoreszierende Farbstoff Carboxyfluorescein entsteht, welcher kovalent an Amingruppen bindet und eine Färbung der Zelle bedingt. Bei Zellteilungen wird der Farbstoff gleichmäßig auf die zwei Tochterzellen aufgeteilt, wodurch sich die Fluoreszenzintensität mit jeder Teilung der Zelle halbiert [259].

Zum Anfärben der T Zellen wurden diese zunächst mit mindestens 5 ml RPMI ohne Glutamin gewaschen, um extrazelluläre Proteine zu entfernen. Das in DMSO und bei -20°C aufbewahrte lichtempfindliche CFDA-SE (10 mM) wurde in RPMI ohne Glutamin möglichst im Dunkeln bis zu einer Endkonzentration von 5 µM verdünnt. 1 ml der Lösung wurde zu je  $2 \times 10^7$  Zellen gegeben und im Dunkeln bei 30°C im Wasserbad für 8 Min. inkubiert. Zum Beenden der Reaktion wurde das doppelte Volumen FCS, gemessen an dem vorher eingesetzten Volumen der CFDA-SE-Lösung, hinzugegeben und 1 Minute inkubiert. Nach dem Zentrifugieren wurden die Zellen zunächst mit dem gleichen Volumen 20% FCS in PBS, gemessen an dem Volumen der ursprünglich eingesetzten CFDA-SE-Lösung, für 5 Min. und nach einem weiteren Zentrifugationsschritt mit dem gleichen Volumen 10% FCS in PBS für weitere 5 Min. inkubiert und zentrifugiert. Die Zellen wurden nun in RPMI Vollmedium resuspendiert und nach dem Zählen auf die für die Kokultur erforderliche Zellzahl eingestellt.

Nach 4 Tagen in der Kokultur (siehe Kapitel 2.2.7) wurden die Zellen mit dem entsprechenden Oberflächenmarker gefärbt (allogene MLR → Anti-CD4-Bio-SA-APC<sub>AK</sub>; antigenspezifische MLR → Anti-DO11.10 clonotypic TCR-APC<sub>AK</sub>). Zum Minimieren von Zellaggregaten wurden die Zellen nach einem Waschschrift mit 100 µl einer 5 mM EDTA/ PBS-Lösung versetzt, dann 5 Min. bei Raumtemperatur (RT) geschüttelt, 10 Min. bei 37°C inkubiert und nochmals 5 Min. bei RT geschüttelt. Nach einem weiteren Waschschrift mit 300 µl FACS-Puffer wurden die Zellen zum Ausschluss von toten Zellen mit PI (siehe Kapitel 2.2.8.2) gemessen.

Zur Auswertung wurden nach Ausschluss der toten Zellen die Zellteilungsintervalle aller CD4<sup>+</sup> Zellen oder aller OVA-spezifischen T Zellen bestimmt (siehe Anhang Abbildung 10.4) und anhand dieser Zahlen die Anzahl der Zellteilungen pro 10.000 Zellen berechnet (siehe Formel).

$$\text{Zellteilungen} / 10.000 \text{ Zellen} = \frac{10.000}{\sum_{j=0}^n \frac{x_j}{2^j}} \times \sum_{j=1}^n \left( \frac{\sum_{i=1}^j 2^{(i-1)} \cdot x_j}{2^j} \right)$$

n: maximale Anzahl an Zellteilungsintervallen

$x_j$ : Zellzahl im Zellteilungsintervall j

$x_0$ : Zellzahl an ungeteilten Zellen im Zellteilungsintervall j=0

#### 2.2.8.4. Intrazellulärer Zytokinnachweis

Mit dem intrazellulären Zytokinnachweis lässt sich durchflusszytometrisch auf Einzelzellebene die Zytokinproduktion definierter Zellpopulationen in einem Zellgemisch nachweisen.

Zunächst wurden die Zellen nach 6 Tagen in der Kokultur mit 20 ng/ml PMA und 1 µg/ml Ionomycin polyklonal stimuliert. Hierfür wurden 100 µl des Zellkulturüberstands abgenommen und durch PMA/ Ionomycin supplementiertes Medium ersetzt. Nach 3 h in Kultur wurden zu jedem Ansatz 20 µl einer *Golgi-Plug*-Lösung (1:80 in RPMI Vollmedium) pipettiert und für weitere 3 h bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. *Golgi-Plug* enthält Brefeldin A und DMSO und ist Teil des hier verwendeten BD Cytotfix/ Cytoperm Kits zur Fixierung und Permeabilisierung von Zellen zur durchflusszytometrischen Analyse von intrazytoplasmatisch akkumulierten Zytokinen. Die Durchführung orientierte sich am Benutzerhandbuch des BD Cytotfix/ Cytoperm Kits des Unternehmens BD Pharmingen.

Nach Inkubation mit dem Inhibitor für den Proteintransport *Golgi-Plug* wurden die Zellen in 1,2 ml Mikroröhrchen transferiert und mit dem für die intrazelluläre Zytokinbestimmung verwendeten IZ-Puffer (vgl. Kapitel 2.1.4) gewaschen. Damit mögliche Zellaggregate gelöst wurden, wurde jeder Ansatz mit 100 µl einer 5 mM EDTA/ PBS- Lösung versetzt, 5 Min. bei RT geschüttelt, 10 Min. bei 37°C inkubiert und nochmals 5 Min. bei RT geschüttelt. Nach einem Waschschrift in IZ-Puffer wurden die Oberflächenmarker gefärbt (siehe Kapitel 2.2.8.1). Für die IFN-γ-Färbung wurde ein FITC-konjugierter, für die IL-4-Färbung ein PE-konjugierter und für die IL-10-Färbung ein APC<sub>AK</sub>-konjugierter Antikörper verwendet. Die Waschschriffe wurden mit 300 – 400 µl IZ-Puffer durchgeführt. Im nächsten Schritt wurden die Zellen durch 150 µl unverdünnte Cytotfix/ Cytoperm-Lösung in 20 Min. bei 4°C permeabilisiert. Nun wurden die Zellen zweimal mit dem in destilliertem Wasser 1:10 verdünnten *Perm-Wash* gewaschen. Je 10 µl des jeweiligen Antikörpers bzw. der jeweiligen Isotypenkontrolle wurden in einer Konzentration von 10 µg/ml zu den Proben gegeben und für 30 Min. bei 4°C inkubiert. Es wurden IFN-γ mit IL-4 und IFN-γ mit IL-10 gemeinsam detektiert. Im Anschluss an die intrazelluläre Zytokinfärbung wurden die Zellen mit drei Waschschriffen à 300 µl *Perm-Wash* gewaschen und schließlich in 180 µl IZ-Puffer aufgenommen und im Durchflusszytometer gemessen. Für die Auswertung wurden zunächst alle

Zellen betrachtet, die das entsprechende Oberflächenmolekül exprimieren. Von diesen Zellen wurde der prozentuale Anteil an Zytokin produzierenden Zellen ermittelt. Ein Beispiel für die Bestimmung des prozentualen Anteils an zytokinproduzierenden Zellen befindet sich im Anhang, Abbildung 10.5.

### 2.2.9. Endotoxinentfernung

Damit eine Aktivierung der T Zellen in den antigenspezifischen Kokulturen auf das OVA und nicht auf darin enthaltenes Endotoxin zurückgeführt werden konnte, wurde das OVA für die *in vitro* Versuche vor Gebrauch über ein Detoxi-Gel der Firma Thermo Scientific von Endotoxin befreit. Dieses Gel enthielt immobilisiertes Polymyxin B, welches an die Lipid A Kette von Lipopolysacchariden bindet.

Zur Endotoxinentfernung aus Volumina größer 1 ml wurde zunächst Detoxi-Gel als Adsorbens in eine Einmal-Polypropylensäule gegossen. Die Durchführung ist im Folgenden erläutert:

Zur Vorbereitung des Adsorbens wurden die Gel- und die wässrige Phase des Detoxi-Gels bei RT durch kräftiges Schütteln homogenisiert und für 15 Min. ebenso wie pyrogenfreies Wasser im Ultraschallbad entgast. Vor dem eigentlichen Gießen wurde das abgesetzte Gel vorsichtig mit einer Pipette wieder mit dem enthaltenen Wasser vermischt. Die Säule war zunächst am unteren Ende verschlossen. 12 ml des entgasten pyrogenfreien Wassers wurden in die Säule gefüllt und eine durchlässige Polypropylenscheibe mit Hilfe des Serumabscheiders, ohne Luftblasen einzuschließen, so tief wie möglich in der Säule platziert. Das Wasser wurde bis zur Polypropylenscheibe abgelassen und durch 10 ml Gel-Wasser-Gemisch ersetzt. Nach 30 Min. hatte sich das Gel gesetzt. Als das benötigte Bettvolumen erreicht war (Berechnung mit der Formel:  $V = r^2 \times \pi \times h$ ;  $V =$  Bettvolumen,  $r =$  innerer Radius der Polypropylensäule,  $h =$  Höhe des Gelbetts), wurde eine weitere durchlässige Polypropylenscheibe in der Säule ca. 1 cm oberhalb des Gels platziert.

Zur Verwendung musste die Säule zunächst regeneriert werden. Hierfür wurde das Gel mit dem 5-fachen Bettvolumen einer 1% Deoxycholat-Lösung gespült, welches durch fünf weitere Bettvolumina des pyrogenfreien Wassers wieder entfernt wurde. Zum Äquilibrieren folgte das Waschen mit dem 5-fachen Säulenvolumen an PBS. Das Probenvolumen sollte bis maximal 10% Abweichung mit dem Bettvolumen übereinstimmen. Dieses Probenvolumen wurde auf die Säule aufgetragen und dort für mindestens eine Stunde inkubiert. Zum Eluieren wurde PBS verwendet. Der erste Milliliter wurde verworfen, die folgenden 8 ml enthielten die Probe. Da Verluste des Proteins auftraten, empfahl sich im Anschluss eine Proteinbestimmung. Die Säule wurde mit Deoxycholat regeneriert und in 25% Ethanol bei 4°C gelagert.

### 2.2.10. Endotoxinbestimmung

Zur Bestimmung des Endotoxingehalts im wässrigen Pollenextrakt und im *in vivo* und *in vitro* eingesetzten OVA wurde das Analysekit Limulus Amebocyte Lysate (LAL) QCL-1000 der Firma

Lonza verwendet und anhand des Herstellerprotokolls durchgeführt. Mit dem LAL-Test wurde Gram-negatives Endotoxin quantifiziert. Hierbei wurde ein im LAL enthaltenes Proenzym durch das Endotoxin aktiviert, welches dann von einem synthetischen Substrat proportional zum LPS-Gehalt der Probe p-Nitroanilin abspaltete. Dieses bewirkte eine gelbliche Färbung der Testlösung anhand derer das LPS photometrisch quantifiziert werden konnte.

Das *E. coli* Endotoxin, welches als Standard diente, wurde in 1 ml angewärmtem, pyrogen- und endotoxinfreiem Wasser gelöst und für 15 Min. zum vollständigen Lösen stark geschüttelt. Anschließend wurde der Standard beginnend mit einer Konzentration von 1 EU/ml (EU: Endotoxin Unit, 1 EU = 100 pg) mit pyrogen- und endotoxinfreiem Wasser in pyrogenfreien Röhrchen 5× verdünnt. Das chromogene Substrat und das LAL wurden nach Herstellerangaben in pyrogen- und endotoxinfreiem Wasser gelöst und auf 37°C vorgewärmt.

Die Proben, Standards und Blindwerte wurden entsprechend des Protokolls in die Vertiefungen einer sterilen und pyrogenfreien 96-Loch Flachbodenplatte von NUNC gegeben und für 1 Minute abgedeckt im Inkubator auf 37°C angewärmt. Anschließend wurden das LAL und das Substrat im konstanten Zeitabstand zu den Proben pipettiert. Die Reaktion wurde mit einer 10% SDS-Lösung abgestoppt. Die Absorption der Lösung wurde bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 405 - 410$  nm im Mikrotiterplatten-Photometer bestimmt.

Die Endotoxinkonzentration von *Bet.*-APE und von OVA V (*in vivo* verwendet) und OVA VI (*in vitro* verwendet) befinden sich im Anhang in Kapitel 10.3 Tabelle 10.1.

### **2.2.11. Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)**

Die in dieser Arbeit angewandten ELISA basierten zum einen auf der Sandwich ELISA Technik und zum anderen auf der indirekten ELISA Technik (siehe Abbildung 2.1). Beim Sandwich ELISA wurde zunächst ein *Coating* Antikörper an eine meist speziell beschichtete Mikrotiterplatte gebunden, an die die Antigene der Probenlösung binden konnten. Mit Hilfe des indirekten ELISA wurden Immunglobulin-Antikörper in der Probenlösung nachgewiesen. Dafür wurden die speziellen Mikrotiterplatten mit Ovalbumin als Antigen beschichtet, an das die aus der Probenlösung zu detektierenden Antikörper binden konnten. Beim Sandwich ELISA band im nächsten Schritt ein biotinylierter Detektionsantikörper an ein anderes Epitop als der *Coating* Antikörper. Beim indirekten ELISA band der sekundäre Antikörper die zu detektierende Antikörperklasse. Im nächsten Schritt wurde bei beiden ELISA Techniken das biotinbindende Streptavidin, welches an ein substratspaltendes Enzym gekoppelt war, hinzugegeben. In einem bestimmten Detektionsbereich verhielt sich die Umsetzung des Substrats zu dem chromogenen Derivat, welches in einem Mikrotiterplatten-Photometer detektiert werden konnte, proportional zum detektierten Antigen und konnte mit Hilfe eines Standards quantifiziert werden.



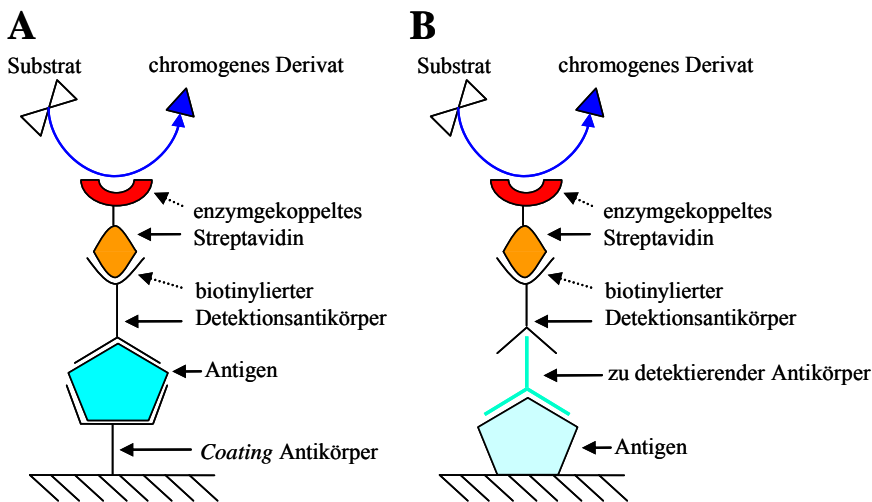


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Wirkungsweise eines A) Sandwich-ELISA und B) indirekten ELISA

### 2.2.11.1. Zytokinbestimmungen

Alle Zytokin-ELISA stammten von der Firma BD Biosciences und gehörten in die Gruppe der BD OptEIA™ Sets. Einzige Ausnahmen stellten der IL-13 und IFN- $\alpha$  ELISA dar. Der Maus IL-13 CytoSet ELISA wurde von der Firma Invitrogen bezogen. Die Durchführung der ELISA erfolgte nach den Herstellerprotokollen.

Die Durchführung der BD OptEIA™ Sets begann mit dem Auftragen von je 50  $\mu$ l des in *Coating*-Puffer 1:250 verdünnten *Capture* Antikörpers pro Vertiefung einer NUNC MaxiSorp 96-Loch Rundbodenplatte. Nach der Inkubation über Nacht bei 4°C wurden die Platten mit Zytokin-ELISA Waschpuffer dreimal gewaschen. Im Anschluss wurden für 1 h bei RT mit 200  $\mu$ l des Verdünnungspuffers unspezifische Bindungsstellen blockiert. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden nach einer zuvor erstellten Vorlage je 50  $\mu$ l der Proben und die in Tabelle 2.8 aufgeführten Standardkonzentrationen, sowie Blindwerte als Doppelwerte aufgetragen und für 2 h bei RT inkubiert. Anschließend wurden fünf Waschschrritte durchgeführt, gefolgt von der Zugabe von 50  $\mu$ l des jeweils 1:250 verdünnten Detektionsantikörpers gemischt mit der Enzymlösung. Nach einer einstündigen Inkubationszeit bei RT wurde achtmal gewaschen. Danach wurden zu 10,9 ml Citrat-Puffer 5,1  $\mu$ l kaltes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie 110  $\mu$ l Substratlösung gegeben und davon sofort jeweils 100  $\mu$ l pro Vertiefung aufgetragen. Wies der niedrigste Standard eine leicht dunklere Färbung als der Blindwert auf, wurde die enzymatische Reaktion mit je 50  $\mu$ l 2 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption im Mikrotiterplatten Photometer bei 450 nm bestimmt.

Bei dem Invitrogen CytoSet IL-13 ELISA ergaben sich für die Durchführung folgende Abweichungen. Der *Capture* Antikörper wurde 1:500 verdünnt. Nach dem Auftragen der Proben wurden sofort 25  $\mu$ l des Detektionsantikörpers in einer 1:250 Verdünnung zugegeben. Die Streptavidin-Horseradish-Peroxidase-Enzymlösung wurde im Anschluss in einer 1:1500

Verdünnung für 30 Min. aufgetragen. Alle weiteren Wasch- und Inkubationsschritte blieben identisch.

Die Puffer und Lösungen sind in Kapitel 2.1.4 aufgeführt.

**Tabelle 2.8 Übersicht über die eingesetzten Standardkonzentrationen und die Assay Range der Zytokin-ELISA**

<b>ELISA</b>	<b>Assay Range</b>	<b>Standardkonzentrationen</b>	<b>Anzahl an Standards</b>
IFN- $\gamma$	31,3 – 2000 pg/ ml	15,6 – 2000 pg/ ml	8
IL-4	7,8 – 500 pg/ ml	3,9 – 500 pg/ ml	8
IL-5	15,6 – 1000 pg/ ml	7,8 – 1000 pg/ ml	8
IL-6	15,6 – 1000 pg/ ml	7,8 – 1000 pg/ ml	8
IL-10	31,3 – 2000 pg/ ml	15,6 – 2000 pg/ ml	8
IL-12p70	62,5 – 4000 pg/ ml	15,6 – 8000 pg/ ml	10
IL-13	7,8 – 500 pg/ ml	3,9 – 1000 pg/ ml	9

Die Messungen des IFN- $\alpha$  ELISA wurden von Cornelia Wagner beim Bavarian Nordic Unternehmen in München-Martinsried durchgeführt.

### **2.2.11.2. Immunglobulinbestimmungen**

Die Bestimmung von Ovalbumin spezifischen Immunglobulinen erfolgte anhand der indirekten ELISA-Technik. Hierfür wurden die NUNC MaxiSorp 96-Loch Rundbodenplatten mit Ovalbumin Klasse V von SIGMA beschichtet. Für die Detektion von OVA spez. IgG1 wurden jeweils 100  $\mu$ l einer 1  $\mu$ g/ml OVA-Lösung, für OVA spez. IgE 100  $\mu$ l einer 10  $\mu$ g/ml OVA-Lösung pro Vertiefung aufgetragen. Nach einer zweistündigen Inkubation bei RT wurden die Platten dreimal mit dem Immunglobulin-ELISA Waschpuffer gewaschen. Im nächsten Schritt wurde für 2 h bei RT eine 3% BSA (bovines Serumalbumin)-Lösung in die Vertiefungen gegeben, um unspezifische Bindungen an der Plattenoberfläche zu reduzieren. Nach drei weiteren Waschschrritten wurden 50  $\mu$ l der Serumproben in den entsprechenden Verdünnungen (siehe Tabelle 2.9) und die Standards in den entsprechenden Konzentrationen (siehe Tabelle 2.10), sowie die Blindproben nach einem zuvor erstellten Schema als Doppelwerte aufgetragen und über Nacht bei 4°C inkubiert. Beim OVA spez. IgG1-ELISA wurden die Proben der Tage 42, 53 und 60 bei Bedarf auch in einer 1:10<sup>6</sup>-Verdünnung gemessen. Dann wurden die Vertiefungen viermal gewaschen. Als sekundärer Antikörper wurden 50  $\mu$ l des 1:400 im Immunglobulin-ELISA-Verdünnungspuffer verdünnten Biotin Anti-Maus IgG1 bzw. Biotin Anti-Maus IgE appliziert und 2 h bei RT inkubiert. Nach weiteren vier Waschschrritten wurden 50  $\mu$ l der 1:1000 in Immunglobulin-ELISA-Verdünnungspuffer verdünnter Streptavidin-Peroxidase aufgetragen, 30 Min. im Dunkeln bei RT inkubiert und achtmal gewaschen. Danach wurden zu 10,9 ml Citrat-Puffer 5,1  $\mu$ l kaltes H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> sowie 110  $\mu$ l Substratlösung gegeben und davon

sofort jeweils 100 µl pro Vertiefung pipettiert. Wies der niedrigste Standard eine leicht dunklere Färbung als der Blindwert auf, wurde die enzymatische Reaktion mit je 50 µl einer 2 M Schwefelsäure gestoppt und die Absorption im Mikrotiterplatten Photometer bei 450 nm bestimmt.

**Tabelle 2.9 Übersicht der Probenverdünnungen der Immunglobulin-ELISA**

ELISA	Tag der Serumnahme	Probenverdünnungen
OVA spez. IgG1	d0; d14	1:100; 1:200; 1:10 <sup>3</sup>
	d28	1:10 <sup>3</sup> ; 1:10 <sup>4</sup> ; 1:10 <sup>5</sup>
	d42; d53; d60	1:10 <sup>3</sup> ; 1:10 <sup>4</sup> ; 1:10 <sup>5</sup> ; (1:10 <sup>6</sup> )
OVA spez. IgE	d0	1:10
	d53; d60	1:10; 1:100

**Tabelle 2.10 Übersicht der eingesetzten Standards der Immunglobulin-ELISA**

ELISA	Standard	Standardkonzentrationen	Anzahl Standards
OVA spez. IgG1	Monoklonales Anti-Hühnerei Albumin IgG1, Klon OVA 14	0,49 – 250 ng/ml	10
	Maus Anti-Ovalbumin IgE	3,9 – 1000 ng/ml	9

### 2.2.11.3. Test auf Mykoplasmen

Die verwendeten Hybridome DN32.D3 und HB-12538 wurden auf eine Mykoplasmenkontamination getestet, um eine Beeinflussung der Ergebnisse durch eine Kontamination mit Mykoplasmen auszuschließen. Hierfür wurde das *Mycoplasma Detection Kit* der Firma Roche verwendet und gemäß dem Herstellerprotokoll angewendet. Der Test basierte auf der Sandwich-ELISA Technik und ermöglichte die Detektion der vier am häufigsten vorkommenden Mykoplasmen Spezies *M. arginini*, *M. hyorhinitis*, *A. laidlawii* und *M. orale*. Zur Detektion wurde das Substrat 4-Nitrophenylphosphat von Streptavidin-alkalischer Phosphatase zu 4-Nitrophenol umgesetzt und dieses im Mikrotiterplatten-Photometer bei einer Wellenlänge von  $\lambda = 405$  nm detektiert.

Zu beachten war, dass 2 ml der Probenlösungen vor dem Auftragen mit 500 µl des bereitgestellten Probenpuffers versetzt werden mussten. Als Negativkontrolle diente das entsprechende Zellkulturmedium. Die positiven Kontrollen waren im Kit enthalten.

Die in dieser Arbeit verwendeten Hybridome DN32.D3 und HB-12538 waren nicht mit den getesteten Mykoplasmen kontaminiert (siehe Anhang Kapitel 10.3 Abbildung 10.7).

### 2.2.12. Aufreinigung des Anti-IL-10 Rezeptor Antikörpers

Das von der American Type Culture Collection bezogene Hybridom HB-12538 (Klon 1B1.3a) produzierte den monoklonalen Antikörper  $\alpha$ -IL-10 Rezeptor in seiner stationären Wachstumsphase und sekretierte ihn ins Zellkulturmedium. Um eine Aufreinigung des Antikörpers nach Kultivierung durchzuführen, sollte das verwendete Zellkulturmedium möglichst frei von weiteren Proteinen sein. Hierfür wurde dem Hybridom zunächst schrittweise das FCS bis zu einer Konzentration von 0,5% entzogen. Die Kultivierung erfolgte in basalem Hybridoma-Medium (siehe Kapitel 2.1.5). Nach Erreichen der niedrigen FCS-Konzentration wurde das Hybridom ohne Mediumwechsel bis zum Tod der Zellen für ca. 3 Wochen bei 37°C, 5% CO<sub>2</sub> kultiviert. Der Antikörper wurde nach dem Abzentrifugieren der Zellen aus dem Zellkulturüberstand über eine Protein G Säule durch Elution mittels eines Citratpuffers, pH 2,7 aufgereinigt und gegen PBS dialysiert. Schließlich folgte eine 30 kDa Ausschlusszentrifugation zum Aufkonzentrieren des Antikörpers. Die Antikörperlösung wurde durch einen 0,22  $\mu$ m Spritzenfilter sterilfiltriert und war nach Konzentrationsbestimmung gebrauchsfertig.

Die Aufreinigung des Antikörpers wurde von Frau Dr. E. Kremmer in der Serviceeinheit Monoklonale Antikörper am Institut für Molekulare Immunologie am Helmholtz Zentrum München durchgeführt.

### 2.2.13. Protokoll zur *in vivo* Immuntherapie

Das Protokoll zur IT bei Mäusen wurde von Vissers et al. [331] für Mäuse auf C57BL/6 Hintergrund adaptiert.

Das Schema der IT ist in Abbildung 2.2 veranschaulicht. Zunächst wurden die Mäuse durch vier intraperitoneale Injektionen von 10  $\mu$ g Ovalbumin (OVA) Klasse V adsorbiert an 2,5 mg Aluminiumhydroxid in PBS entsprechend dem Herstellerprotokoll für Imject Alum Adjuvant (Thermo Scientific) zu den Zeitpunkten Tag 0, 7, 14 und 28 auf OVA sensibilisiert. Zwei Wochen nach der letzten Injektion erhielten die Tiere eine Hochdosis-IT von drei subkutanen Injektionen in die Nackenfalte à 1 mg OVA bzw. BSA oder ausschließlich 200  $\mu$ l PBS als Kontrolle an alternierenden Tagen. Nach einer weiteren Woche wurden die Mäuse dreimal im Abstand von je drei Tagen durch ein mit einem Pari Vernebler erzeugtes Aerosol einer 1% OVA-Lösung in PBS für je 20 Min. mit OVA provoziert. Bei der Analyse des Einflusses von verbleibendem IL-10 in IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäusen wurde diesen Tieren 300  $\mu$ g eines IL-10 Rezeptor blockierenden monoklonalen Antikörpers in 300  $\mu$ l 1 h vor der ersten subkutanen IT-Injektion und ebenfalls 1 h vor der ersten OVA-Aerosol Provokation intraperitoneal gespritzt. Der Antikörper wurde aus dem Zellkulturüberstand des Hybridoms HB-12538 isoliert (vgl. Kapitel 2.2.12). Die Kontrollgruppe erhielt 300  $\mu$ g eines Ratten IgG Antikörpers.

Die Blutentnahme von ca. 100  $\mu$ l zur Serumgewinnung erfolgte durch Punktion des retrobulbären Venenplexus an Tag 0, 14, 28, 42, 53 und 60 (siehe Abbildung 2.2).

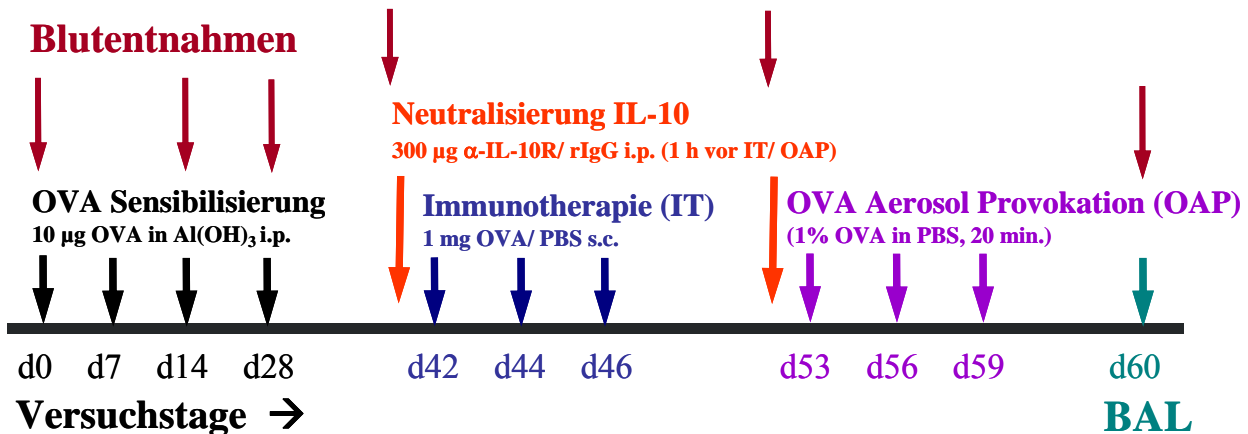


Abbildung 2.2 Schema zum Ablauf der Immuntherapie

Die Mäuse wurden in einem spezifizierten, pathogenfreien (SPF-) Tierstall gehalten. Die Käfige befanden sich in einem individuell belüfteten Ventirack VRClassic des Unternehmens BioZone. Pro Käfig wurden vier bis fünf Mäuse gehalten. Diese hatten Zugang zu Futter und Wasser ad libitum. Die Versuche wurden sowohl mit Weibchen als auch Männchen im Alter von 6 bis 12 Wochen bei Versuchsbeginn durchgeführt.

#### 2.2.14. DNA-Isolierung aus Gewebe

Die ca. 0,5 cm langen Schwanzenden wurden in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit je 500 µl Lyse-Puffer (siehe Kapitel 2.1.4), der Proteinase K (200 µg/ml) enthielt, bei 55°C und 40 % Rotation im Heizschüttler HLC BlockThermostate HTM 130 LP über Nacht inkubiert. Proteinase K wurde erst bei Gebrauch zugegeben. Es stellte sowohl eine Endo- als auch Exopeptidase dar und baute durch Spaltung von Peptidbindungen Proteine ab, wodurch die Freisetzung von Nukleinsäuren begünstigt wurde. Nun wurden die Proben bei 12.000×g für 8 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß transferiert und mit dem gleichen Volumen, hier 500 µl, Isopropanol versetzt. Durch Schwenken des Gefäßes wurde die ausfallende DNA sichtbar. Die Proben wurden nochmals bei 12.000×g für 5 Min. zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 1 ml 70% Ethanol durch Schwenken des Reaktionsgefäßes gewaschen. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 12.000×g für 5 Min. wurde der Überstand abgenommen und das DNA-Pellet für 15 Min. luftgetrocknet. Es war zu beachten, dass kein Ethanol im Gefäß verblieb. Schließlich wurden 100 µl TE-Puffer (siehe Kapitel 2.1.4) auf das Pellet geben und bei 55°C für mindestens 1 h inkubiert, um die DNA zu lösen. Nun wurde die DNA resuspendiert und bei -20°C gelagert.

### 2.2.15. Polymerase Kettenreaktion zur Klassifizierung der konditionellen *knock out* Mäuse

Die PCR ist eine Methode zur Amplifizierung von DNA-Sequenzen. Im ersten Schritt wurde die DNA bei 95°C im Thermocycler denaturiert, damit sie sich in ihre Einzelstränge zerlegt. Im zweiten Schritt konnten sich die Primer bei einer für sie ermittelten optimalen Temperatur anlagern und im dritten Schritt wurde die DNA von der DNA-Polymerase bei 72°C aufgebaut. Dieser Zyklus wurde 34 Mal wiederholt, wodurch sich die Anzahl an DNA-Fragmenten exponentiell erhöhte. Nach Abschluss der Zyklen wurden die Reaktionsansätze bei 4°C im Thermocycler bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt (siehe Abbildung 2.3).

Zur Klassifizierung der konditionellen *knock out* Mäuse IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> und IL-10<sup>FL/FL</sup> Cre<sup>-</sup> wurden zwei Polymerase Kettenreaktionen (PCR) pro Maus angesetzt. Mit dem ersten Primer-Paar (siehe Kapitel 2.1.7) wurde kontrolliert, ob das IL-10-Gen weiterhin mit der LoxP-Sequenz flankiert war. Das PCR-Produkt, das aus der Amplifikation des LoxP-flankierten Gens resultierte, hatte im Gegensatz zum Wildtyp-Allel mit 480 bp eine Größe von 514 bp. Die zweite PCR diente zum Nachweis des für die Cre-Rekombinase kodierenden Gens im Maus-Genom. Bei Expression der Cre-Rekombinase wurde das LoxP-flankierte Gen von diesem Enzym herausgeschnitten. Da die Cre-Rekombinase in diesen Mäusen unter CD4 regulatorischen Elementen exprimiert wurde, waren in allen Zellen dieser Mäuse, die in ihrer Entwicklung ein CD4<sup>+</sup> Stadium durchlaufen hatten, die IL-10 Gene herausgeschnitten, so dass in diesen Zellen kein IL-10 synthetisiert werden konnte.

Ein PCR-Ansatz setzte sich wie folgt zusammen:

Reagenzien	Endkonzentration	Volumen
PCR-Puffer		5 µl
MgCl <sub>2</sub>	2 mM	4 µl
dNTP-Mix	0,2 mM	1 µl
Primer forward	0,4 µM	0,2 µl
Primer reverse	0,4 µM	0,2 µl
GoTaq Polymerase	2,5 units	0,5 µl
RNase und DNase freies H <sub>2</sub> O		36,1 µl
Proben-DNA		3 µl
Gesamtansatz		Σ 50 µl

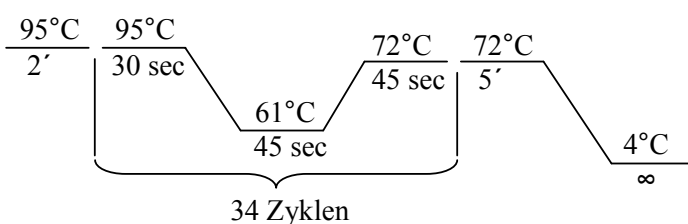


Abbildung 2.3 Temperatur- und Zeitverlauf der PCR

15 µl des Reaktionsansatzes wurden mit 2 µl Gel-Lade-Puffer versetzt und auf ein 1,8% Agarose-Gel in Tris-Borate-EDTA (TBE)-Puffer aufgetragen. Die DNA-Fragmente wurden bei 135 V für 40 Min. mit einer i-Mupid Mini Agarose Gelelektrophorese aufgetrennt und nach 30 Min. im Ethidiumbromid-Färbebad im BioRAD Gel Doc 1000 von Bio-RAD Laboratories visualisiert. Zur Detektion der Fragmentgrößen wurden 2 µl einer 100 bp DNA-Leiter von Invitrogen auf jedem Gel mitgeführt.

### **2.2.16. Bronchoalveoläre Lavage (BAL)**

Mit Hilfe einer bronchoalveolären Lavage (BAL) wurden die sich in den Bronchien und Alveolen befindenden Zellen herausgespült. Eine Zelldifferenzierung der sich in der BAL-Flüssigkeit (BALF) befindenden Immunzellen gab Aufschluss über eine mögliche Entzündung der Lunge. Vorbereitend für die BAL wurden die Tiere mit 500 µl Narkosemittel i.p. anästhesiert. Die Trachea und der Brustkorb der Maus wurden freigelegt und das Zwerchfell entfernt. Die Trachea wurde kanüliert, worüber fünfmal mit je 0,8 ml PBS die Bronchien und Alveolen gespült wurden. Die ersten 0,8 ml der BALF wurden für 10 Min. bei 1000 rpm zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde zur Analyse von IL-5 und IL-13 (siehe Kapitel 2.2.11.1) verwendet. Die verbleibende BALF wurde zu den bereits pelletierten Zellen gegeben und abermals zentrifugiert. Die Gesamtzellzahl wurde nach dem Pelletieren des gesamten BALF und Resuspendieren in RPMI 1640 mit 5% FCS durch Zellzählung mit Ausschluss von toten Zellen durch Trypanblau (siehe Kapitel 2.2.1) bestimmt.

### **2.2.17. Zelldifferenzierung der BAL**

Für die Zelldifferenzierung der BAL wurden mit einer Shandon Cytospin Zytozentrifuge bei 400 rpm für 10 Min. 150 µl einer auf ca.  $5 \times 10^5$  Zellen/ml eingestellten BAL Zellsuspension auf einen definierten Bereich eines Objektträgers (OT) aufgebracht. Überschüssige Flüssigkeit wurde durch einen eingelegten Filter aufgenommen. Nach dem Trocknen der Proben über Nacht bei RT wurden die Zellen mit dem Diff-Quick Färbeset von Dade Behring angefärbt. Hierfür wurden die Zellen auf den OT zunächst für 1,5 Min. fixiert und sofort in Färbelösung I transferiert. Nach einer zweiminütigen Inkubation wurden die OT von Färbelösung I für 2,5 Min. in Färbelösung II gegeben. Es folgte ein gründliches Spülen mit Leitungswasser. Die OT trockneten an der Luft und wurden dann mit Entellan der Firma Merck eingedeckelt.

Für die Zelldifferenzierung wurden mikroskopisch insgesamt mindestens 400 Zellen pro Tier ausgezählt. Die Proben wurden hierbei verblindet analysiert. Es wurden neutrophile und eosinophile Granulozyten, sowie Makrophagen und Lymphozyten unterschieden [75].

## **2.2.18. Histologische Analysen**

### ***2.2.18.1. Einbettung und Schnitte***

Die Lungen wurden nach der BAL entnommen und in einer 4% Formaldehyd-Lösung fixiert. Formaldehyd bewirkt durch Methylenbrückenbildung zwischen freien Aminosäuren eine Vernetzung der Proteine und verhindert die enzymatische Zersetzung des Gewebes. Im Anschluss an die Fixierung wurden die Lappen der Lungenflügel mit einem Skalpell je nach Größe in ein oder zwei Segmente quer zerteilt, in eine Histosette I gegeben und über Nacht automatisch mittels einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und über Xylol in Paraffin überführt. Die Lungen wurden nun an einem Einbettautomaten in Paraffin mit den Schnittflächen nach außen eingebettet und am Mikrotom in 3 µm dicke Schnitte auf Objektträger aufgezogen.

Die Entwässerung wurde vom Institut für Pathologie des Helmholtz Zentrums München übernommen, wo auch die Benutzung des Einbettautomaten und des Mikrotoms möglich waren.

### ***2.2.18.2. Histologische Übersichtsfärbungen***

Zur Vorbereitung wurde das Paraffin der Schnitte auf den OT zunächst durch die Inkubation im Wärmeschrank bei 60°C für mindestens 30 Min. verflüssigt. Zum Entparaffinieren wurden die Schnitte in der absteigenden Alkoholreihe für jeweils mind. 10 Min. zweimal in Xylol, zweimal in 96 % Ethanol, zweimal in 80 % Ethanol und zweimal in 70% Ethanol inkubiert. Es folgte die Färbung der Schnitte.

#### Hämalaun-Eosin (HE-) Färbung

Nach der Entnahme der Schnitte aus 70% Ethanol wurden sie kurz mit Leitungswasser gespült. Die Kerne wurden mit 50 – 60°C warmen Hämalaun nach P. Mayer (siehe Kapitel 2.1.4) für ca. 10 Min. gefärbt und dann mit Leitungswasser für mind. 10 Min. gespült und dabei gebläut. Nun wurde das Zytoplasma 5 Min. mit einer 1 % wässrigen Eosin-Lösung angefärbt. Nach kurzem Spülen mit Leitungswasser und kurzem Schwenken in 96 – 100 % Ethanol und Xylol wurden die Schnitte im feuchten Zustand mit Entellan eingedeckelt.

#### Paraosanilin-Acid-Schiffsches Reagenz (PAS-) Färbung

Mit der PAS-Färbung wurden neutrale Mukopolysaccharide und die Basalmembran pink angefärbt. Nach der Entnahme der Schnitte aus 70% Ethanol wurden sie kurz in Aqua dest. gegeben und dann in 0,5 % Periodsäurelösung für 10 Min. inkubiert. Es war zu beachten, dass die mehrfach verwendbare Periodsäurelösung farblos war. Die Schnitte wurden 5 Min. unter Leitungswasser gespült und vor dem Transferieren ins Schiffsche Reagenz mit Aqua dest. abgespült. Das Schiffsche Reagenz wirkte 10 Min. ein, gefolgt von 10 bis 30 Min. Spülen mit Leitungswasser. Vor dem Färben der Zellkerne für 4 Min. im 50 – 60 °C warmen Hämalaun wurden die Schnitte in Aqua dest. gegeben. Nach 10-minütigem Bläuen der Schnitte mit Leitungswasser, gefolgt von der



aufsteigenden Alkoholreihe mit je 10 Min. 70 % Ethanol, 80 % Ethanol und 96 % Ethanol sowie zweimal 5 Min. in Xylol, wurden die Schnitte im feuchten Zustand mit Entellan eingedeckelt.

### **2.2.19. Statistische Analyse**

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte unter Verwendung der Software „GraphPad Prism 5“. Bei Experimenten, in denen mehr als zwei Gruppen miteinander verglichen wurden, wurde der One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test angewendet. Im Falle eines Vergleichs von mehr als zwei Gruppen mit mehr als einem variablen Parameter wurde der Two-Way ANOVA mit einem Bonferroni Post Hoc Test angewendet. Bei der statistischen Untersuchung von zwei Gruppen erfolgte eine Analyse mit dem Student's T Test. p-Werte  $<0,05$  wurden als signifikanter Unterschied bewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Beeinflussung der Interaktion von Dendritischen Zellen und T Zellen durch Pollenbestandteile in der allergischen Immunantwort

##### 3.1.1. Funktionelle und phänotypische Veränderung von murinen DC Subtypen durch *Bet.*-APE und ausgewählten PALMs

###### 3.1.1.1. Einfluss von *Bet.*-APE und $PPE_1$ auf pDC

Da pDC eine mögliche Rolle bei der Toleranzinduktion zugeschrieben wird und sie eine der Hauptquellen von Typ I Interferonen darstellen, wurde untersucht, ob die Sekretion von IFN- $\alpha$  aus pDC durch Pollenbestandteile modifiziert wird. Hierfür wurde die Wirkung von wässrigem Birkenpollenextrakt oder von dem Pollen assoziierten Lipid Mediator Phytoprostan E<sub>1</sub> ( $PPE_1$ ) auf pDC durch *in vitro* Stimulation der Zellen analysiert.

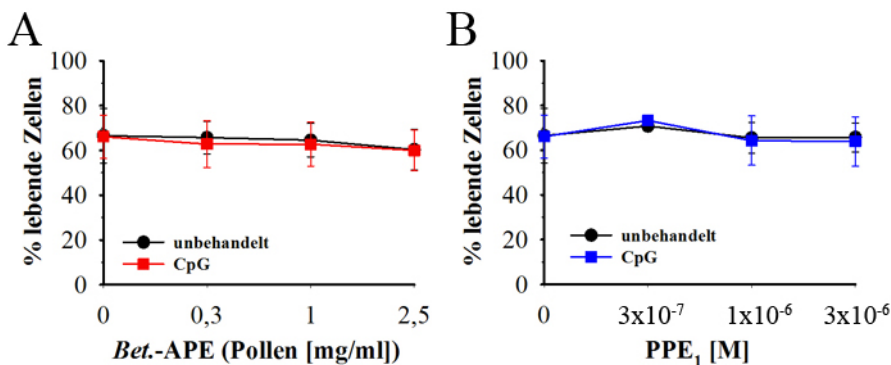


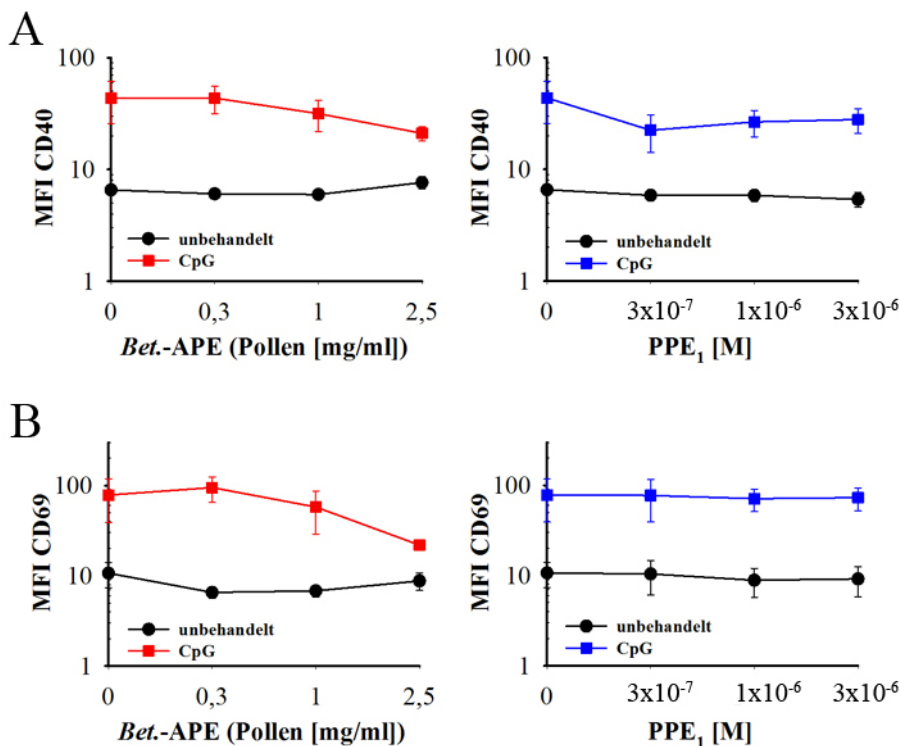
Abbildung 3.1 Toxizität von *Bet.*-APE bzw.  $PPE_1$  auf BALB/c pDC

Durchflusszytometrische Messung des prozentualen Anteils an lebenden Zellen anhand von PI-Färbung der *in vitro* für 20 h stimulierten pDC. pDC stimuliert mit steigenden Konzentrationen von *Bet.*-APE (A) oder  $PPE_1$  (B), schwarzer Graph: Zellen unbehandelt = nicht aktiviert, in Medium inkubiert; roter Graph (A)/ blauer Graph (B): Zellen mit CpG2216 aktiviert. Die gezeigten Daten spiegeln den Mittelwert von drei unabhängig durchgeführten Experimenten mit dem entsprechenden SEM wider. Für  $3 \times 10^{-7}$  M  $PPE_1$  existiert nur ein Einzelwert. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test und ergab für alle Daten keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

Um zunächst eine toxische Wirkung der Substanzen in den getesteten Konzentrationen auszuschließen, wurden die Zellen nach Stimulation mit Propidiumiodid (PI) angefärbt und im Durchflusszytometer der Anteil an lebenden Zellen bestimmt. In Abbildung 3.1 A und B wird

deutlich, dass sich weder der wässrige Pollenextrakt noch das PPE<sub>1</sub> in den getesteten Konzentrationen mit und ohne Aktivierung durch den TLR9-Ligand CpG 2216 toxisch auf die Zellen auswirkte.

Zur Analyse des Maturationsstatus der pDC nach Stimulation mit dem wässrigen Pollenextrakt (Abbildung 3.2 linke Spalte) oder dem PPE<sub>1</sub> (Abbildung 3.2 rechte Spalte) wurde die Expression der frühen Aktivierungsmarker CD40 (Abbildung 3.2 A) und CD69 (Abbildung 3.2 B) auf den pDC durchflusszytometrisch untersucht.

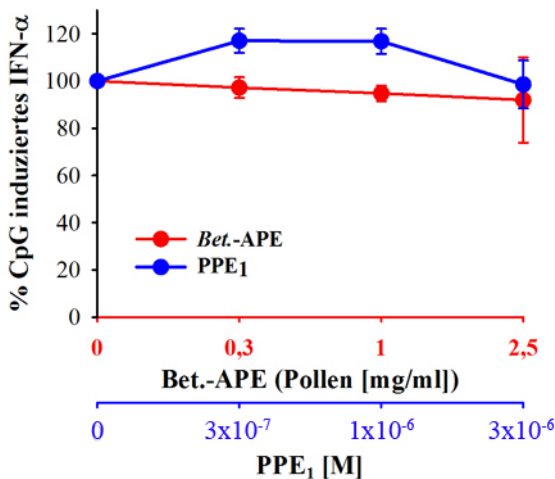


**Abbildung 3.2** Expression von Oberflächenmarkern auf BALB/c pDC in Abhängigkeit von *Bet.*-APE bzw. PPE<sub>1</sub>

Durchflusszytometrische Messung der Expression von CD40 (A) und CD69 (B) auf *in vitro* für 20 h stimulierten pDC, dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). pDC stimuliert mit steigenden Konzentrationen von *Bet.*-APE (linke Spalte), PPE<sub>1</sub> (rechte Spalte); schwarzer Graph: Zellen unbehandelt = nicht aktiviert, in Medium inkubiert; roter Graph/ blauer Graph: Zellen mit CpG 2216 aktiviert. Die gezeigten Daten stellen den Mittelwert aus mindestens zwei Experimenten mit dem jeweiligen SEM dar. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test und ergab für alle Daten keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

Es zeigten sich weder bei der CD40-Expression noch bei der CD69-Expression signifikante Unterschiede im Maturationsgrad der pDC nach Inkubation mit *Bet.*-APE oder PPE<sub>1</sub> im Vergleich zu den unbehandelten Proben. Die Aktivierung mit CpG 2216 führte zum erwarteten Anstieg der Expression der beiden Aktivierungsmarker, jedoch wird diese durch die analysierten Substanzen nicht signifikant moduliert.

Wie in Abbildung 3.3 dargestellt ist, wurde weder durch den wässrigen Pollenextrakt noch durch das darin enthaltene PPE<sub>1</sub> eine signifikante Modulation der CpG 2216 induzierten IFN- $\alpha$ -Produktion von pDC bewirkt (absolute Daten siehe Kapitel 10.1 Datenanhang). Nicht aktivierte pDC zeigten ebenfalls nach Stimulation mit PPE<sub>1</sub> oder *Bet.*-APE keine Modulation der IFN- $\alpha$  Sekretion im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen.

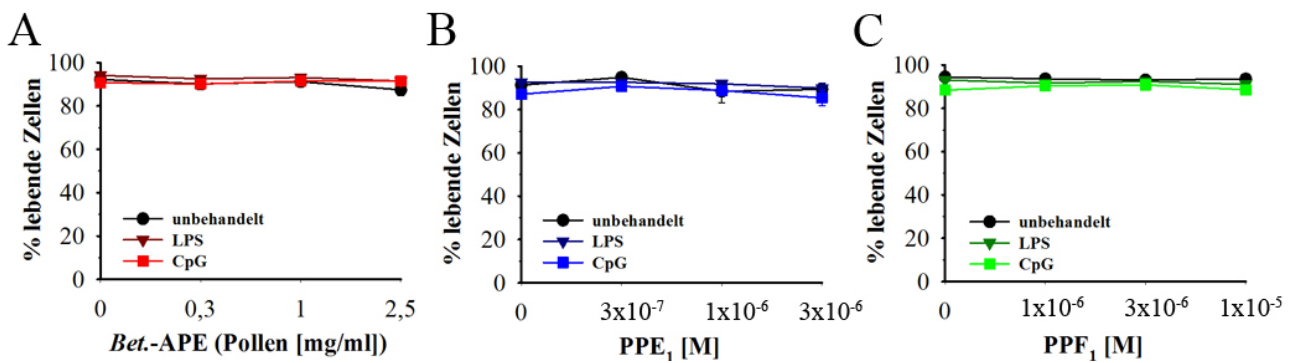


**Abbildung 3.3 Einfluss von *Bet.*-APE bzw. PPE<sub>1</sub> auf die Sekretion von CpG 2216 induziertem IFN- $\alpha$  aus BALB/c pDC**

pDC wurden an d8 für 20 h mit CpG 2216 aktiviert und zeitgleich entweder mit *Bet.*-APE oder PPE<sub>1</sub> in steigender Konzentration stimuliert. Die Daten sind normiert als prozentualer Anteil an CpG induziertem IFN- $\alpha$  dargestellt und zeigen den Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten mit dem entsprechenden SEM. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test und ergab für alle Daten nicht signifikante Unterschiede ( $p > 0,05$ ). IFN- $\alpha$  wurde mittels ELISA detektiert.

### 3.1.1.2. Einfluss von *Bet.*-APE, PPE<sub>1</sub> und PPF<sub>1</sub> auf cDC

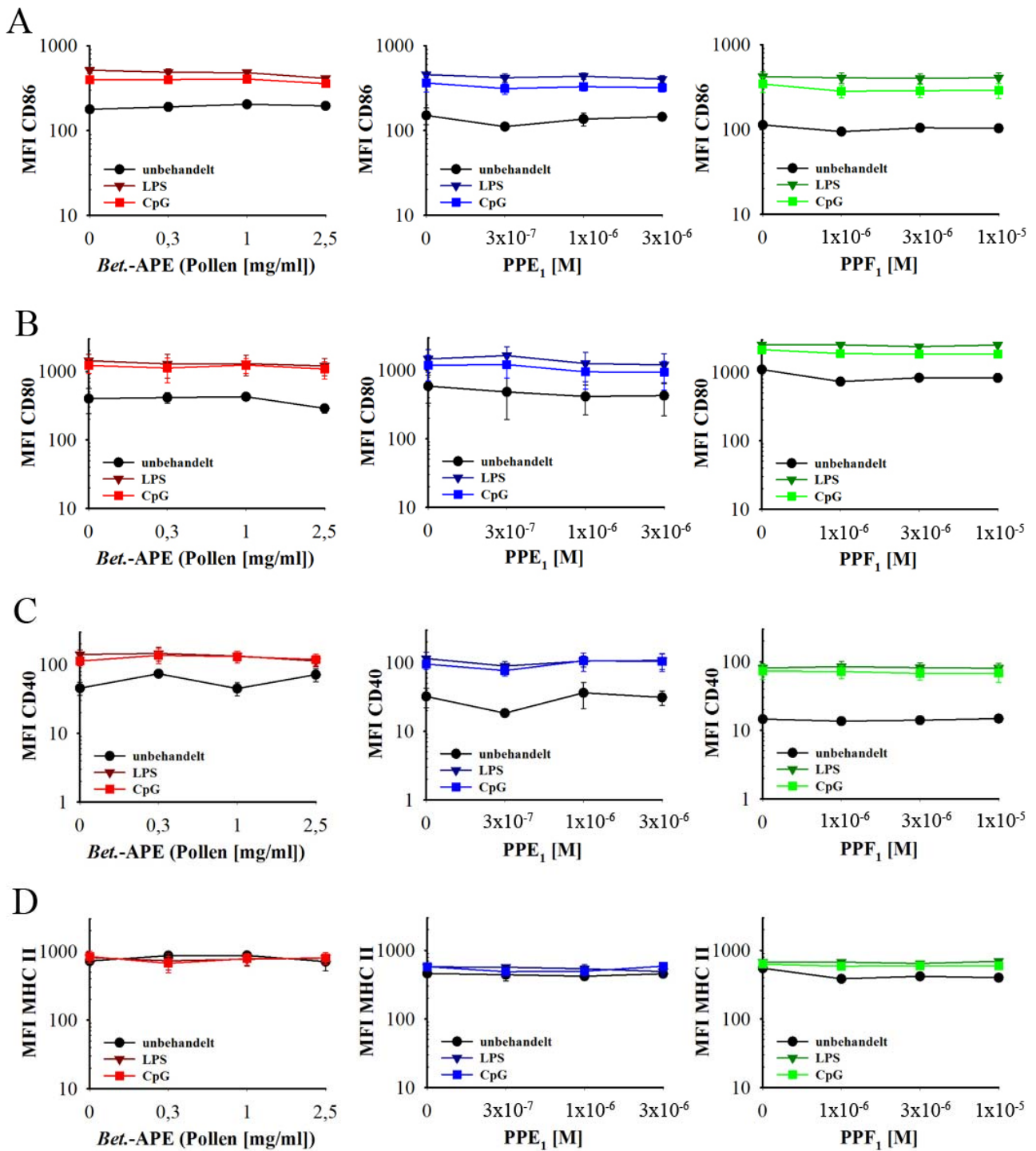
Zur Analyse der Wirkung von wässrigem Birkenpollenextrakt oder von Pollen assoziierten Lipid Mediatoren Phytoprostan E<sub>1</sub> (PPE<sub>1</sub>) oder Phytoprostan F<sub>1</sub> (PPF<sub>1</sub>) auf cDC wurden diese mit den aufgeführten Substanzen *in vitro* stimuliert. Damit eine toxische Wirkung der Substanzen in den getesteten Konzentrationen ausgeschlossen werden konnte, wurden die Zellen nach Stimulation mit PI angefärbt und im Durchflusszytometer der Anteil an lebenden Zellen bestimmt. Abbildung 3.4 verdeutlicht, dass weder der wässrige Pollenextrakt (A), noch das PPE<sub>1</sub> (B) oder PPF<sub>1</sub> (C) in den hier getesteten Konzentrationen mit oder ohne Aktivierung durch LPS oder CpG 2216 einen Einfluss auf die Vitalität der cDC ausübte.



**Abbildung 3.4** Toxizität von *Bet.-APE*, *PPE*<sub>1</sub> und *PPF*<sub>1</sub> auf BALB/c cDC

Durchflusszytometrische Messung des prozentualen Anteils an lebenden Zellen anhand einer PI-Färbung der *in vitro* stimulierten cDC. cDC wurden für 20 h mit steigenden Konzentrationen von *Bet.-APE* (A), *PPE*<sub>1</sub> (B) oder *PPF*<sub>1</sub> (C) stimuliert, schwarzer Graph: Zellen unbehandelt = nicht aktiviert, in Medium inkubiert; dunkelroter Graph (A)/ dunkelblauer Graph (B)/ dunkelgrüner Graph (C): Zellen mit LPS aktiviert; roter Graph (A)/ blauer Graph (B)/ grüner Graph (C): Zellen mit CpG 2216 aktiviert. Die gezeigten Daten stellen den Mittelwert aus mindestens zwei Experimenten mit dem jeweiligen SEM dar. Die Daten der nicht aktivierten cDC stimuliert mit *PPF*<sub>1</sub> repräsentieren ein Experiment. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test und ergab für alle Analysen nicht signifikante Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

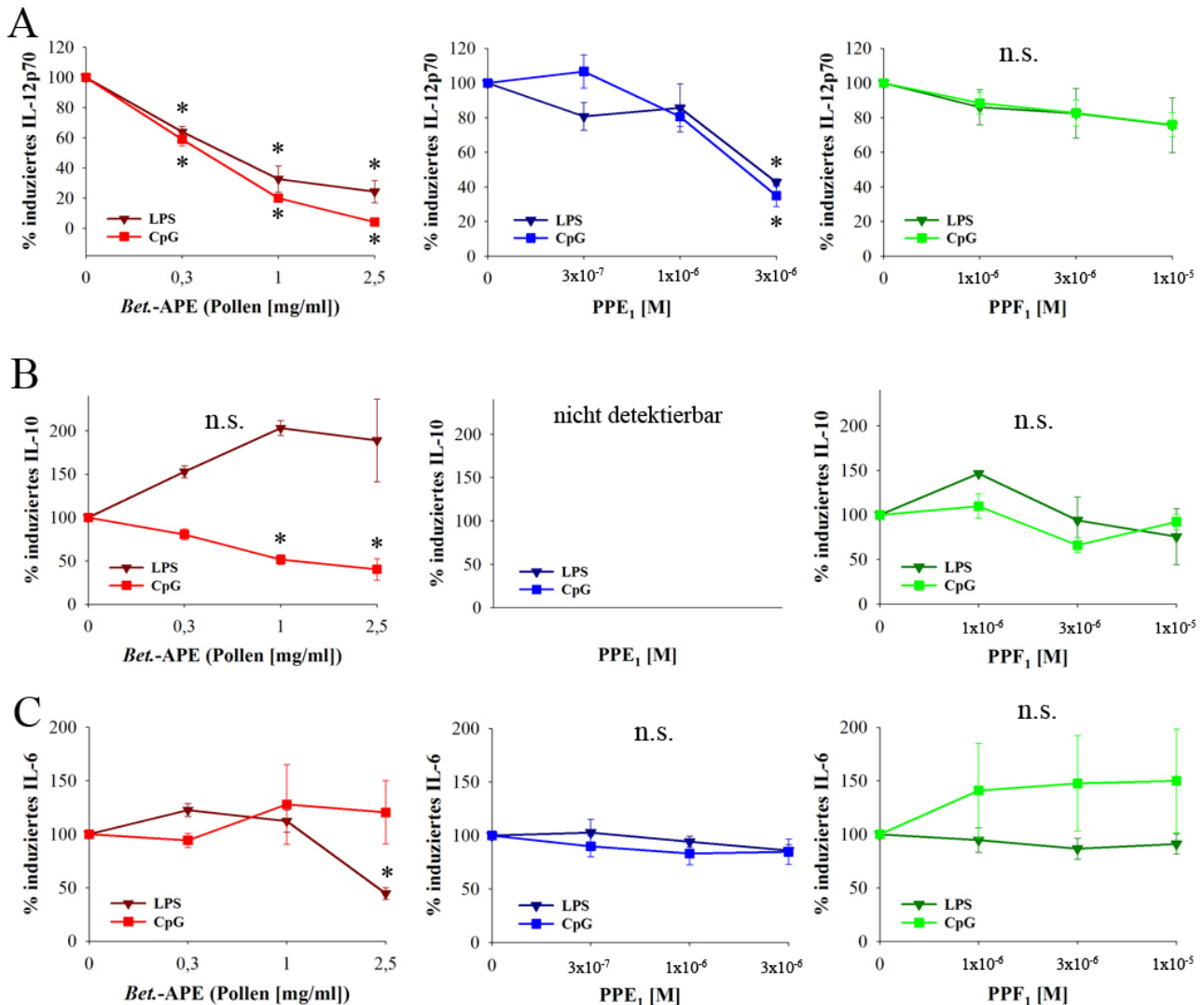
Im nächsten Schritt wurden verschiedene Oberflächenmoleküle auf den cDC nach Inkubation mit den zu testenden Substanzen analysiert. Hierzu zählten die Aktivierungsmarker CD86 (Abbildung 3.5 A), CD80 (Abbildung 3.5 B) und CD40 (Abbildung 3.5 C) und das für die Präsentation von extrazellulären Peptiden verantwortliche MHC Klasse II Molekül (Abbildung 3.5 D). Weder der wässrige Pollenextrakt (Abbildung 3.5 linke Spalte), noch das *PPE*<sub>1</sub> (Abbildung 3.5 mittlere Spalte) oder *PPF*<sub>1</sub> (Abbildung 3.5 rechte Spalte) zeigten unter den gewählten Stimulationsbedingungen einen konzentrationsabhängigen Einfluss auf die Expression der untersuchten Oberflächenmoleküle.



**Abbildung 3.5** Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf BALB/c cDC nach Inkubation mit *Bet.-APE*,  $PPE_1$ ,  $PPF_1$

Durchflusszytometrische Messung der Expression von CD86 (A), CD80 (B), CD40 (C) und MHC Klasse II (D) auf *in vitro* für 20 h stimulierten cDC, dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). cDC stimuliert mit steigenden Konzentrationen von *Bet.-APE* (linke Spalte),  $PPE_1$  (mittlere Spalte) oder  $PPF_1$  (rechte Spalte); schwarzer Graph: Zellen unbehandelt = nicht aktiviert, in Medium inkubiert; dunkelroter Graph / dunkelblauer Graph / dunkelgrüner Graph: Zellen mit LPS aktiviert; roter Graph / blauer Graph / grüner Graph: Zellen mit CpG 2216 aktiviert. Alle Graphen sind Darstellungen von Mittelwerten aus 2 – 6 Experimenten mit dem jeweiligen SEM. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test und ergab für alle Analysen keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

Da für humane DC bereits gezeigt werden konnte [315], dass die IL-12p70 Sekretion sowohl durch *Bet.*-APE als auch durch PPE<sub>1</sub> gehemmt wird, PPF<sub>1</sub> die IL-12p70 Sekretion jedoch nicht beeinflusst, wurde dies nun auch im murinen System untersucht.



**Abbildung 3.6 Einfluss von *Bet.*-APE, PPE<sub>1</sub> und PPF<sub>1</sub> auf die Sekretion von LPS oder CpG 2216 induzierten Zytokinen aus BALB/c cDC**

cDC wurden an d8 für 20 h mit LPS oder CpG 2216 aktiviert und entweder mit *Bet.*-APE (linke Spalte), mit PPE<sub>1</sub> (mittlere Spalte) oder PPF<sub>1</sub> (rechte Spalte) in steigenden Konzentrationen stimuliert. Die Konzentrationen der Zytokine IL-12p70 (A), IL-10 (B) und IL-6 (C) wurden im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 – 4 unabhängigen Experimenten mit dem jeweiligen SEM. Zur Normierung der Experimente wurden die Messwerte als prozentualer Anteil an LPS oder CpG 2216 induziertem Zytokin dargestellt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied zu den nicht stimulierten Proben ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet (n.s.: nicht signifikant).

Abbildung 3.6 A zeigt die IL-12p70 Sekretion der cDC nach Aktivierung mit LPS oder CpG 2216 und Inkubation mit steigenden Konzentrationen von *Bet.*-APE (linke Spalte), PPE<sub>1</sub> (mittlere Spalte)



und PPF<sub>1</sub> (rechte Spalte). Die Stimulation mit *Bet.*-APE (A links) führte zu einer dosisabhängigen, signifikanten Reduktion der IL-12p70 Sekretion im Vergleich zur nicht stimulierten Probe unabhängig vom hier gewählten TLR-Liganden. PPE<sub>1</sub> (A mitte) zeigte nur in der höchsten eingesetzten Konzentration einen signifikanten Effekt auf die IL-12p70 Sekretion, wohingegen die Stimulation mit PPF<sub>1</sub> (A rechts) in keiner der hier eingesetzten Konzentrationen zu einer signifikanten Verringerung der Sekretion führte (Daten siehe Kapitel 10.1 Datenanhang).

IL-10 scheint eine wichtige Rolle während der Toleranzinduktion und Toleranzerhaltung zu spielen. Um die Effekte der Toleranzbrechung besser zu verstehen, stellte sich die Frage, welchen Effekt sowohl der wässrige Birkenpollenextrakt als auch die PALMs auf die IL-10 Sekretion der cDC ausüben. Abbildung 3.6 B zeigt die LPS oder CpG 2216 induzierte IL-10 Sekretion nach Inkubation mit *Bet.*-APE (linke Spalte) und PPF<sub>1</sub> (rechte Spalte). Während der Stimulation mit PPE<sub>1</sub> (mittlere Spalte) konnten keine signifikanten Mengen an IL-10 detektiert werden. Es ist deutlich zu erkennen, dass der wässrige Pollenextrakt in Verbindung mit der Aktivierung durch LPS zu einem Anstieg in der IL-10 Sekretion der cDC führte (Abbildung 3.6 B, dunkelroter Graph), wohingegen der wässrige Pollenextrakt in Zusammenhang mit der Aktivierung durch CpG 2216 eine signifikante Reduktion der IL-10 Sekretion der cDC bewirkte (Abbildung 3.6 B, roter Graph). Bei Betrachtung der IL-10 Sekretion aus cDC nach Aktivierung durch LPS (Abbildung 3.6 B, dunkelgrüner Graph) oder CpG 2216 (Abbildung 3.6 B, grüner Graph) in Anwesenheit von PPF<sub>1</sub> ließ sich kein konzentrationsabhängiger Einfluss ableiten (Daten siehe Kapitel 10.1. Datenanhang). Im Zellkulturüberstand von nicht aktivierten cDC konnten weder detektierbare IL-10-, noch IL-12p70-Konzentrationen gemessen werden.

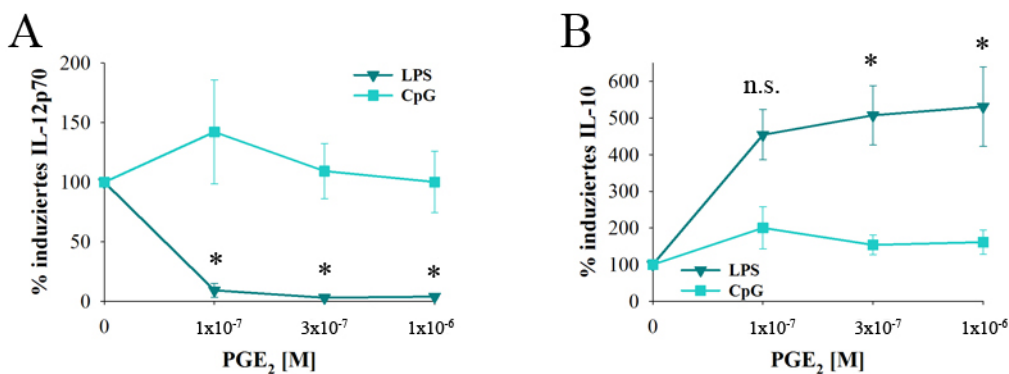
IL-6 ist ein Zytokin, welches bei der Kontrolle der innate Immunantwort eine Rolle spielt und zur Entwicklung der adaptiven Immunantwort beiträgt. Es ist in der Lage, die regulatorische T Zelle Antwort zu übergehen und Effektor-T Zellen zu aktivieren [260]. Hier wurde untersucht, ob der wässrige Pollenextrakt oder die hier untersuchten PALMs die Sekretion des IL-6 aus cDC beeinflusst und somit zur Modulation der Immunantwort beiträgt. In Abbildung 3.6 C ist die IL-6 Sekretion von LPS oder CpG 2216 aktivierten cDC nach Behandlung mit wässrigem Birkenpollenextrakt (linke Spalte), mit PPE<sub>1</sub> (mittlere Spalte) oder mit PPF<sub>1</sub> (rechte Spalte) dargestellt. Es ist zu erkennen, dass weder der wässrige Pollenextrakt (Abbildung 3.6 C, roter Graph) noch das PPE<sub>1</sub> (Abbildung 3.6 C, blauer Graph) einen Einfluss auf die IL-6 Sekretion von CpG 2216 aktivierten cDC hatten. Beim PPF<sub>1</sub> führten große Schwankungen der Messwerte zu einer nicht signifikanten Erhöhung der IL-6 Sekretion von CpG aktivierten cDC (Abbildung 3.6 C, grüner Graph). Die IL-6 Sekretion von LPS aktivierten cDC wurde weder durch PPE<sub>1</sub> (Abbildung 3.6 C, dunkelblauer Graph) noch durch PPF<sub>1</sub> (Abbildung 3.6 C, dunkelgrüner Graph) moduliert, jedoch zeigte sich bei *Bet.*-APE (Abbildung 3.6 C, dunkelroter Graph) in der höchsten getesteten Konzentration eine signifikante Reduktion der IL-6 Sekretion im Vergleich zu der nicht stimulierten Probe (Daten siehe Kapitel 10.1. Datenanhang). Nicht aktivierte, sogenannte semi-mature cDC



sekretierten geringe Mengen an IL-6 ( $0,14 \pm 0,18$  ng/ml), die durch die Stimulation mit den getesteten Substanzen nicht moduliert wurden.

Prostaglandine spielen eine wichtige Rolle bei inflammatorischen Reaktionen, währenddessen sie unter anderem die Funktion von DC modulieren. Da die pflanzlichen Phytoprostane strukturelle Analoga zu den Prostaglandinen darstellen, wurde hier analysiert, ob die durch PPE<sub>1</sub> oder den wässrigen Gesamtextrakt bewirkte Modulation der cDC den Effekten von PGE<sub>2</sub> entspricht, um Rückschlüsse auf mögliche Signalwege der modulierenden Substanzen ziehen zu können.

Abbildung 3.7 verdeutlicht die Effekte von PGE<sub>2</sub> auf die durch LPS oder CpG 2216 induzierte IL-12p70 und IL-10 Sekretion von cDC. Mit steigender Konzentration an PGE<sub>2</sub> war eine signifikante Hemmung der LPS-induzierten IL-12p70 Produktion zu beobachten, die zeitgleich mit einer zum Teil signifikanten Induktion der IL-10 Sekretion einherging. Im Vergleich zu PPE<sub>1</sub> übte PGE<sub>2</sub> in sehr viel geringerer Konzentration einen Einfluss auf die IL-12p70 Sekretion aus. Die CpG-induzierte IL-12p70 Sekretion wurde durch PGE<sub>2</sub> nur geringfügig moduliert, wodurch es sich deutlich von der Wirkung von PPE<sub>1</sub> oder *Bet.*-APE auf die cDC unterschied. Die Induktion der IL-10 Sekretion durch *Bet.*-APE nach LPS Aktivierung fiel bedeutend schwächer aus (vgl. Abbildung 3.6 B linke Spalte) als mit PGE<sub>2</sub>, wies aber den gleichen Trend auf (Daten siehe Kapitel 10.1. Datenanhang).

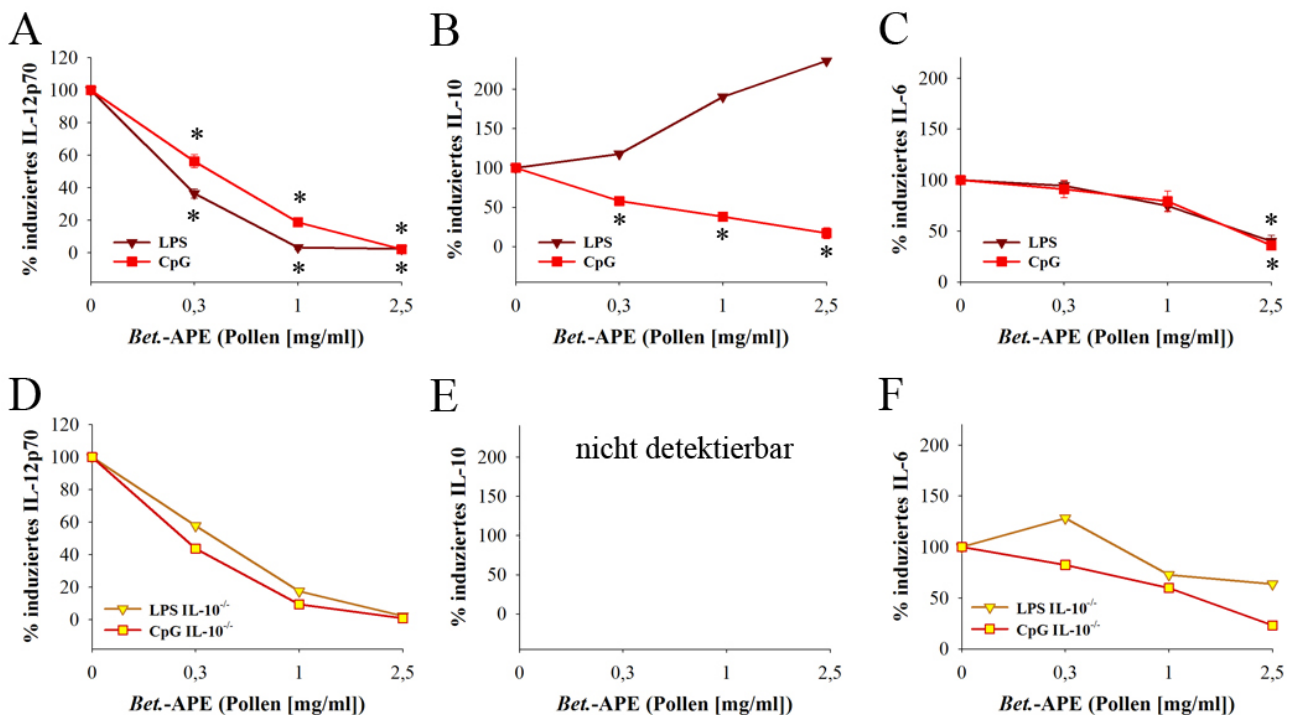


**Abbildung 3.7 Sekretion von LPS oder CpG 2216 induzierten Zytokinen aus cDC nach Stimulation mit PGE<sub>2</sub>**

cDC wurden an d8 für 20 h mit LPS oder CpG 2216 aktiviert und mit PGE<sub>2</sub> in steigenden Konzentrationen stimuliert. Die Konzentrationen der Zytokine IL-12p70 (A) und IL-10 (B) wurden im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens vier unabhängigen Experimenten mit dem jeweiligen SEM. Zur Normierung der Experimente wurden die Messwerte als prozentualer Anteil an LPS oder CpG 2216 induziertem Zytokin dargestellt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied zu den nicht stimulierten Proben ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Im nächsten Schritt wurden cDC aus C57BL/6 Knochenmarkszellen generiert und nach Aktivierung mit LPS oder CpG 2216 mit steigenden Konzentrationen von *Bet.*-APE stimuliert. Ziel war es zu zeigen, dass die beobachteten Effekte des wässrigen Pollenextrakts nicht nur in einem Th2-

begünstigten Mausmodell, sondern auch in einem Th1-dominierten Modell auftreten. Beim Vergleich der linken Spalte der Abbildung 3.6 mit Abbildung 3.8 A bis C wird deutlich, dass sich die sekretierten Zytokine nach Aktivierung mit LPS oder CpG 2216 und Inkubation mit steigenden Konzentrationen von *Bet.*-APE in beiden Mauslinien ähnlich verhielten. Die IL-12p70 Sekretion nahm nach Aktivierung mit LPS und CpG 2216 signifikant ab. Die IL-10 Sekretion stieg nach LPS Aktivierung an und war nach CpG 2216 Aktivierung signifikant gehemmt. Nur bei der IL-6 Sekretion der C57BL/6 cDC war sowohl nach LPS als auch CpG 2216 Aktivierung eine signifikante Abnahme in der höchsten getesteten *Bet.*-APE-Konzentration zu beobachten.



**Abbildung 3.8 Einfluss von *Bet.*-APE auf die Sekretion von LPS oder CpG 2216 induzierten Zytokinen aus C57BL/6 cDC**

C57BL/6 wt cDC (A – C) und C57BL/6 IL-10<sup>-/-</sup> cDC (D – F) wurden an d8 für 20 h mit LPS oder CpG 2216 aktiviert und mit *Bet.*-APE in steigenden Konzentrationen stimuliert. Die Konzentrationen der Zytokine IL-12p70 (A/ D), IL-10 (B/ E) und IL-6 (C/ F) wurden im Überstand mittels ELISA bestimmt. Dargestellt sind für die Daten der C57BL/6 wt cDC die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit dem jeweiligen SEM. Eine Ausnahme stellt die LPS induzierte IL-10 Sekretion dar, die hier als Einzelexperiment mit drei unabhängigen Messwerten und der dazugehörigen SD gezeigt wird. Die Daten der C57BL/6 IL-10<sup>-/-</sup> cDC sekretierten Zytokine zeigen ein Experiment mit jeweils drei Einzelmesswerten. Zur Normierung der Experimente wurden die Messwerte als prozentualer Anteil an LPS oder CpG 2216 induziertem Zytokin dargestellt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied zu den nicht stimulierten Proben ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Des Weiteren stellte sich die Frage, ob der Anstieg der IL-10 Sekretion durch *Bet.*-APE nach Aktivierung mit LPS die Reduktion der IL-12p70 Produktion bedingte. Zur Untersuchung dieser

Fragestellung wurden cDC aus C57BL/6 IL-10<sup>-/-</sup>-Knochenmarkszellen generiert und ebenfalls nach Aktivierung mit LPS oder CpG 2216 mit steigenden Konzentrationen von *Bet.*-APE inkubiert (Abbildung 3.8 D bis F). Es zeigte sich, dass sowohl die IL-12p70 als auch die IL-6 Sekretion von IL-10<sup>-/-</sup>-cDC (Abbildung 3.8 D und F) vergleichbar mit den wt cDC Daten (Abbildung 3.8 A und C) war. Die IL-10 Sekretion war in den Zellkulturüberständen der IL-10<sup>-/-</sup>-cDC unterhalb der Detektionsgrenze (Daten siehe Kapitel 10.1. Datenanhang). Nicht aktivierte semi-mature C57BL/6 cDC oder C57BL/6 IL-10<sup>-/-</sup> cDC sekretierten keine bis geringe Mengen an IL-6, IL-12p70 und IL-10.

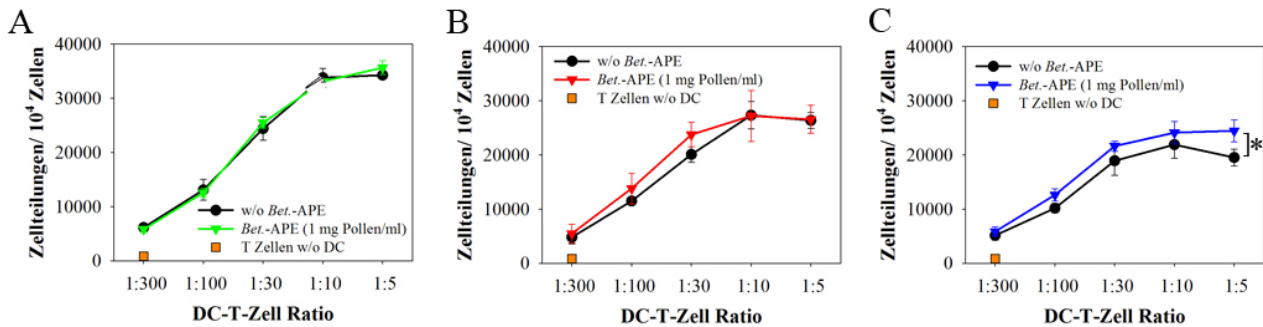
### **3.1.2. Direkter und indirekter Einfluss von *Bet.*-APE auf die immunologische T Zell-Antwort**

#### **3.1.2.1. *Allogene DC-T Zell-Kokultur***

Die bisher beschriebenen Ergebnisse leiten zur nächsten Fragestellung über. In dieser wurde analysiert, welchen Einfluss die Modulationen der IL-12 und IL-10 Sekretion der cDC durch *Bet.*-APE auf die immunologische T Zell-Antwort ausüben. Im humanen System konnte bereits gezeigt werden, dass diese funktionelle Veränderung die Th1/ Th2-Polarisierung von naiven T Zellen in Richtung Th2-dominierend verschiebt, was sich durch eine verminderte IFN- $\gamma$  und eine verstärkte IL-4 Sekretion äußert [315]. Um diese Daten zu bestätigen und im Anschluss weiterführende *in vivo* Experimente zum Mechanismus durchführen zu können, wurden allogene MLR durchgeführt. Die Präsentation der Alloantigene der cDC sorgt hierbei für eine Immunreaktion, in der die T Helferzellen aktiviert und somit zur Proliferation und Zytokinsekretion angeregt werden. Hierfür wurden zunächst cDC aus C57BL/6 oder BALB/c Knochenmarkszellen generiert und an Tag 8 für 20 h mit LPS oder CpG 2216 aktiviert bzw. unbehandelt gelassen und zeitgleich mit *Bet.*-APE (1 mg Pollen/ml) stimuliert. Im Anschluss an diese Inkubation wurden die Zellen intensiv gewaschen und gemeinsam mit allogenen CD4<sup>+</sup> Zellen aus Milzen von BALB/c bzw. C57BL/6-Mäusen, die mittels MACS-Technik isoliert und angereichert wurden, für vier Tage kultiviert. Zum einen wurde die allostimulatorische Kapazität der cDC auf naive T Zellen durch einen Proliferationsansatz bestimmt, zum anderen wurde die immunmodulatorische Kapazität der cDC auf naive T Zellen durch Messung der Produktion von Leitzytokinen der Th1- oder Th2-gerichteten Immunantwort analysiert.

Abbildung 3.9 zeigt die Anzahl der Zellteilungen von naiven BALB/c T Zellen bezogen auf 10.000 Zellen nach Kokultivierung mit C57BL/6 cDC, die zuvor für 20 h in Medium kultiviert (Abbildung 3.9 A) oder mit LPS (Abbildung 3.9 B) oder CpG 2216 (Abbildung 3.9 C) aktiviert wurden, während sie zeitgleich mit oder ohne *Bet.*-APE (Pollen [1 mg/ml]) behandelt wurden. Bei Betrachtung der Abbildung 3.9 wird deutlich, dass die Behandlung der cDC mit dem wässrigen

Pollenextrakt unter den meisten der getesteten Aktivierungsbedingungen keinen relevanten Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der naiven T Zellen ausübte und somit die allostimulatorische Aktivität der cDC durch *Bet.*-APE nicht beeinflusst wurde. Lediglich nach CpG Aktivierung in einem DC-T Zell-Ratio von 1:5 zeigte sich eine signifikant stärkere Proliferation der T Zellen durch *Bet.*-APE.



**Abbildung 3.9 Proliferationsmessung von allogener MLR (BALB/c T Zellen mit C57BL/6 cDC) nach Inkubation der cDC + / - *Bet.*-APE**

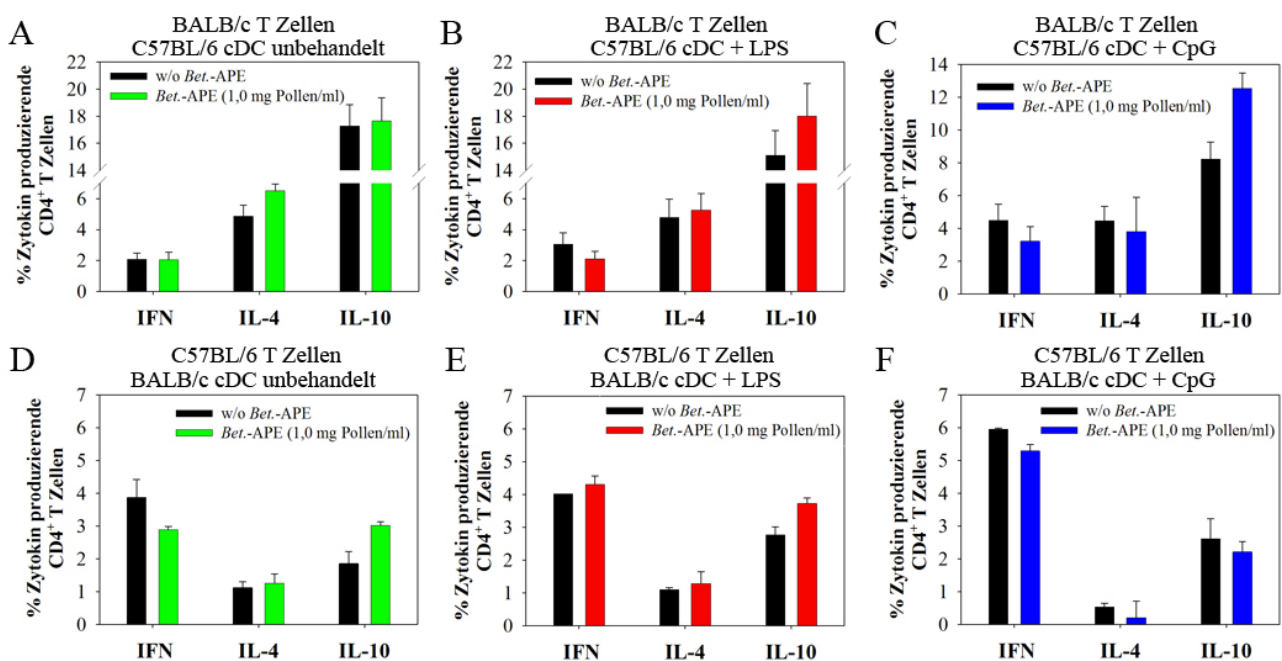
Bestimmung der Zellteilungen von BALB/c CD4<sup>+</sup> T Zellen nach 4-tägiger Kokultivierung mit C57BL/6 cDC, die vorher für 20 h in Medium (A), mit LPS (B) oder CpG 2216 (B) aktiviert und mit *Bet.*-APE (Pollen [1mg/ml]) stimuliert wurden. Die orangenen Quadrate repräsentieren die basale T Zell Proliferation ohne Zusatz von cDC. Die dargestellten Daten stellen ein Experiment mit drei unabhängigen Messwerten und ihrer jeweiligen Standardabweichung dar. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer Two-Way ANOVA mit einem Bonferroni Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied zu den nicht stimulierten Proben ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Abbildung 3.10 zeigt die durchflusszytometrische Bestimmung von intrazellulär akkumuliertem IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-10 zum einen in BALB/c CD4<sup>+</sup> T Zellen, die mit C57BL/6 cDC für vier Tage kokultiviert wurden (Abbildung 3.10 A – C) und zum anderen in C57BL/6 CD4<sup>+</sup> T Zellen, die mit BALB/c cDC für vier Tage kokultiviert wurden (Abbildung 3.10 D – F). Durch Behandlung der nicht aktivierten semi-maturen C57BL/6 cDC mit wässrigem Pollenextrakt (Abbildung 3.10 A) traten keine deutlichen Änderungen der BALB/c CD4<sup>+</sup> T Zell-Zytokinproduktion auf. Bei Betrachtung der Daten des Th1-gerichteten Systems (C57BL/6 T Zellen, Abbildung 3.10 D) wird ein geringer Einfluss des wässrigen Birkenpollenextrakts auf die immunmodulatorische Kapazität der cDC anhand einer nicht signifikant verminderten IFN- $\gamma$  Produktion und der leicht erhöhten IL-10 Produktion der T Zellen deutlich.

Betrachtet man nun die Ergebnisse der T Zell-Zytokinakkumulation nach Kokultivierung mit cDC, die durch LPS aktiviert und mit *Bet.*-APE behandelt wurden (Abbildung 3.10 B und E), zeigt sich in beiden Zellkultursystemen ebenfalls nur ein geringer, nicht signifikanter Einfluss des wässrigen Birkenpollenextrakts, der sich durch einen leichten Anstieg der IL-10 Produktion äußerte.

Wurden die C57BL/6 cDC mit CpG 2216 maturiert und mit wässrigem Pollenextrakt inkubiert (Abbildung 3.10 C), konnte ein nicht signifikanter Anstieg der IL-10 Produktion der BALB/c T Zellen verzeichnet werden. Die Zytokinakkumulation der C57BL/6 T Zellen blieb durch CpG 2216 aktivierte und mit *Bet.*-APE behandelte cDC unbeeinflusst (Abbildung 3.10 F). Eine eindeutige Verschiebung hin zur Th2-Polarisierung war nicht zu beobachten.

Die in Abbildung 3.10 gezeigten Daten setzen sich aus drei Experimenten mit jeweils zwei bis acht unabhängigen Einzelmesswerten zusammen und sind mit der entsprechenden Standardabweichung gezeigt.

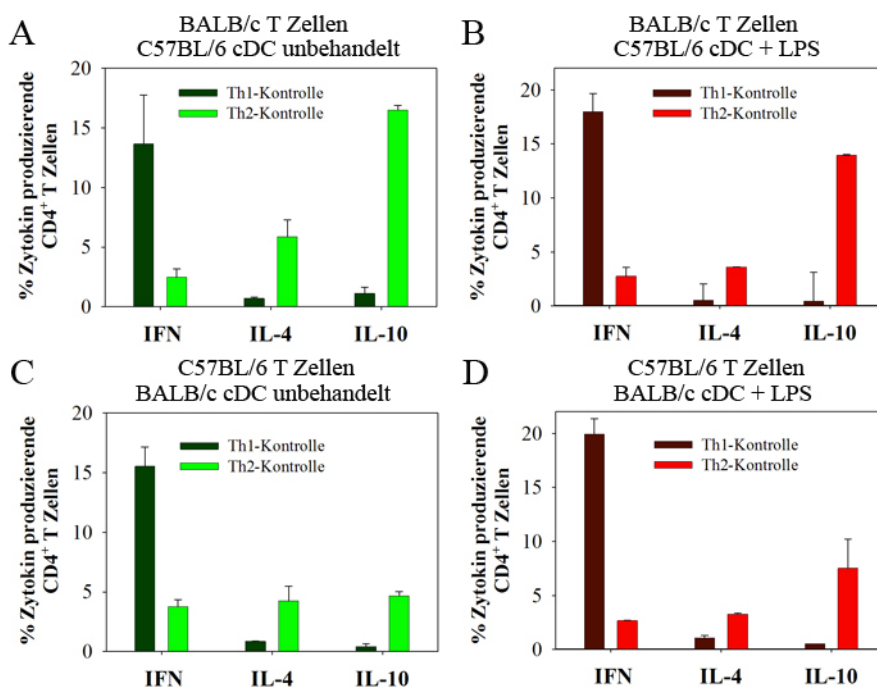


**Abbildung 3.10** Intrazelluläre Zytokinbestimmung in CD4<sup>+</sup> T Zellen nach allogener MLR mit cDC +/- *Bet.*-APE

Durchflusszytometrische Messung von intrazellulär akkumuliertem IFN- $\gamma$ , IL-4 oder IL-10 in BALB/c CD4<sup>+</sup> T Zellen nach 6-tägiger Kokultivierung mit C57BL/6 cDC (A – C) oder in C57BL/6 CD4<sup>+</sup> T Zellen nach 4-tägiger Kokultivierung mit BALB/c cDC (D – F). Die cDC wurden vor der Kokultur für 20 h in Medium (A/ D), mit LPS (B/ E) oder CpG 2216 (C/ F) aktiviert und zeitgleich mit oder ohne *Bet.*-APE (Pollen [1 mg/ml]) stimuliert. Die Daten zeigen den Mittelwert aus drei Experimenten mit dem entsprechenden SEM. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Keine Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zu den nicht stimulierten Proben ( $p > 0,05$ ).

Die in Abbildung 3.11 gezeigten Daten dienen zur Verdeutlichung, dass das hier verwendete allogene Zellsystem durch bestimmte Faktoren (IL-4, IL-12) entweder in eine Th1 gerichtete oder in eine Th2 gerichtete Immunreaktion polarisiert werden konnte. Unabhängig vom murinen Hintergrund der T Zellen war die Th1 Polarisierung des Systems durch die Sekretion von großen Mengen an IFN- $\gamma$  bei geringen Mengen an IL-4 und IL-10 gekennzeichnet. Hierbei spielte der

Aktivierungsgrad der eingesetzten cDC für die Zytokinsekretion der T Zellen nur eine untergeordnete Rolle. Die Th2 polarisierenden Bedingungen erzeugen bei den BALB/c T Zellen nur eine geringfügige Änderung der Zytokinproduktion. Es wurde ein leichter Anstieg der IL-4 Sekretion bei der Kokultur mit nicht aktivierten semi-maturen cDC erzielt (vgl. Abbildung 3.10 A – B mit Abbildung 3.11 A – B). Die C57BL/6 T Zellen (Abbildung 3.11 C – D) ließen sich im Vergleich zu den Daten aus Abbildung 3.10 D – E in Richtung Th2 polarisieren. Neben einem Anstieg an IL-4 wurde auch eine Erhöhung des IL-10 bei leicht verringertem IFN- $\gamma$  beobachtet. Auch hier spielte der Maturationsgrad der cDC kaum eine Rolle für die Polarisierungsfähigkeit des Systems (vgl. Abbildung 3.10 D – E mit Abbildung 3.11 C – D).



**Abbildung 3.11 Intrazelluläre Zytokinbestimmung der Kontrollen zur Th1 und Th2 Polarisierung im allogenen Kultursystem**

Durchflusszytometrische Messung von intrazellulär akkumuliertem IFN- $\gamma$ , IL-4 oder IL-10 in BALB/c CD4<sup>+</sup> T Zellen nach 6-tägiger Kokultivierung mit C57BL/6 cDC (A - B) oder in C57BL/6 CD4<sup>+</sup> T Zellen nach 6-tägiger Kokultivierung mit BALB/c cDC (C - D) in Anwesenheit entweder von rekombinantem IL-12 und  $\alpha$ -IL-4 AK (Th1-Kontrolle) oder rekombinantem IL-4 und  $\alpha$ -IL-12 AK (Th2-Kontrolle). Die cDC wurden vor der Kokultur für 20 h mit LPS (B/ D) aktiviert oder unbehandelt (A/ C) eingesetzt. Die Daten zeigen den Mittelwert aus zwei bis drei Experimenten mit dem entsprechenden SEM. Nur die Daten der IL-10 Produktion der C57BL/6 T Zellen bilden ein Experiment mit der entsprechenden Standardabweichung ab.

Um die Daten aus Abbildung 3.10 zu unterstützen, wurde im nächsten Schritt der Zellkulturüberstand auf den Zytokingehalt von IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 und IL-13 analysiert, so dass nun die Zytokinsekretion nicht mehr auf Einzelzellebene, sondern in der Gesamtpopulation betrachtet

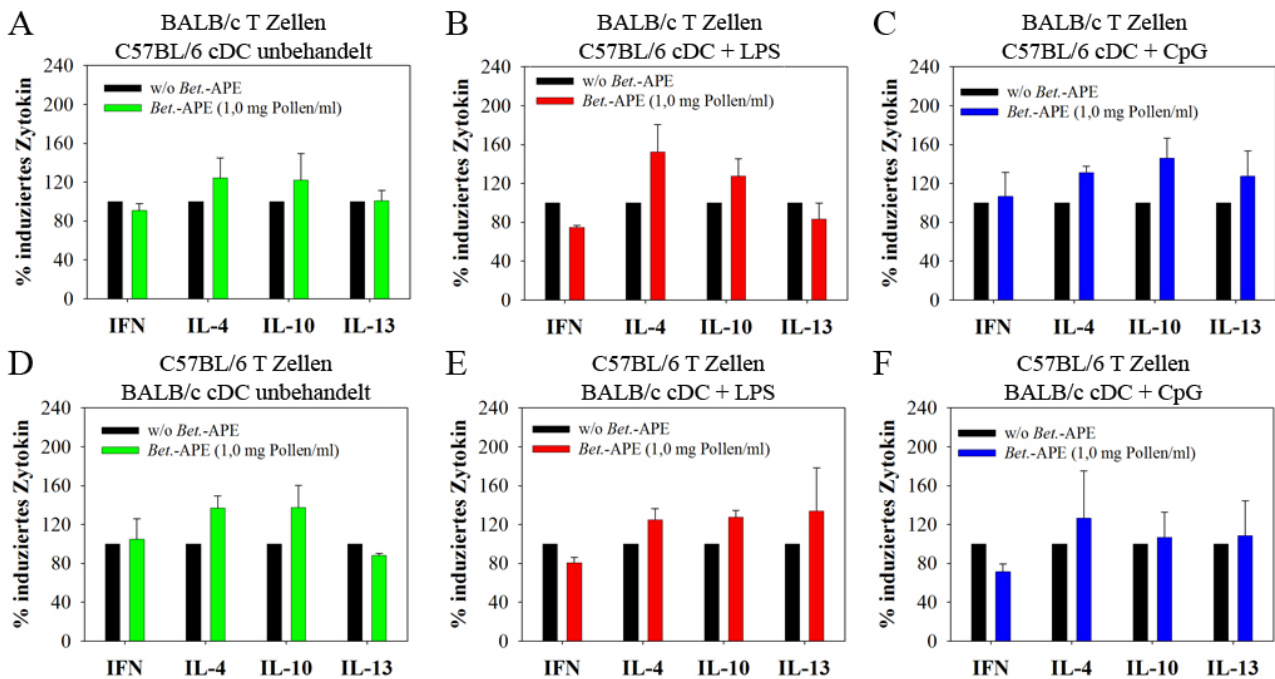
wurde. Da die Kokulturen der cDC mit den aufgereinigten CD4<sup>+</sup> T Zellen in einem Verhältnis von 1:30 durchgeführt wurden (vgl. Kapitel 2.2.7.1), erschien es angemessen, die T Zellen als Hauptproduzenten der detektierten Zytokine im Zellkulturüberstand zu betrachten.

Abbildung 3.12 zeigt den prozentualen Anteil der genannten Zytokine, die durch unbehandelte (Abbildung 3.12 A/ D) oder mit LPS (Abbildung 3.12 B/ E) oder CpG 2216 (Abbildung 3.12 C/ E) aktivierten sowie mit oder ohne *Bet.*-APE inkubierten C57BL/6 cDC bzw. BALB/c cDC in den BALB/c T Zellen bzw. in den C57BL/6 T Zellen induziert wurden. Hierbei ist deutlich zu erkennen, dass die nicht aktivierten, in Medium kultivierten und mit *Bet.*-APE behandelten cDC (Abbildung 3.12 A/ D), wie auch schon in Abbildung 3.10 A/ D gezeigt werden konnte, keine signifikanten Änderungen in der Sekretion der analysierten Zytokine der BALB/c T Zellen bewirkte. Die LPS aktivierten und mit *Bet.*-APE inkubierten cDC (Abbildung 3.12 B/ E) führten zu einer nicht signifikant verminderten Ausschüttung von IFN- $\gamma$  aus BALB/c bzw. C57BL/6 T Zellen sowie zu leicht erhöhten IL-4 und IL-10 Konzentrationen im Zellkulturüberstand. Die IL-13 Sekretion der Kokulturen blieb von den LPS aktivierten und mit *Bet.*-APE behandelten cDC unbeeinflusst. Somit zeigen die Daten in Abbildung 3.12 B und E größtenteils die gleichen Tendenzen wie jene in Abbildung 3.10 B und E. Nur die detektierte IFN- $\gamma$  Konzentration in Abbildung 3.12 E wurde im Gegensatz zur nachgewiesenen IFN- $\gamma$  Menge in Abbildung 3.10 E geringfügig gehemmt.

Abbildung 3.12 C zeigt die prozentualen Anteile der in BALB/c T Zellen durch CpG 2216 aktivierten und mit oder ohne *Bet.*-APE behandelten C57BL/6 cDC induzierten Zytokine. Diese Daten spiegeln die beobachteten Ergebnisse aus Abbildung 3.10 C nicht vollständig wider. Zwar ist auch in Abbildung 3.12 C die IL-10 Produktion der BALB/c T Zellen nach Inkubation mit *Bet.*-APE behandelten C57BL/6 cDC leicht erhöht zu beobachten, jedoch waren weder die IFN- $\gamma$  noch die IL-4 Sekretion vermindert, wie es durchflusszytometrisch gesehen wurde. Stattdessen blieben die IFN- $\gamma$  und die IL-4 Sekretion der BALB/c T Zellen unverändert und zeigten wie auch die IL-13 Produktion eine leicht erhöhte Tendenz nach Inkubation der BALB/c T Zellen mit *Bet.*-APE behandelten C57BL/6 cDC (Abbildung 3.12 C). Die CpG 2216 aktivierten und mit *Bet.*-APE inkubierten BALB/c cDC (Abbildung 3.12 F) führten, wie auch in Abbildung 3.10 F zu sehen, zu einer nicht signifikant verminderten Ausschüttung von IFN- $\gamma$  aus C57BL/6 T Zellen. Die IL-4, IL-10 und IL-13 Konzentrationen im Zellkulturüberstand blieben im Wesentlichen unbeeinflusst (Abbildung 3.12 F).

Die statistische Auswertung ergab, dass die beobachteten Effekte keine signifikanten Unterschiede darstellen. Die Messwerte der analysierten Zytokine sind im Anhang Kapitel 10.1 zusammengefasst.





**Abbildung 3.12** Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand von allogener MLR

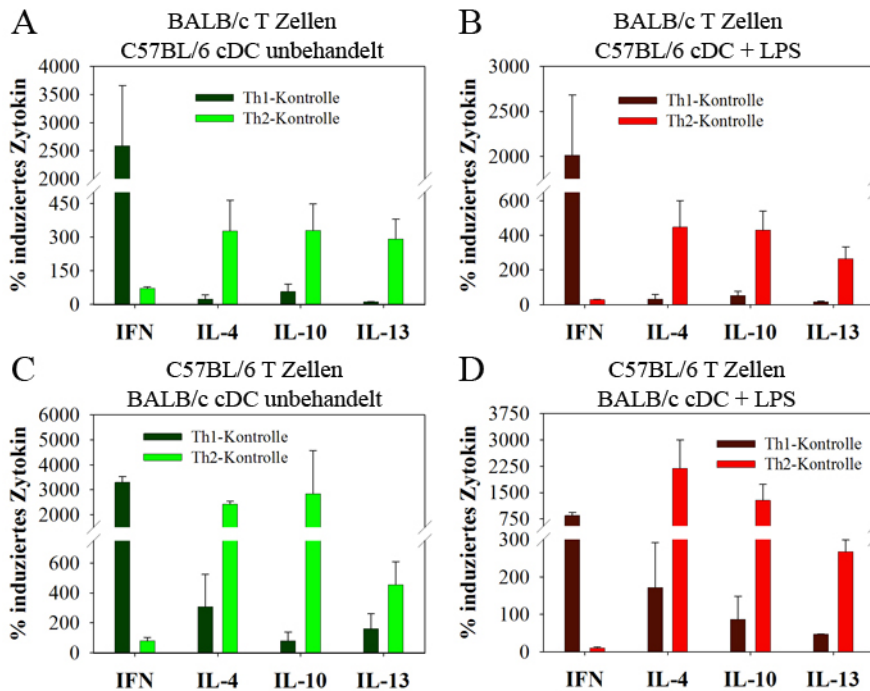
Messung der sekretierten Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 und IL-13 im Zellkulturüberstand mittels ELISA nach 6-tägiger Kokultivierung von BALB/c T Zellen mit C57BL/6 cDC (A – C) oder von C57BL/6 T Zellen mit BALB/c cDC (D – F). Die cDC wurden vor der Kokultur für 20 h in Medium (A/ D), mit LPS (B/ E) oder CpG 2216 (C/ F) aktiviert und zeitgleich mit oder ohne *Bet.-APE* (Pollen [1mg/ml]) stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte aus drei unabhängigen Experimenten mit dem jeweiligen SEM. Zur Normierung der Experimente wurden die Messwerte der Zytokine jeweils in Relation zu den Messwerten gesetzt, die durch Inkubation der T Zellen mit den ohne *Bet.-APE* stimulierten cDC induziert wurden, und als prozentualer Anteil dargestellt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Keine Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zu den nicht stimulierten Proben ( $p > 0,05$ ).

Zur Kontrolle der Polarisierungsfähigkeit des verwendeten Zellkultursystems wurde auch im Zellkulturüberstand der durch IL-12 bzw. IL-4 in Richtung Th1 oder Th2 verschobenen Kulturen der prozentuale Anteil an sekretiertem IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 und IL-13 im Vergleich zu den neutralen Proben bestimmt (Abbildung 3.13 analog zu Abbildung 3.12 normiert, absolute Messwerte zusammengefasst im Anhang Kapitel 10.1).

In Einklang mit der Th1-Kontrolle der intrazellulären Zytokinbestimmung (vgl. Abbildung 3.11) bestätigt ein hoher Anteil an sekretiertem IFN- $\gamma$  bei vergleichsweise geringen Mengen an IL-4, IL-10 und IL-13 die mögliche Th1 Polarisierung des Systems (siehe Abbildung 3.13). Im Gegensatz zur Zytokinanalyse auf Einzelzellebene wird die Th2 Polarisierungsfähigkeit des Systems bei der Bestimmung der Zytokine im Zellkulturüberstand durch große Mengen an IL-13 belegt. Die hohen IL-4 Konzentrationen wurden durch die exogene Zugabe von IL-4 verstärkt und spiegelten nicht den realen Wert an sekretiertem IL-4 wider. Auffällig war auch der Anstieg an sekretiertem IL-10



unter Th2 polarisierenden Bedingungen. Besonders deutlich trat eine mögliche Th2 Polarisierung bei den Kulturen mit C57BL/6 T Zellen (Abbildung 3.13 C – D) auf, da hier der prozentuale Anstieg der sezernierten Th2 Zytokine gegenüber den neutralen Proben höher ausfiel als in Kulturen mit BALB/c T Zellen. Der Maturationsgrad der cDC hatte keinen Einfluss auf die Polarisierbarkeit des Zellkultursystems.



**Abbildung 3.13** Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand der Kontrollen zur Th1 und Th2 Polarisierung von allogener MLR

Messung der sekretierten Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4, IL-10 und IL-13 im Zellkulturüberstand nach 6-tägiger Kokultivierung von BALB/c T Zellen mit C57BL/6 cDC (A – B) oder von C57BL/6 T Zellen mit BALB/c cDC (C – D) in Anwesenheit entweder von rekombinantem IL-12 und  $\alpha$ -IL-4 AK (Th1-Kontrolle) oder rekombinantem IL-4 und  $\alpha$ -IL-12 AK (Th2-Kontrolle). Die cDC wurden vor der Kokultur für 20 h mit LPS (B/ D) aktiviert oder unbehandelt eingesetzt (A/ C). Dargestellt sind die Mittelwerte aus zwei bis drei unabhängigen Experimenten mit dem jeweiligen SEM. Die Messwerte wurden analog zu Abbildung 3.12 normiert.

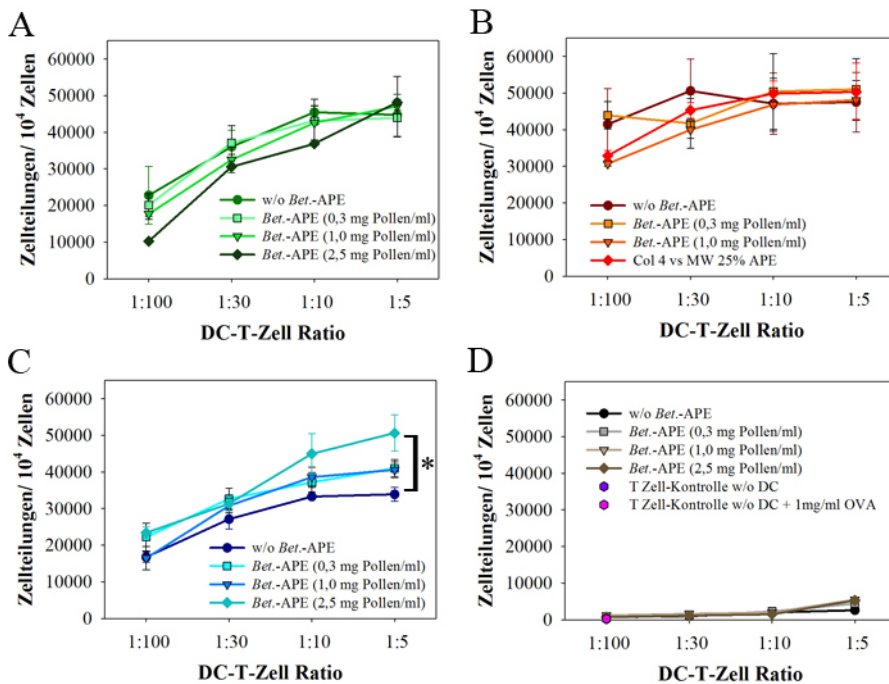
Zusammenfassend für Abbildung 3.10 und Abbildung 3.12 lässt sich sagen, dass keine eindeutige Th2 Polarisierung der T Zellen durch *Bet.*-APE behandelte cDC im allogenen Testsystem zu beobachten war.

### 3.1.2.2. Antigen-spezifische DC-T Zell-Kokultur

Bisher wurde die immunmodulatorische Wirkung der durch *Bet.*-APE funktionell veränderten cDC auf T Zellen nur im allogenen Testsystem untersucht. Ein allogenes Testsystem repräsentiert kein optimales Modell für die Typ I Allergie. Aus diesem Grund wurde zur weiteren Analyse des

Einfluss von durch *Bet.*-APE funktionell veränderten cDC auf T Zellen ein antigenspezifisches Testsystem gewählt, welches ein verbessertes Modell zur Typ I Allergie darstellt. Hierbei wurden T Lymphozyten aus DO11.10-Mäusen isoliert, die einen transgenen T Zell-Rezeptor tragen, der das Peptid OVA<sub>323-339</sub> mittels I-A<sup>d</sup> MHC Klasse II Molekül erkennt. Somit war es möglich, den indirekten Einfluss des *Bet.*-APE auf die antigenspezifische T Zell Polarisierung anhand der Proliferation und Zytokinproduktion zu analysieren. Die durch *Bet.*-APE funktionell veränderten cDC wurden mit OVA beladen und mit OVA<sub>323-339</sub>-spezifischen T Zellen kokultiviert. In Abbildung 3.14 A – C ist die Anzahl der Zellteilungen von OVA-spezifischen T Zellen bezogen auf 10.000 Zellen nach Kokultur mit OVA beladenen und mit oder ohne *Bet.*-APE stimulierten cDC dargestellt. Die cDC wurden zeitgleich mit Behandlung des *Bet.*-APE mit LPS (Abbildung 3.14 B) oder CpG 2216 (Abbildung 3.14 C) aktiviert oder als nicht aktivierte semi-mature cDC in Medium (Abbildung 3.14 A) kultiviert. Abbildung 3.14 D zeigt die Anzahl der Zellteilungen von DO11.10 T Zellen nach Koinkubation mit oder ohne *Bet.*-APE behandelten cDC, die keine Ovalbumin-Peptide präsentierten. Die Anzahl der Zellteilungen bei dieser Kontroll-MLR blieb unabhängig von der Anzahl an cDC unverändert niedrig. Daraus lässt sich ableiten, dass die beobachtete Proliferation nach Beladung der cDC mit OVA ausschließlich antigenspezifisch erfolgte. Ebenso war keine Proliferation von T Zellen, die ohne cDC inkubiert wurden, zu verzeichnen. Der Zusatz von Ovalbumin zur Kultur von DO11.10 T Zellen bewirkte in Abwesenheit von cDC keine Zellteilungen.

Betrachtet man die Proliferation der T Zellen bei Kokultur mit nicht aktivierten semi-maturen cDC (Abbildung 3.14 A), ist zu erkennen, dass zwar die Proliferationsrate durch eine höhere Anzahl an cDC in der Kultur gesteigert werden konnte, jedoch die Stimulation der cDC mit steigenden Konzentrationen an *Bet.*-APE keinen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der Zellteilungen hatte. Wurden die cDC während der Behandlung mit *Bet.*-APE und Beladung mit OVA zeitgleich mit LPS maturiert, zeigte sich bei der antigenspezifischen T Zell Proliferation bereits eine höhere Anzahl der Zellteilungen bei Koinkubation mit geringer Anzahl an cDC (Abbildung 3.14 B). Ein indirekter Einfluss des wässrigen Pollenextrakts auf die T Zell Proliferation konnte nicht beobachtet werden. Die Maturation der cDC durch CpG 2216 während der *Bet.*-APE Stimulation und OVA-Beladung bewirkte ein ähnliches Proliferationsprofil der T Zellen (Abbildung 3.14 C), wie mit den semi-maturen cDC beobachtet wurde (Abbildung 3.14 A). Allerdings führte die Behandlung der cDC mit der höchsten getesteten Konzentration an *Bet.*-APE zu einer signifikant höheren Zellteilung der T Zellen in Anwesenheit von einer großen Anzahl cDC (DC-T Zell-Ratio 1:5) im Vergleich zur Proliferation der T Zellen in Anwesenheit von CpG 2216 aktivierten cDC ohne *Bet.*-APE Behandlung.

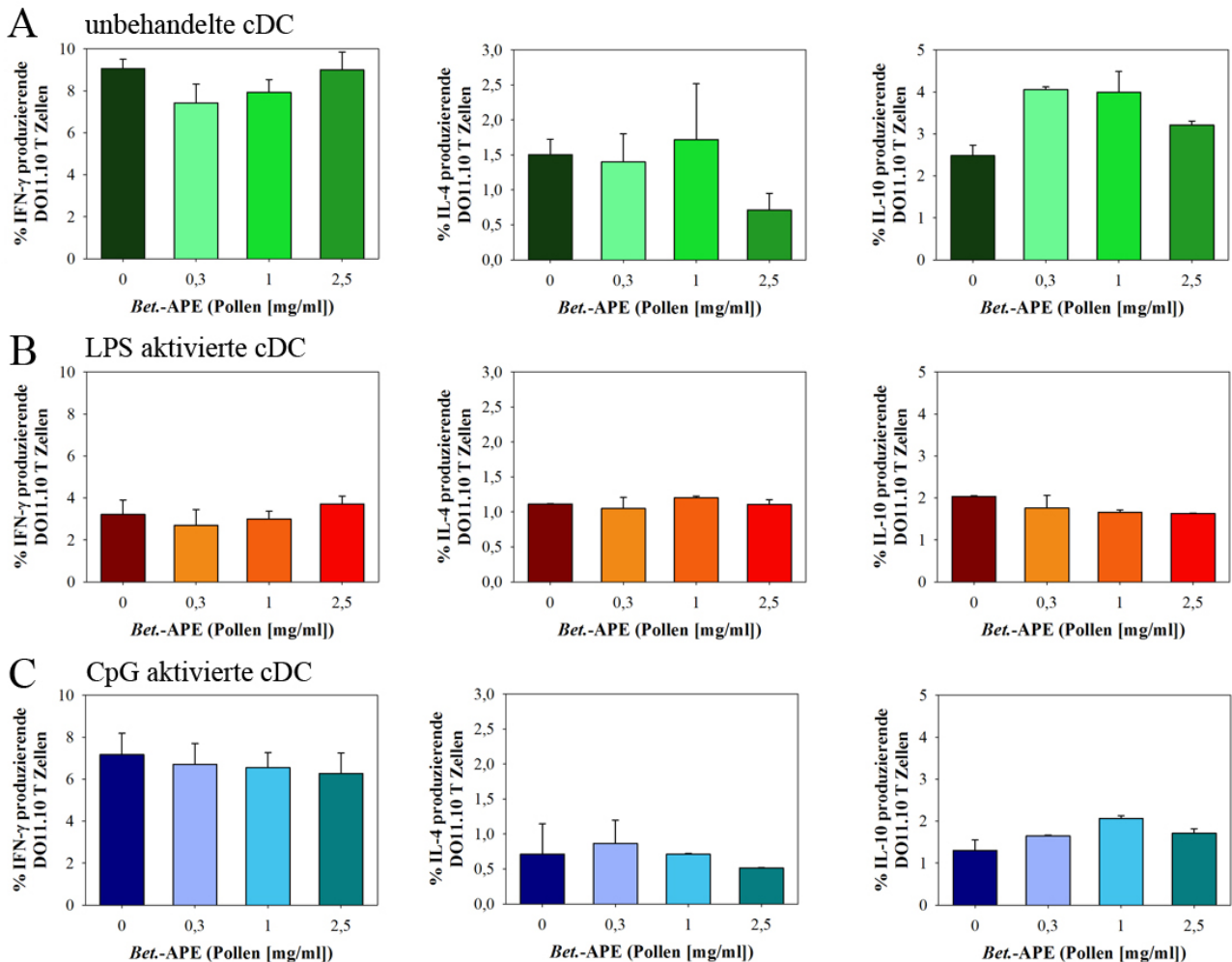


**Abbildung 3.14 Proliferationsmessung von OVA-spezifischen DO11.10 T Zellen**

Bestimmung der Zellteilungen von OVA-spezifischen DO11.10 T Zellen nach 4-tägiger Kokultivierung mit cDC, die vorher für 20 h in Medium (A), mit LPS (B) oder CpG 2216 (C) aktiviert, mit 1 mg/ml OVA VI beladen und zeitgleich mit steigender Konzentration von *Bet.*-APE stimuliert wurden (D mit LPS aktiviert, keine Beladung mit OVA VI). Dargestellt sind in A - C die Mittelwerte von zwei unabhängigen Experimenten mit dem jeweiligen SEM. (D) stellt repräsentativ ein aus vier Experimenten mit zwei unabhängigen Messwerten und der entsprechenden Standardabweichung dar. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer Two-Way ANOVA mit einem Bonferroni Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied zu den nicht stimulierten Proben ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet.

Ein weiterer untersuchter Parameter zur Auswirkung der veränderten Funktionalität der mit *Bet.*-APE inkubierten cDC auf die immunologische T Zell-Antwort ist die intrazelluläre Zytokinakkumulation OVA-spezifischer T Zellen. Hierbei wurden IFN- $\gamma$  (Abbildung 3.15 linke Spalte), IL-4 (Abbildung 3.15, mittlere Spalte) und IL-10 (Abbildung 3.15, rechte Spalte) intrazellulär nach 6-tägiger Kokultur von OVA-spezifischen T Zellen mit OVA beladenen cDC analysiert. Während der Inkubation der cDC mit OVA und *Bet.*-APE wurden die Zellen entweder mit LPS (Abbildung 3.15 B) oder CpG 2216 (Abbildung 3.15 C) aktiviert oder unbehandelt in Medium (Abbildung 3.15 A) kultiviert. Die Behandlung der cDC mit dem wässrigen Birkenpollenextrakt hatte unabhängig vom Maturationsgrad der cDC keinen Einfluss auf die IFN- $\gamma$  Produktion der OVA-spezifischen T Zellen (Abbildung 3.15 linke Spalte). Auf die IL-4 Produktion der DO11.10 T Zellen war ebenfalls kein Einfluss durch die *Bet.*-APE behandelten und maturierten cDC zu beobachten (Abbildung 3.15 B und C mittlere Spalte). Hingegen bewirkten die nicht aktivierten semi-maturen cDC nach Behandlung mit der höchsten *Bet.*-APE Konzentration eine nicht signifikante Hemmung der IL-4 Produktion der OVA-spezifischen T Zellen (Abbildung 3.15

A mittlere Spalte). Gleichzeitig war die IL-10 Produktion der DO11.10 Zellen nach Kokultur mit *Bet.*-APE behandelten, nicht aktivierten semi-maturen cDC in der geringsten und mittleren Konzentration nicht signifikant erhöht. Eine Induktion der IL-10 Produktion der OVA-spezifischen T Zellen ließ sich auch durch CpG 2216 aktivierte und mit *Bet.*-APE in der Konzentration 1 mg Pollen/ ml behandelte cDC beobachten (Abbildung 3.15 C rechte Spalte). Die durch LPS aktivierten und mit *Bet.*-APE behandelten cDC übten keinen wesentlichen Einfluss auf die IL-10 Produktion der DO11.10 T Zellen aus (Abbildung 3.15 B rechts).

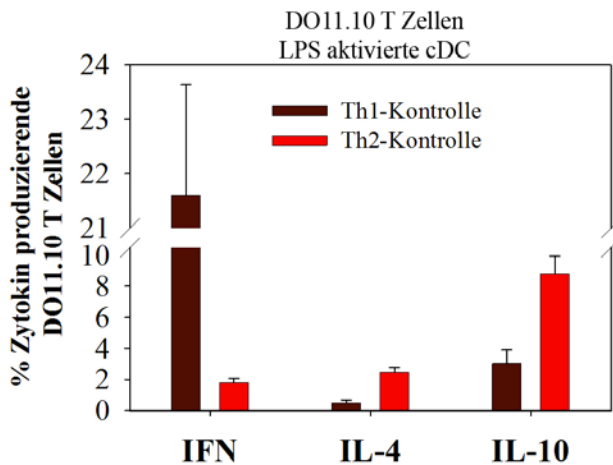


**Abbildung 3.15** Intrazelluläre Zytokinbestimmung in OVA-spezifischen DO11.10 T Zellen

Messung von intrazellulär akkumuliertem IFN- $\gamma$  (linke Spalte), IL-4 (mittlere Spalte) oder IL-10 (rechte Spalte) in OVA-spezifischen DO11.10 T Zellen nach 6-tägiger Kokultivierung mit cDC, die vorher für 20 h in Medium (A), mit LPS (B) oder CpG 2216 (C) aktiviert und zeitgleich mit steigender Konzentration von *Bet.*-APE stimuliert wurden. Die Daten zeigen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten mit dem entsprechenden SEM. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Keine Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zu den nicht stimulierten Proben ( $p > 0,05$ ).

Um zu verdeutlichen, dass das hier verwendete System sowohl in eine Th1 als auch Th2 Richtung polarisiert werden kann, wurden die Zellen unter Th1 oder Th2 begünstigenden Bedingungen

kultiviert. Abbildung 3.16 dokumentiert durch eine hohe Ausschüttung an IFN- $\gamma$  bei geringer Sekretion von IL-4 eine Th1 Polarisierung des antigenspezifischen Testsystems. Eine Th2 Polarisierung des Systems wurde durch einen Anstieg der IL-4 Produktion gegenüber neutral kultivierten Zellen (vgl. Abbildung 3.15 B mittlere Spalte) belegt. Gleichzeitig wurde durch das Th2 begünstigende Milieu ebenfalls ein deutlicher Anstieg des IL-10 verzeichnet.



**Abbildung 3.16 Intrazelluläre Zytokinbestimmung der Kontrolle zur Th1 und Th2 Polarisierung im antigenspezifischen DO11.10 T Zell-Kultursystem**

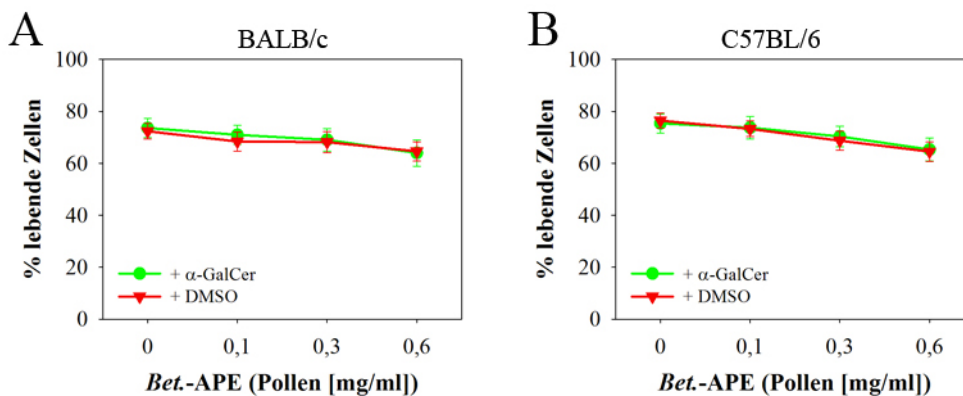
Messung von intrazellulär akkumuliertem IFN- $\gamma$ , IL-4 oder IL-10 in OVA-spezifischen DO11.10 T Zellen nach 6-tägiger Kokultivierung mit cDC in Anwesenheit entweder von rekombinantem IL-12 und  $\alpha$ -IL-4 AK (Th1-Kontrolle) oder rekombinantem IL-4 und  $\alpha$ -IL-12 AK (Th2-Kontrolle). Die cDC wurden vor der Kokultur für 20 h mit LPS aktiviert und mit *Bet.*APE (0,3 mg Pollen/ ml) stimuliert. Die Daten zeigen den Mittelwert aus zwei unabhängigen Experimenten mit dem entsprechenden SEM.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die Behandlung der OVA-beladenen cDC mit *Bet.*-APE keine eindeutige Th2 Polarisierung der OVA-spezifischen T Zellen bewirkte. Allerdings bedingten die *Bet.*-APE behandelten semi-maturen cDC eine leicht erhöhte IL-10 Produktion im antigenspezifischen Testsystem, was ein Hinweis auf eine mögliche tolerogene Wirkung der cDC sein könnte.

### 3.1.2.3. Einfluss von *Bet.*-APE auf NKT Zellen

Invariante NKT Zellen stellen eine Subpopulation der T Zellen dar. Durch ihren invarianten T Zell Rezeptor werden sie nicht wie üblich über Peptidpräsentation des MHC Klasse II Moleküls aktiviert, sondern erkennen bestimmte Lipide und Glykolipide, die von MHC Klasse I-ähnlichen CD1d Molekülen auf antigenpräsentierenden Zellen präsentiert werden.  $\alpha$ -GalCer ist ein solches Glycolipid. Es ist in der Lage, NKT Zellen sehr schnell zu aktivieren und zur Produktion von großen Mengen an inflammatorischen Zytokinen, wie z.B. IFN- $\gamma$  und IL-4, anzuregen, was eine rasche innate als auch adaptive Immunantwort bewirkt. Da der wässrige Birkenpollenextrakt Lipide

enthält, stellte sich die Frage, ob diese in der Lage sind, NKT Zellen vergleichbar wie  $\alpha$ -GalCer zu aktivieren und eine Zytokinsekretion zu induzieren. Der prozentuale Anteil an NKT Zellen in der Leber ist sehr hoch und beträgt zwischen 20-30% der Lymphozyten in der Leber. Da die Leber eine große Rolle im Fettstoffwechsel spielt und im wässrigen Birkenpollenextrakt bioaktive Lipidmediatoren enthalten sind, die nach Aufnahme des Pollens in die Leber gelangen und dort NKT Zellen aktivieren könnten, wurden zunächst NKT Zellen aus der Leber analysiert. Nach Isolierung von mononukleären Zellen aus der Leber wurden diese mit steigenden Konzentrationen von *Bet.*-APE für 62 h stimuliert. Nach den ersten 20 h wurden 5  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -GalCer bzw. 0,5% DMSO zu dieser Zellmischkultur gegeben, um die darin enthaltenen NKT Zellen zu aktivieren. Im ersten Schritt wurde analysiert, ob der wässrige Birkenpollenextrakt oder das  $\alpha$ -GalCer einen Einfluss auf die Vitalität der MNC der Leber hatten. Hierbei wurde der Anteil der lebenden Zellen anhand des Ausschlusses der toten Zellen mittels einer Propidiumiodid-Färbung im Durchflusszytometer bestimmt. Abbildung 3.17 zeigt den prozentualen Anteil an lebenden MNC von BALB/c (Abbildung 3.17 A) bzw. C57BL/6 (Abbildung 3.17 B) Lebern nach Inkubation mit steigenden Konzentrationen von *Bet.*-APE für 62 h. Es lässt sich deutlich erkennen, dass der wässrige Birkenpollenextrakt einen leicht toxischen Effekt sowohl auf die BALB/c als auch auf die C57BL/6 Zellen ausübte. Dies äußerte sich in einer Reduktion der lebenden  $\alpha$ -GalCer behandelten BALB/c Zellen von 73,6% (72,4% DMSO) auf 64,0% (64,6% DMSO) (Abbildung 3.17 A) sowie in einer Reduktion der lebenden  $\alpha$ -GalCer behandelten C57BL/6 Zellen von 75,4% (76,5% DMSO) auf 65,3% (64,5% DMSO) (Abbildung 3.17 B).



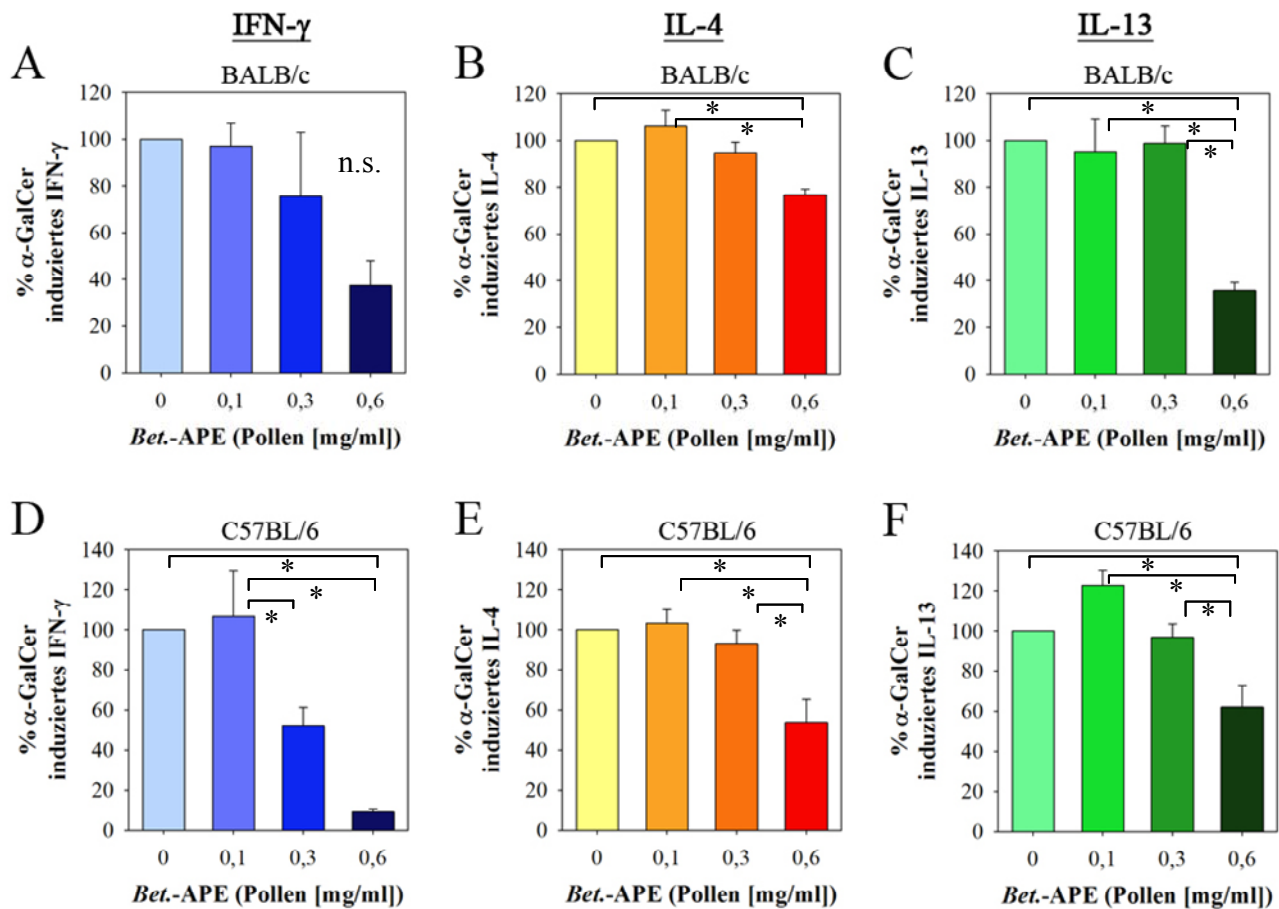
**Abbildung 3.17 Toxizität von *Bet.*-APE auf MNC der Leber**

Durchflusszytometrische Messung des prozentualen Anteils an lebenden Zellen anhand von PI-Färbung der *in vitro* stimulierten BALB/c (A) oder C57BL/6 (B) MNC der Leber. MNC der Leber wurden mit steigenden Konzentrationen von *Bet.*-APE für 62 h stimuliert. Nach den ersten 20 h der Inkubation wurden 5  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -GalCer (grüner Graph) oder 0,5% DMSO als Kontrolle (roter Graph) zugegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus fünf unabhängigen Experimenten mit dem entsprechenden SEM. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Keine Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zu den nicht stimulierten Proben ( $p > 0,05$ ).

Im zweiten Schritt wurde die Sekretion von IFN- $\gamma$ , IL-4 oder IL-13 nach Inkubation der BALB/c oder C57BL/6 MNC aus Lebern mit *Bet.*-APE untersucht (Abbildung 3.18). Die Inkubation der Zellen nur mit *Bet.*-APE ohne Aktivierung der NKT Zellen mit  $\alpha$ -GalCer bewirkte keine oder eine nahe der Detektionsgrenze liegende Induktion der gemessenen Zytokine (Daten siehe Kapitel 10.1), so dass davon auszugehen ist, dass keine Bestandteile des *Bet.*-APE direkt eine Aktivierung der NKT Zellen bedingten.

Allerdings ist ein deutlicher Einfluss des wässrigen Birkenpollenextrakts auf die  $\alpha$ -GalCer induzierte IFN- $\gamma$  Sekretion sowohl der BALB/c als auch der C57BL/6 NKT Zellen der Leber (Abbildung 3.18 A und D) zu beobachten. Insbesondere bei den C57BL/6 NKT Zellen ist eine signifikante dosisabhängige Hemmung durch *Bet.*-APE zu erkennen. Diese Inhibierung des IFN- $\gamma$  ist nicht auf die leicht toxischen Effekte zurückzuführen (vgl. Abbildung 3.17), da sowohl die  $\alpha$ -GalCer induzierte IL-4 (Abbildung 3.18 E) als auch die IL-13 (Abbildung 3.18 F) Sekretion der *Bet.*-APE behandelten C57BL/6 NKT Zellen kaum gehemmt wurden. Lediglich in der höchsten eingesetzten Konzentration des *Bet.*-APE war eine signifikant verminderte Sekretion dieser beiden Zytokine zu verzeichnen. Auch die BALB/c NKT Zellen sekretierten nach Behandlung mit der höchsten *Bet.*-APE Konzentration signifikant weniger IL-4 und IL-13 (Abbildung 3.18 B – C). Daraus lässt sich eine Dominanz der Th2-Zytokine in diesem Testsystem ableiten, was auf eine Netto Th2 Polarisierung der NKT Zellen durch Behandlung mit dem wässrigen Pollenextrakt hindeutet (Daten siehe Kapitel 10.1).





**Abbildung 3.18 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand von MNC der Leber nach Stimulation mit *Bet.-APE***

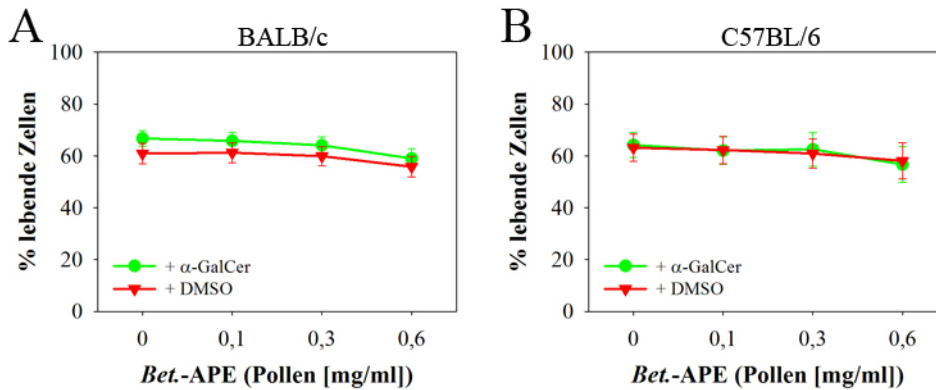
Messung der Zytokine IFN- $\gamma$  (A, D), IL-4 (B, E) und IL-13 (C, F) mittels ELISA im Zellkulturüberstand von BALB/c (A – C) oder C57BL/6 (D – F) MNC der Leber nach Stimulation der Zellen mit steigenden Konzentrationen von *Bet.-APE* für 62 h. Nach den ersten 20 h der Inkubation erfolgte die Zugabe von 5  $\mu\text{g/ml}$   $\alpha\text{-GalCer}$ . Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit dem jeweiligen SEM. Zur Normierung der Experimente wurden die Messwerte als prozentualer Anteil an  $\alpha\text{-GalCer}$  induziertem Zytokin dargestellt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet (n.s.: nicht signifikant).

Nun folgte die Analyse der NKT Zellen der Milz. Der Anteil der NKT Zellen an Lymphozyten in der Milz mit 0,5 – 2% ist im Vergleich zur Leber relativ gering. Jedoch stellt die Aktivierung der T Lymphozyten durch Erkennung von Antigenen mittels T Zell-Rezeptoren und somit die Aktivierung der adaptiven Immunantwort eine wichtige Funktion der Milz dar. Hier wurde ebenfalls der Einfluss von *Bet.-APE* auf die Aktivierung der NKT Zellen in der Milz anhand der Sekretion der Th1- und Th2-dominierenden Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-13 untersucht.

Zunächst wurde wie bei der Analyse der Leber MNC der toxische Effekt des *Bet.-APE* auf Milz MNC analysiert. Auch hier zeigte sich ein leicht toxischer Effekt des *Bet.-APE* sowohl auf die



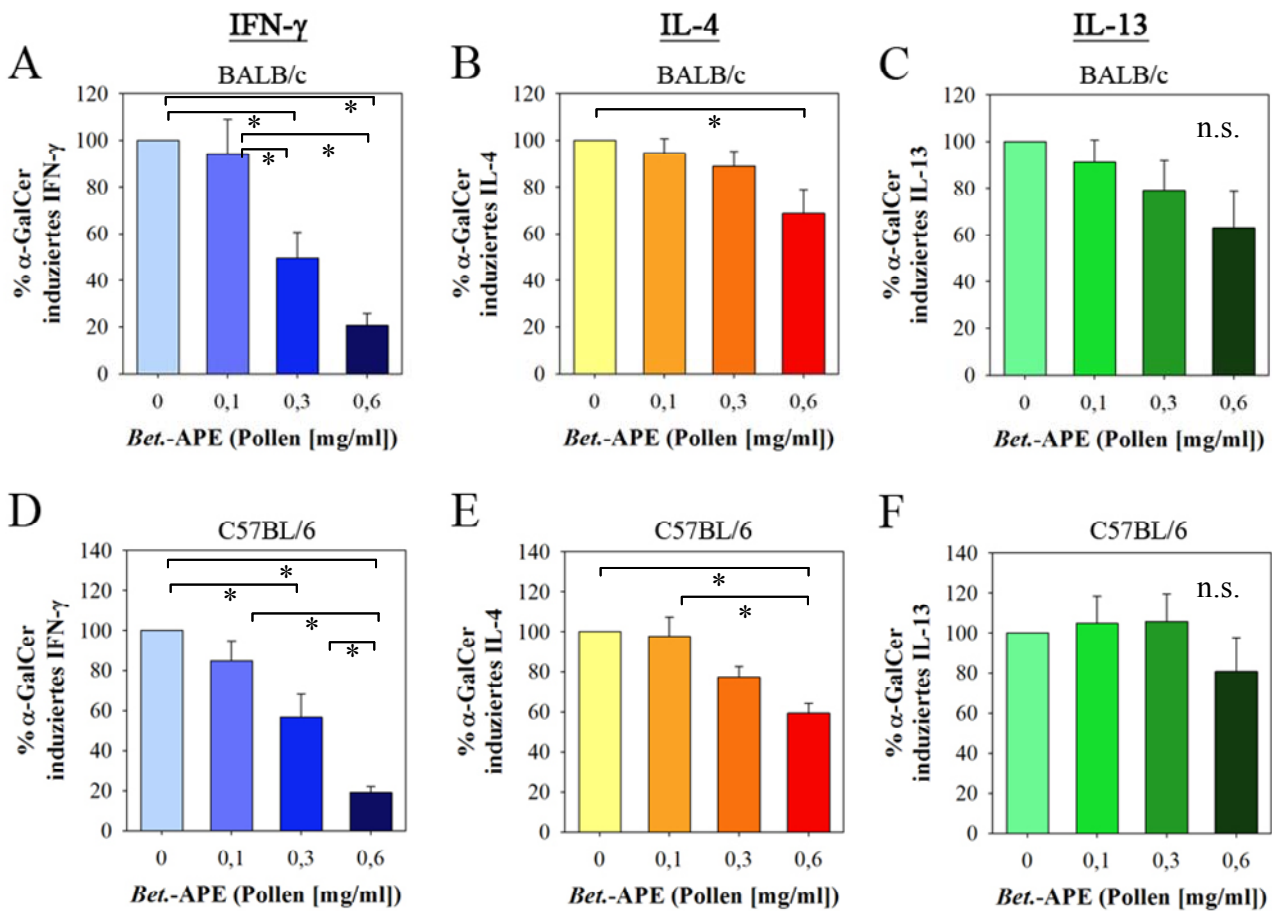
BALB/c als auch auf die C57BL/6 Zellen, was sich in einer Abnahme der lebenden  $\alpha$ -GalCer behandelten BALB/c Zellen von 66,7% (60,9% DMSO) auf 59,0% (55,8% DMSO) (Abbildung 3.19 A) und in einer Abnahme der lebenden  $\alpha$ -GalCer behandelten C57BL/6 Zellen von 64,2% (63,2% DMSO) auf 56,7% (58,1% DMSO) (Abbildung 3.19 B) bemerkbar machte.



**Abbildung 3.19 Toxizität von *Bet.-APE* auf MNC der Milz**

Durchflusszytometrische Messung des prozentualen Anteils an lebenden Zellen anhand von PI-Färbung der *in vitro* stimulierten BALB/c (A) oder C57BL/6 (B) MNC der Milz. MNC der Milz wurden mit steigenden Konzentrationen von *Bet.-APE* für 62 h stimuliert. Nach den ersten 20 h der Inkubation wurden 5  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -GalCer (grüner Graph) oder 0,5% DMSO als Kontrolle (roter Graph) zugegeben. Dargestellt sind die Mittelwerte aus sechs unabhängigen Experimenten mit dem entsprechenden SEM. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Keine Analyse ergab einen signifikanten Unterschied zu den nicht stimulierten Proben ( $p > 0,05$ ).

Bei der Analyse der  $\alpha$ -GalCer induzierten Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-13 in BALB/c MNC der Milz bei gleichzeitiger Stimulation mit steigenden Konzentrationen von *Bet.-APE* (Abbildung 3.20 A – C) war ein deutlicher Einfluss des wässrigen Pollenextrakts zu beobachten. Er äußerte sich darin, dass die  $\alpha$ -GalCer induzierte IFN- $\gamma$  Sekretion signifikant dosisabhängig gehemmt wurde (Abbildung 3.20 A). Gleichzeitig war eine leicht verminderte Sekretion des IL-4 und IL-13 zu beobachten, wovon allerdings nur die höchste Konzentration von *Bet.-APE* eine signifikante Hemmung des IL-4 bewirkte (Abbildung 3.20 B und C). Vergleichbare Beobachtungen konnten bei der Analyse der C57BL/6 MNC der Milz (Abbildung 3.20 D – F) gemacht werden (Daten siehe Kapitel 10.1). Wie bereits bei den NKT Zellen der Leber beschrieben, ist auch bei den NKT Zellen der Milz eine Netto Th2 Polarisierung durch *Bet.-APE* zu verzeichnen.



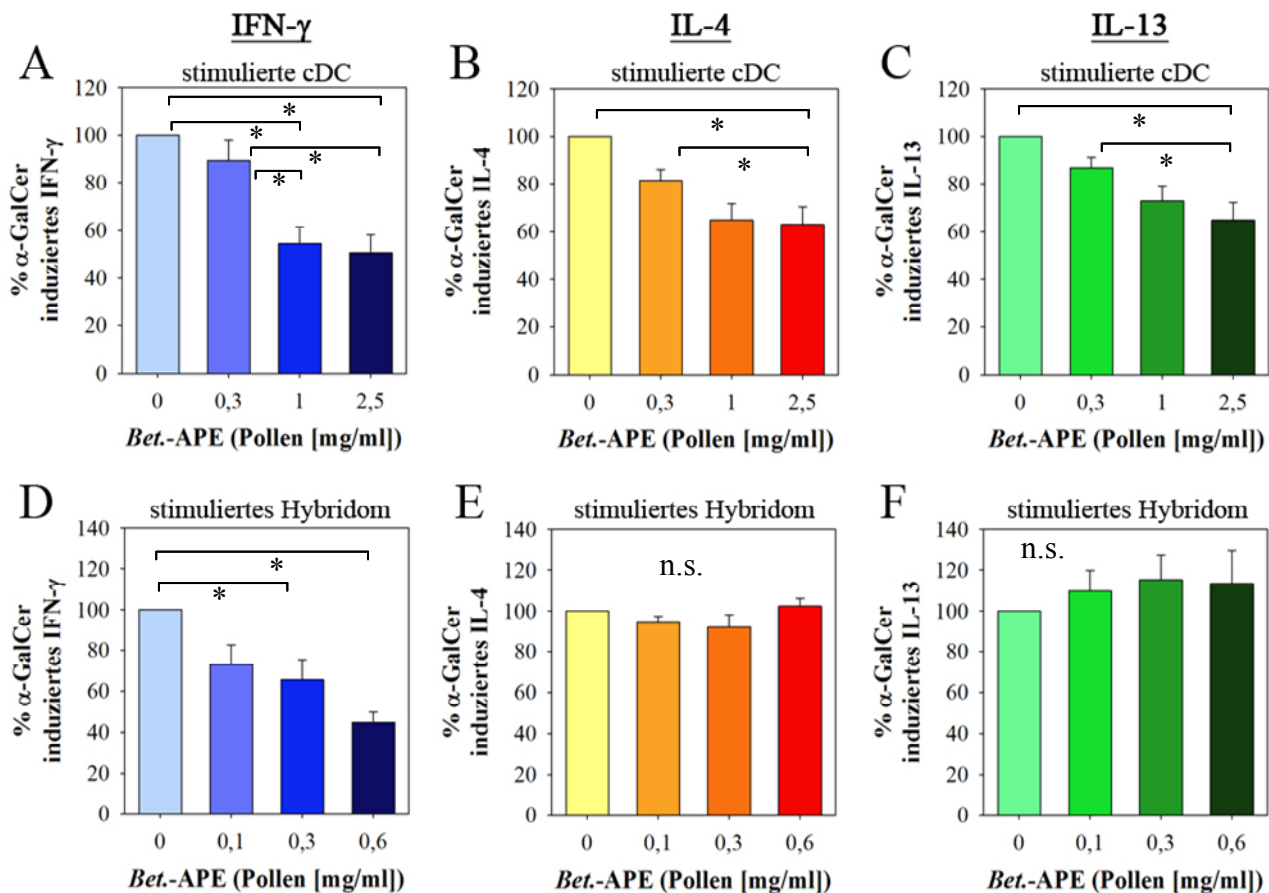
**Abbildung 3.20** Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand von MNC der Milz nach Stimulation mit *Bet.-APE*

Messung der Zytokine IFN- $\gamma$  (A, D), IL-4 (B, E) und IL-13 (C, F) mittels ELISA im Zellkulturüberstand von BALB/c (A - C) oder C57BL/6 (D - F) MNC der Milz nach Stimulation der Zellen mit steigenden Konzentrationen von *Bet.-APE* für 62 h. Nach 20 h der Inkubation erfolgte die Zugabe von 5  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -GalCer. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens fünf unabhängigen Experimenten mit dem jeweiligen SEM. Zur Normierung der Experimente wurden die Messwerte als prozentualer Anteil an  $\alpha$ -GalCer induziertem Zytokin dargestellt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet (n.s.: nicht signifikant).

#### 3.1.2.4. Direkter und indirekter Einfluss von *Bet.-APE* auf ein NKT Zell Hybridom

Die beobachtete immunmodulatorische Wirkung des *Bet.-APE* auf MNC in Leber und Milz ließ sich bisher nicht eindeutig auf eine direkte Wirkung des *Bet.-APE* auf die NKT Zellen reduzieren. Es ist denkbar, dass die beobachteten Effekte durch andere Zellpopulationen wie z.B. APC in der untersuchten Mischkultur vermittelt wurden. Zur Beantwortung dieser Fragestellung wurde das NKT Zell Hybridom DN32.D3 direkt mit  $\alpha$ -GalCer beladenen cDC kokultiviert und die sekretierten Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-13 im Zellkulturüberstand analysiert. Hierbei wurden vor der Kokultur

entweder die cDC (Abbildung 3.21 A - C) oder das Hybridom DN32.D3 (Abbildung 3.21 D - F) für 20 h mit verschiedenen Konzentrationen von *Bet.*-APE stimuliert.



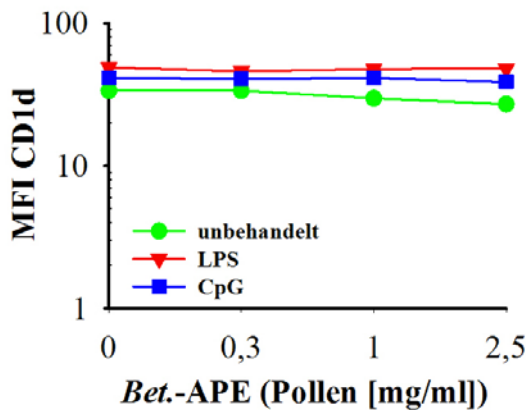
**Abbildung 3.21 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand von DN32.D3 Zellen nach Kokultur mit  $\alpha$ -GalCer beladenen cDC +/- *Bet.*-APE**

Messung der Zytokine IFN- $\gamma$  (A/ D), IL-4 (B/ E) und IL-13 (C/ F) mittels ELISA im Zellkulturüberstand vom NKT Zell Hybridom DN32.D3 nach 24 h Kokultivierung mit C57BL/6 cDC. Vor der Kokultur wurden entweder die cDC (A – C) oder das Hybridom DN32.D3 (D – F) für 20 h mit steigenden Konzentrationen von *Bet.*-APE stimuliert. Während der letzten 5 h vor der Kokultur erfolgte die Zugabe von 5  $\mu$ g/ml  $\alpha$ -GalCer zu den cDC. Dargestellt sind die Mittelwerte aus mindestens drei unabhängigen Experimenten mit dem jeweiligen SEM. Zur Normierung der Experimente wurden die Messwerte als prozentualer Anteil an  $\alpha$ -GalCer induziertem Zytokin dargestellt. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet (n.s.: nicht signifikant).

Bei Betrachtung der Zytokinsekretion des Hybridoms nach Kokultur mit  $\alpha$ -GalCer beladenen und mit *Bet.*-APE stimulierten cDC zeigte sich deutlich, dass die untersuchten Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-13 mit steigender Konzentration von *Bet.*-APE in ähnlichem Maße signifikant abnahmen (Abbildung 3.21 A – C). Dieser Effekt läßt auf eine ungerichtete Herunterregulation der Zytokine schließen. Im Gegensatz dazu ergab die Analyse der Zytokine des mit *Bet.*-APE vorstimulierten Hybridoms zwar ebenfalls eine signifikante Reduktion der IFN- $\gamma$  Sekretion (Abbildung 3.21 D),

jedoch blieb die Zytokinsekretion von IL-4 und IL-13 nach Stimulation mit *Bet.*-APE unbeeinflusst (Abbildung 3.21 E und F). Anhand der Abnahme des Th1-dominierenden Zytokins IFN- $\gamma$ , aber der unbeeinflussten Sekretion der Th2-dominierenden Zytokine IL-4 und IL-13, lässt sich nach direkter Stimulation des NKT Zell Hybridoms mit *Bet.*-APE eine Verschiebung des Th1/ Th2 Gleichgewichts in Richtung Th2 ablesen.

Da die mit *Bet.*-APE vorbehandelten cDC eine ungerichtete Herunterregulation aller analysierten Zytokine des Hybridoms DN32.D3 bewirkten, stellte sich die Frage, ob der wässrige Pollenextrakt die Expression der CD1d-Moleküle auf der Zelloberfläche der cDC veränderte und somit weniger  $\alpha$ -GalCer zur Aktivierung der NKT Zellen präsentiert wurde. Die Analyse der Expression von CD1d auf den cDC nach *Bet.*-APE Behandlung zeigte jedoch, dass weder bei den semi-maturen noch bei den aktivierten cDC die Expression des CD1d beeinflusst wurde (Abbildung 3.22).



**Abbildung 3.22 Analyse der Expression von CD1d auf C57BL/6 cDC nach *Bet.*-APE Behandlung**

Durchflusszytometrische Messung der Expression von CD1d auf *in vitro* stimulierten C57BL/6 cDC, dargestellt als mittlere Fluoreszenzintensität (MFI). cDC wurden während der Aktivierung mit LPS (roter Graph) oder CpG 2216 (blauer Graph) oder unbehandelt (grüner Graph) mit steigenden Konzentrationen von *Bet.*-APE für 20 h stimuliert. Dargestellt sind die Mittelwerte von zwei Experimenten mit dem jeweiligen SEM. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test und ergab für alle Analysen keine signifikanten Unterschiede ( $p > 0,05$ ).

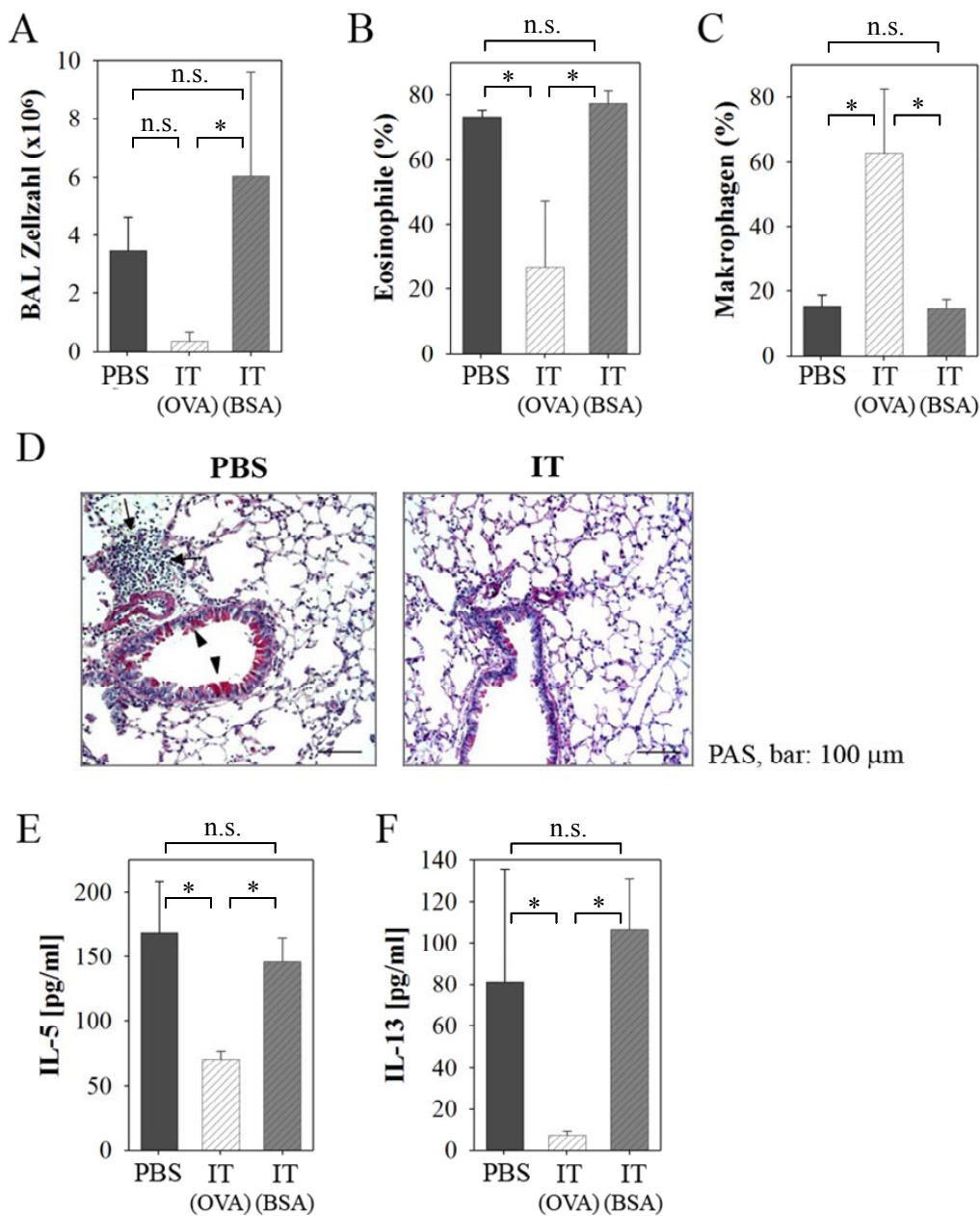
## 3.2. Charakterisierung eines murinen Hyposensibilisierungsmodells

### 3.2.1. Antigen-spezifische Wirkung der Hyposensibilisierung in C57BL/6 wt Mäusen

Die antigen-spezifische Hyposensibilisierung ist die bisher einzige kausale Behandlungsmethode für Typ 1 Allergien. Die genauen Mechanismen sind bisher nicht vollständig geklärt. Zur Aufklärung dieser Wirkmechanismen sind Tiermodelle hilfreich, da in ihnen die Komplexität der Immunantwort anhand von *knock out* Mauslinien untersucht werden kann. Ein murines Modell in BALB/c-Mäusen zur spezifischen Immuntherapie wurde von Van Oosterhout et al. 1998 etabliert [323]. Dieses Modell wurde adaptiert und für die Wirksamkeit in C57BL/6-Mäusen optimiert. Die Tiere wurden zunächst sensibilisiert und anschließend einer Hochdosis-IT unterzogen. Nachfolgend wurden die Mäuse dreimal mit OVA-Aerosol provoziert. Um zu belegen, dass die beobachteten Effekte der IT antigen-spezifisch auf das OVA zurückzuführen sind, wurde zum einen eine Gruppe mit bovinem Serumalbumin (BSA) als antigen-unspezifisches Kontrollprotein während der IT behandelt und zum anderen wurde einer Gruppe PBS als neutrale Kontrollsubstanz injiziert.

Abbildung 3.23 zeigt die Analysen der BAL-Flüssigkeit und der histologischen Lungenpräparate nach erfolgreicher Hyposensibilisierung. Es ist in Abbildung 3.23 A zu erkennen, dass die OVA-IT-Gruppe (IT OVA) im Vergleich zur Kontrollgruppe (PBS) und zur BSA-IT-Gruppe (IT BSA) als Zeichen einer geringeren Inflammation eine deutlich geringere Zellzahl in der BAL-Flüssigkeit aufwies. Die Wirksamkeit der IT spiegelte sich ebenfalls im prozentualen Anteil an Eosinophilen in der BALF (Abbildung 3.23 B) wider. Hier zeigte sich eine signifikant geringere Infiltration mit Eosinophilen nach OVA-spezifischer IT. Die beiden Kontrollgruppen (PBS und IT mit BSA) wiesen hohe Anteile an Eosinophilen auf (Abbildung 3.23 B), wohingegen der prozentuale Anteil an Makrophagen im Verhältnis zu der OVA-IT-Gruppe signifikant geringer ausfiel (Abbildung 3.23 C). Der Großteil der Zellen in der BALF von Tieren, die eine OVA-spezifische IT erhalten hatten, waren Makrophagen (Abbildung 3.23 C).

Die Wirksamkeit der IT konnte durch histologische Analysen der Lunge bestätigt werden (Abbildung 3.23 D). So war in der Kontrollgruppe mit PBS ein inflammatorisches Infiltrat am Rande der Bronchien (Pfeile im linken Bild), sowie eine verstärkte Mukusproduktion in den Bronchien zu erkennen (Pfeilspitzen im linken Bild). Diese inflammatorischen Merkmale waren nach erfolgreicher antigen-spezifischer IT kaum zu beobachten (Abbildung 3.23 D rechtes Bild). Die Analyse der Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 in der BALF (Abbildung 3.23 E – F) unterstrich die bisher beschriebenen Effekte. Dies äußerte sich in einer signifikant reduzierten Sekretion von IL-5 und IL-13 nach erfolgreicher OVA-IT.

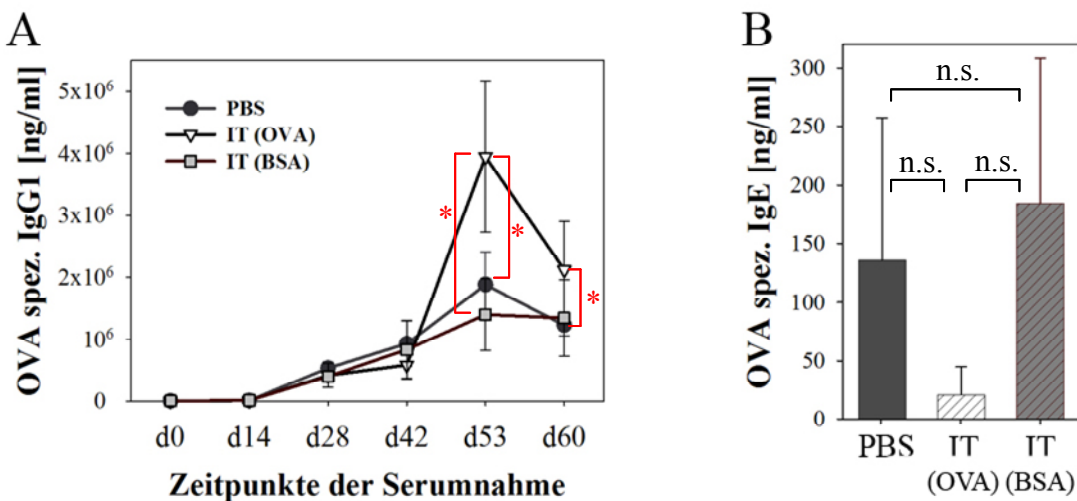


**Abbildung 3.23** Analyse der Atemwegsentzündung von C57BL/6 wt Mäusen nach Immuntherapie

C57BL/6 wt Mäuse wurden auf OVA sensibilisiert, anschließend mit einer OVA-spezifischen IT (IT OVA) oder einer unspezifischen IT mit BSA behandelt (IT BSA). Eine Kontrollgruppe wurde mit dem Lösungsmittel PBS (PBS) behandelt. Die Gesamtzellzahl der BALF wurde bestimmt (A). Aus Zellen der BALF wurden Cytospins angefertigt, mittels Diff-Quik angefärbt und pro Probe mind. 400 Zellen ausgezählt (B: prozentualer Anteil an Eosinophilen in BALF, C: prozentualer Anteil an Makrophagen in BALF). Lungenhistologische Schnitte von IT-behandelten Tieren (D, rechte Abbildung IT) und Kontrolltieren (D, linke Abbildung PBS) wurden mit PAS angefärbt. Die Konzentrationen der Zytokine IL-5 (E) und IL-13 (F) wurden in BALF mittels ELISA bestimmt. Die dargestellten Daten für die PBS-Kontrollgruppe und für die OVA-IT-Gruppe repräsentieren eine Reihe von fünf unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils mindestens vier Tieren pro Gruppe. Der Versuch mit der antigenunspezifischen BSA-IT wurde einmal mit fünf Tieren durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert der entsprechenden Gruppen mit der korrespondierenden SD. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet (n.s.: nicht signifikant).



In Abbildung 3.24 wurden OVA-spezifische Immunglobulinspiegel im Serum der Mäuse dokumentiert. Vom OVA-spezifischen IgG1 wurde ein Zeitverlauf dargestellt (Abbildung 3.24 A), da dieses Immunglobulin einen Anhaltspunkt für den Grad der Th2 Sensibilisierung bietet. Ein weiteres Merkmal der allergischen Immunantwort stellt die Bildung des OVA-spezifischen IgE dar. Dieses ist in den Th1-gerichteten C57BL/6-Mäusen im Vergleich zu den BALB/c-Mäusen nur in geringen Mengen detektierbar, so dass es häufig erst nach der OVA-Provokation messbar wird. Aus diesem Grund wurde das OVA-spezifische IgE ausschließlich nach der OVA-Provokation am Ende des Protokolls bestimmt (Abbildung 3.24 B). Bei den Kontrolltieren zeigte sich über den Zeitraum des Experiments ein kontinuierlicher Anstieg des OVA-spezifischen IgG1 mit einem leichten Abfall nach der OVA-Provokation (Abbildung 3.24 A, PBS-Kontrolle: dunkelgrau gefüllte Kreise; IT BSA: grau gefüllte Quadrate). Ein signifikanter Anstieg des OVA-spezifischen IgG1 war nach der OVA-IT im Vergleich zu den Kontrollgruppen zu beobachten, gefolgt von einem Rückgang nach der OVA-Provokation (Abbildung 3.24 A, IT OVA: offene Dreiecke). Das OVA-spezifische IgE der analysierten Gruppen fügte sich in das Bild der wirksamen IT ein (Abbildung 3.24 B). Bei der Gruppe der OVA-spezifischen IT war keine Induktion des OVA-spezifischen IgE zu beobachten (IT OVA). Im Gegensatz dazu zeigten beide Kontrollgruppen (PBS; IT BSA) einen Anstieg des OVA-spezifischen IgE.



**Abbildung 3.24 Bestimmung von OVA-spezifischen Immunglobulinen in Serum von C57BL/6 wt Mäusen**

C57BL/6 wt Mäuse wurden auf OVA sensibilisiert und anschließend mit einer OVA-spezifischen IT (IT OVA) oder einer unspezifischen IT mit BSA behandelt (IT BSA). Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten PBS (PBS). Es wurde der Zeitverlauf des OVA-spezifischen IgG1 (A), sowie das OVA-spezifische IgE (B) im Serum an d60 des Protokolls mittels ELISA bestimmt. Die dargestellten Daten für die PBS-Kontrollgruppe und für die OVA-IT-Gruppe repräsentieren eine Reihe von fünf unabhängig durchgeführten Experimenten mit jeweils mindestens vier Tieren pro Gruppe. Der Versuch mit der antigenunspezifischen BSA-IT wurde einmal mit fünf Tieren durchgeführt. Dargestellt ist der Mittelwert der entsprechenden Gruppen mit der korrespondierenden SD. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer Two-Way ANOVA mit einem Bonferroni Post Hoc Test und für das OVA-spezifische IgE anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet (n.s.: nicht signifikant).

Zusammenfassend lässt sich für die Wirksamkeit der IT bei C57BL/6 wt sagen, dass alle untersuchten Parameter auf eine Hemmung der Th2-gerichteten Immunantwort deuten. Der Mechanismus der IT ist antigenspezifisch vermittelt, da das BSA als unspezifisches Kontrollprotein keine Auswirkung auf den Ausgang der IT hatte.

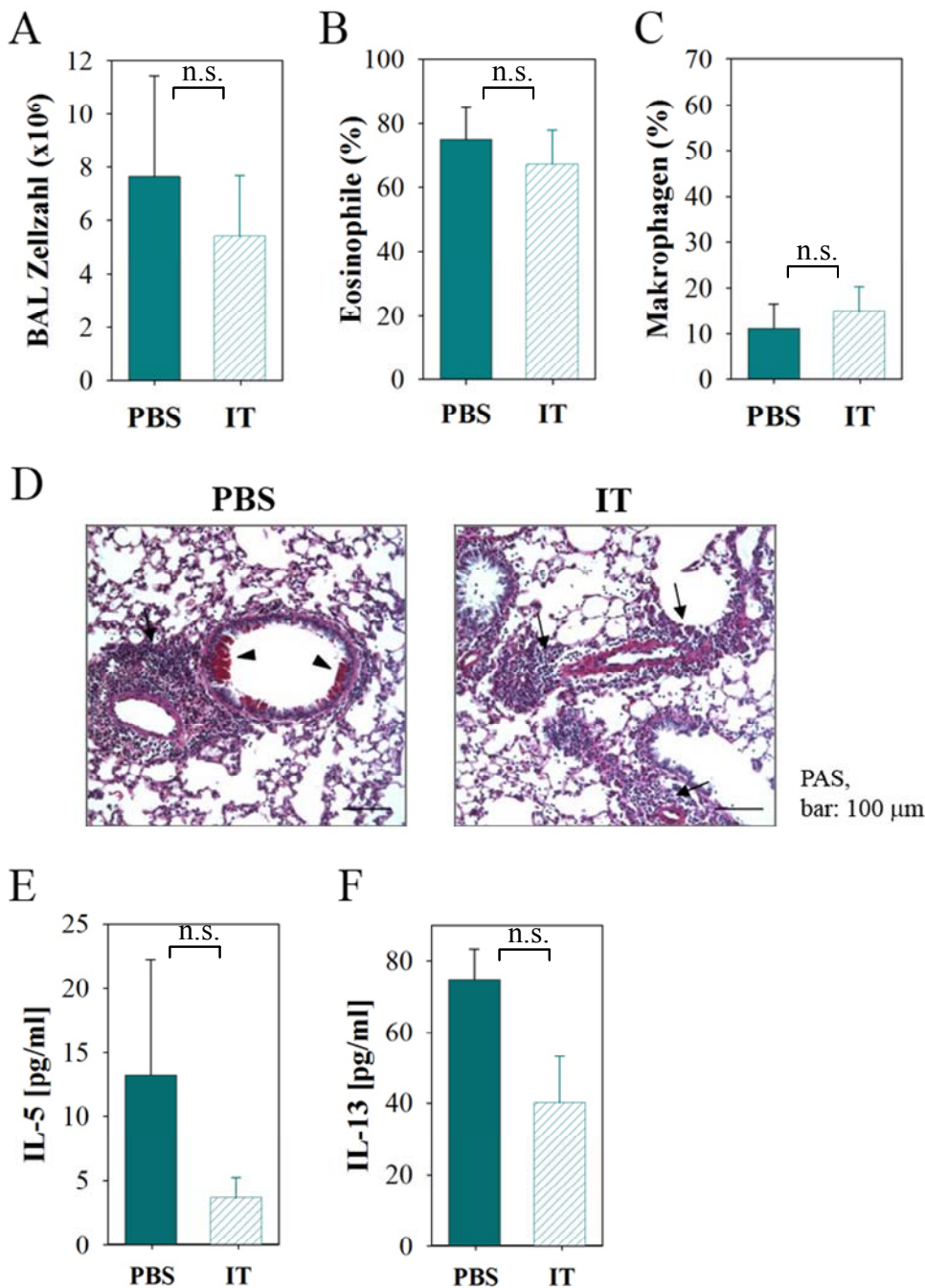
### **3.2.2. Die Rolle von IL-10 auf die Wirkung der Immuntherapie**

Zahlreiche Publikationen haben bereits gezeigt, dass das Zytokin IL-10 eine wichtige Rolle bei der Toleranzentstehung und -erhaltung spielt [15, 16, 33, 100, 164, 244, 249]. Zur Bestätigung dieser Daten wurde die Wirkung des für C57BL/6 adaptierten Hyposensibilisierungsmodells an C57BL/6 IL-10 k.o.-Mäusen untersucht.

Abbildung 3.25 umfasst die Analysen der BAL-Flüssigkeit und der Lungenhistologie mit IT behandelte C57BL/6 IL-10 k.o. Tiere. Es zeigte sich deutlich, dass die absoluten Zellzahlen unabhängig von der applizierten IT hoch waren (Abbildung 3.25 A). Auch der prozentuale Anteil der Eosinophilen und Makrophagen in der BAL-Flüssigkeit blieb durch die IT im Vergleich zur Kontrollgruppe unbeeinflusst (Abbildung 3.25 B – C). Im Vergleich zu den Daten der wt Mäuse aus Abbildung 3.25 A – C wiesen die OVA-IT behandelte IL-10 k.o. Tiere signifikant erhöhte Werte auf. Auffällig war, dass im Verlauf der OVA-IT 40 - 53% der IL-10 k.o. Tiere jeweils kurz nach einer Injektion starben. Diese Letalität wurde bei keinen weiteren analysierten Mauslinien beobachtet. Möglicherweise steigt mit der Abwesenheit von IL-10 die Wahrscheinlichkeit, einen anaphylaktischen Schock zu erleiden.

Unterstützend zu den Daten der BALF zeigte die histologische Analyse der Lunge ebenfalls keinen positiven Einfluss der Hyposensibilisierung auf die Entstehung einer Infammation in der Lunge (Abbildung 3.25 D). Die peribronchialen Infiltrate (Pfeile) waren in den Präparaten beider Gruppen deutlich zu erkennen. Bei Betrachtung der analysierten Zytokine IL-5 und IL-13 in der BALF (Abbildung 3.25 E – F) war nach der IT eine nicht signifikante Reduktion zu beobachten. Hierbei ist zu beachten, dass die detektierten IL-5-Mengen knapp oberhalb der Detektionsgrenze waren und die Reduktion des IL-13 im Vergleich zu den C57BL/6 wt (Abbildung 3.25 F) gering ausfiel.

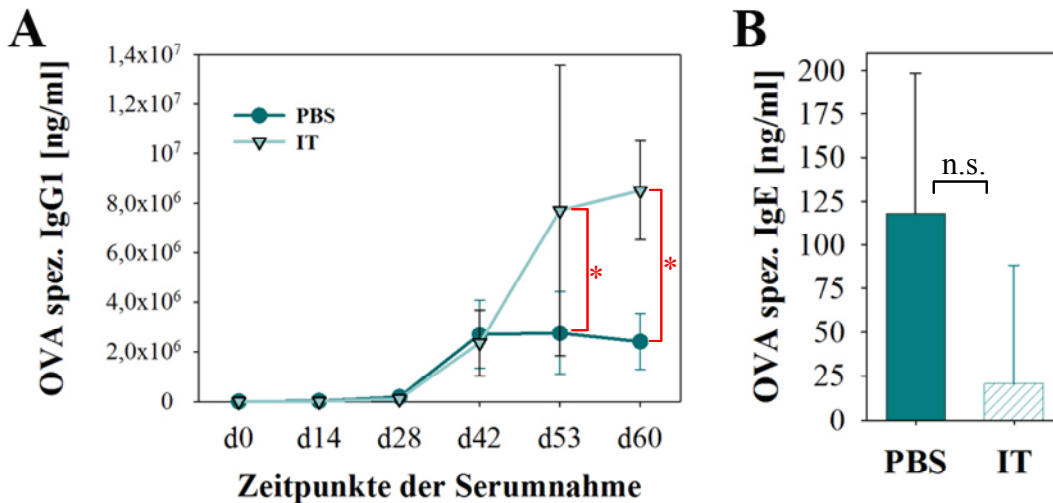




**Abbildung 3.25 Analyse der Atemwegsentzündung von C57BL/6 IL-10 k.o. Mäusen nach Immuntherapie**

C57BL/6 IL-10 k.o. Mäuse wurden auf OVA sensibilisiert und anschließend mit einer OVA-spezifischen IT behandelt (IT). Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten PBS (PBS). Die Gesamtzellzahl der BALF wurde bestimmt (A). Aus Zellen der BALF wurden Cytospins angefertigt, mittels Diff-Quik angefärbt und pro Probe mind. 400 Zellen ausgezählt (B: prozentualer Anteil an Eosinophilen in BALF, C: prozentualer Anteil an Makrophagen in BALF). Lungenhistologische Schnitte von IT-behandelten Tieren (D, rechte Abbildung IT) und Kontrolltieren (D, linke Abbildung PBS) wurden mit PAS angefärbt. Die Konzentrationen der Zytokine IL-5 (E) und IL-13 (F) wurden in BALF mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert aus mindestens sechs Tieren pro Gruppe mit der entsprechenden SD eines repräsentativen Experiments von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Es wurden keine signifikanten Unterschiede (n.s.: nicht signifikant;  $p > 0,05$ ) detektiert.

Die Analyse der OVA-spezifischen Immunglobuline im Serum der C57BL/6 IL-10 k.o. ist in Abbildung 3.26 dargestellt. Das OVA-spezifische IgG1 ist im Zeitverlauf des gesamten Versuchsprotokolls bestimmt worden. Es zeigte sich wie bei den C57BL/6 wt Mäusen, dass das OVA-spez. IgG1 nach Applikation der OVA-IT bei den C57BL/6 IL-10 k.o. stark anstieg, jedoch nicht wie bei den C57BL/6 wt Tieren während der OVA-Provokation abfiel, sondern signifikant hoch blieb (Abbildung 3.26 A). Das OVA-spezifische IgE wurde wie bei den C57BL/6 wt Mäusen nach erfolgter OVA-IT durch die OVA-Provokation nicht induziert (Abbildung 3.26 B).



**Abbildung 3.26 Bestimmung von Immunglobulinen in Serum von C57BL/6 IL-10 k.o. Mäusen**

C57BL/6 IL-10 k.o. Mäuse wurden auf OVA sensibilisiert und anschließend mit einer OVA-spezifischen IT (IT) behandelt. Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten PBS (PBS). Es wurde der Zeitverlauf des OVA-spezifischen IgG1 (A) sowie das OVA-spezifische IgE (B) im Serum an d60 des Protokolls mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert aus mindestens sechs Tieren pro Gruppe mit der entsprechenden SD eines repräsentativen Experiments von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse der Daten erfolgte für das OVA-spezifische IgG1 anhand einer Two-Way ANOVA mit einem Bonferroni Post Hoc Test und für das OVA-spezifische IgE anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet (n.s.: nicht signifikant).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die C57BL/6 IL-10 k.o. Mäuse auch nach erfolgter IT eine starke Inflammation der Lunge aufwiesen und somit IL-10 eine große Rolle bei der Wirksamkeit der IT spielt. Die untersuchten Th2 Zytokine der BALF wurden geringfügig durch die Hyposensibilisierung beeinflusst. Die analysierten OVA-spezifischen Immunglobuline, insbesondere das IgE, sprachen in vergleichbarer Weise wie bei den wt auf die IT an.

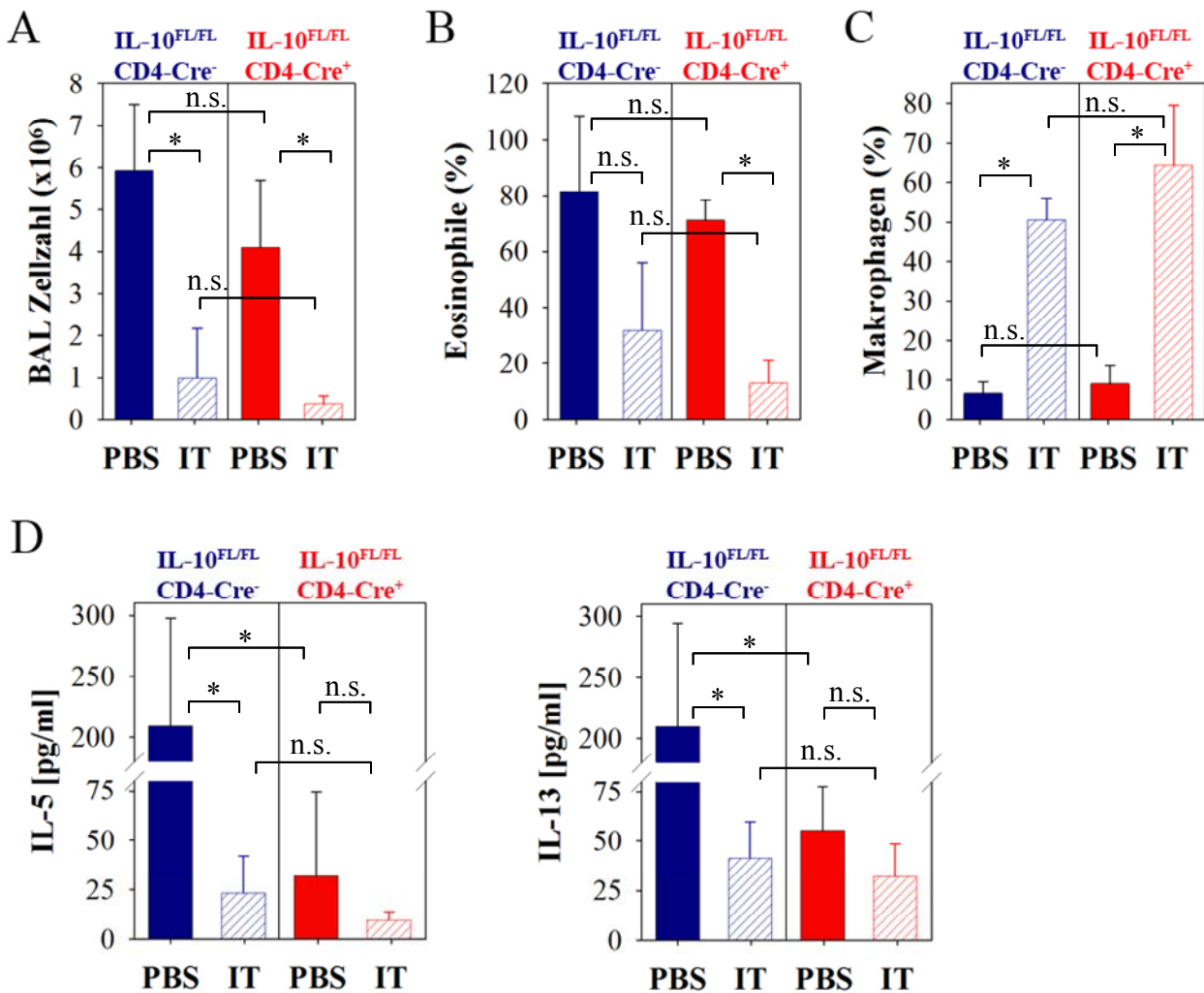
### 3.2.3. Die Rolle von T Zell produziertem IL-10 auf die Hyposensibilisierung

Wie in Kapitel 3.2.2 gezeigt wurde, spielt IL-10 bei der Wirksamkeit der Hyposensibilisierung eine wichtige Rolle. Zum Verständnis des Mechanismus der IT stellt sich nun die Frage, welche

Zellpopulation das für den Erfolg der IT verantwortliche IL-10 produziert. Viele Studien schreiben regulatorischen T Zellen eine Aufgabe in der Toleranzentstehung und -erhaltung zu. Um einen direkten Effekt des aus T Zellen stammenden IL-10 zu analysieren, wurden Mäuse mit einer selektiven Deletion des IL-10-Gens in allen T Zellen einer IT unterzogen. Zur selektiven Deletion des IL-10-Gens wurde das Cre-LoxP-System verwendet. Die Cre-Rekombinase wird spezifisch unter dem CD4-Promotor exprimiert und schneidet das gefloxt IL-10-Gen in den CD4-exprimierenden Zellen heraus.

In Abbildung 3.27 sind die Analysen der Lungeninflammation der C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> Cre<sup>-</sup> (funktioneller wt) und C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> (IL-10 defiziente T Zellen) Mäuse nach OVA-IT zusammengestellt. Der funktionelle wt C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> Cre<sup>-</sup> verhielt sich nach der IT wie die in Kapitel 3.2.1 untersuchten wt Mäuse. Entgegen der Erwartungen sprachen die C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäuse ebenfalls auf die IT an. Dies ist an der stark reduzierten absoluten BAL Zellzahl zu erkennen (Abbildung 3.27 A, rot gestreifter Balken). Die erfolgreiche Hyposensibilisierung spiegelte sich ebenfalls im verminderten prozentualen Anteil an Eosinophilen und im erhöhten prozentualen Anteil an Makrophagen wider (Abbildung 3.27 B - C, rot gestreifte Balken).

Die Analyse der Th2 Zytokine IL-5 und IL-13 in der BALF ergab, dass der funktionelle wt sich vom realen wt nicht unterschied (vgl. Kapitel 3.2.1). Beide Zytokine wurden in den Kontrolltieren stark, nach der IT aber signifikant vermindert sekretiert (Abbildung 3.27 D – E, PBS: dunkelblaue Balken; IT: dunkelblau gestreifte Balken). Bei den funktionellen *knock out* Mäusen C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> war im Vergleich zu den funktionellen wt eine signifikant geringere IL-5 und IL-13 Menge in der BALF der sensibilisierten Kontrolltiere detektierbar (Abbildung 3.27 D – E, PBS: rote Balken). Dennoch war hier nach der IT eine weitere Reduktion dieser Zytokine zu verzeichnen (Abbildung 3.27 D - E, IT: rot gestreifte Balken).

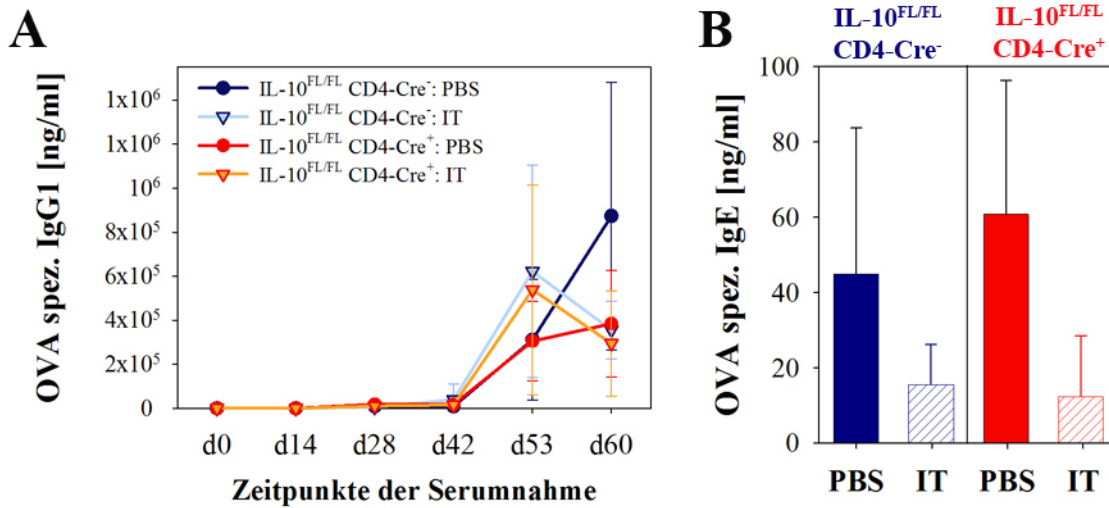


**Abbildung 3.27** Analyse der Atemwegszündung von C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> Cre<sup>-</sup> und C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäuse nach Immuntherapie

C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> und C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> Cre<sup>-</sup> Mäuse wurden auf OVA sensibilisiert und anschließend mit einer OVA-spezifischen IT behandelt (IT). Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten PBS (PBS). Die Gesamtzellzahl der BALF wurde bestimmt (A). Aus Zellen der BALF wurden Cytospins angefertigt, mittels Diff-Quik angefärbt und pro Probe mind. 400 Zellen ausgezählt (B: prozentualer Anteil an Eosinophilen in BALF, C: prozentualer Anteil an Makrophagen in BALF). Die Konzentrationen der Zytokine IL-5 (D) und IL-13 (E) wurden in BALF mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert aus mindestens vier Tieren pro Gruppe mit der entsprechenden SD eines repräsentativen Experiments von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet (n.s.: nicht signifikant).

Bei der Analyse der OVA-spezifischen Immunglobuline IgG1 und IgE zeigten sich sowohl bei den C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> Cre<sup>-</sup> als auch bei den C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäusen im Vergleich zu den in Kapitel 3.2.1 analysierten wt Tieren kaum Unterschiede. Die funktionellen *knock out* als auch funktionellen wt Mäuse ließen sich in ähnlicher Weise sensibilisieren, was am Zeitverlauf des OVA-spezifischen IgG1 deutlich zu erkennen war (Abbildung 3.28 A). Der Verlauf des OVA-

spezifischen IgG1 der immuntherapierten Mäuse zeigte ebenfalls den bisher beobachteten Anstieg nach der IT mit dem darauf folgenden Abfall während der OVA-Provokation (Abbildung 3.28 A). Das OVA-spezifische IgE war in den Serumproben der PBS Kontrollgruppen beider sensibilisierter Mauslinien nach OVA-Provokation höher als nach erfolgter IT (Abbildung 3.28 B).



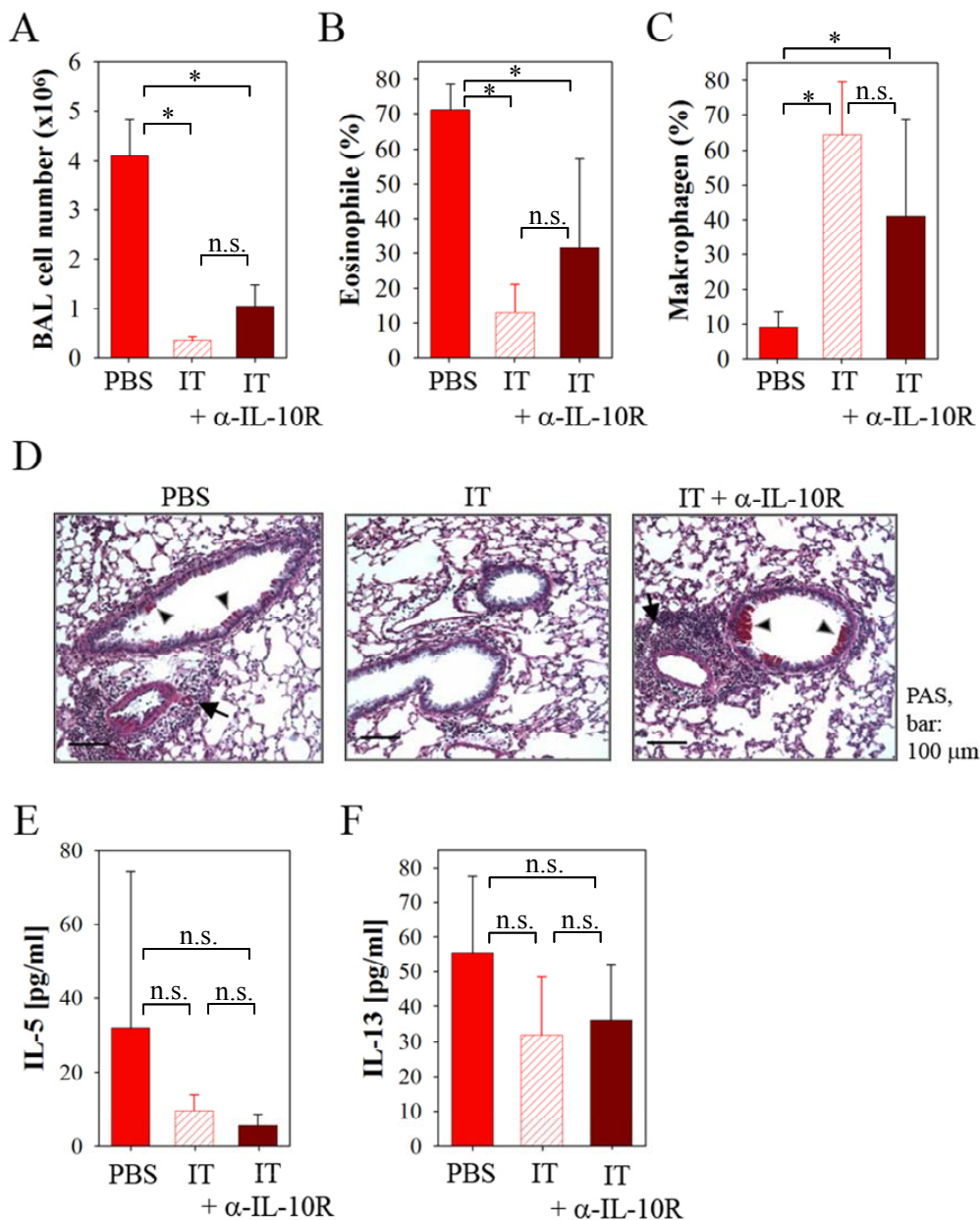
**Abbildung 3.28 Bestimmung von OVA-spezifischen Immunglobulinen in Serum von C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> Cre<sup>-</sup> und C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäusen**

C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> und C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> Cre<sup>-</sup> Mäuse wurden auf OVA sensibilisiert und anschließend mit einer OVA-spezifischen IT behandelt (IT). Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten PBS (PBS). Es wurde der Zeitverlauf des OVA-spezifischen IgG1 (A), sowie das OVA-spezifische IgE (B) im Serum an d60 des Protokolls mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert aus mindestens vier Tieren pro Gruppe mit der entsprechenden SD eines repräsentativen Experiments von drei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse der Daten erfolgte für das OVA-spezifische IgG1 anhand einer Two-Way ANOVA mit einem Bonferroni Post Hoc Test und für das OVA-spezifische IgE anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Es wurden keine signifikanten Unterschiede (n.s.: nicht signifikant;  $p > 0,05$ ) detektiert.

Daraus lässt sich zusammenfassen, dass eine erfolgreiche IT auch ohne aus T Zellen stammendes IL-10 möglich ist. Sowohl die Zellzusammensetzung in der BALF als auch die OVA-spezifischen Immunglobuline im Serum der C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> Cre<sup>-</sup> und der C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> entsprechen denen der C57BL/6 wt Mäuse (vgl. Kapitel 3.2.1).

Um zu belegen, dass IL-10 aus einer anderen Quelle als den T Zellen zum Erfolg der IT beiträgt, wurde im nächsten Schritt ein gegen den IL-10 Rezeptor gerichteter Antikörper den C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäusen vor der IT und vor der OVA-Provokation verabreicht. Durch Blockierung des IL-10 Rezeptors in diesen Mäusen wird die Signaltransduktion von T Zell-unabhängig produziertem IL-10 unterbunden.



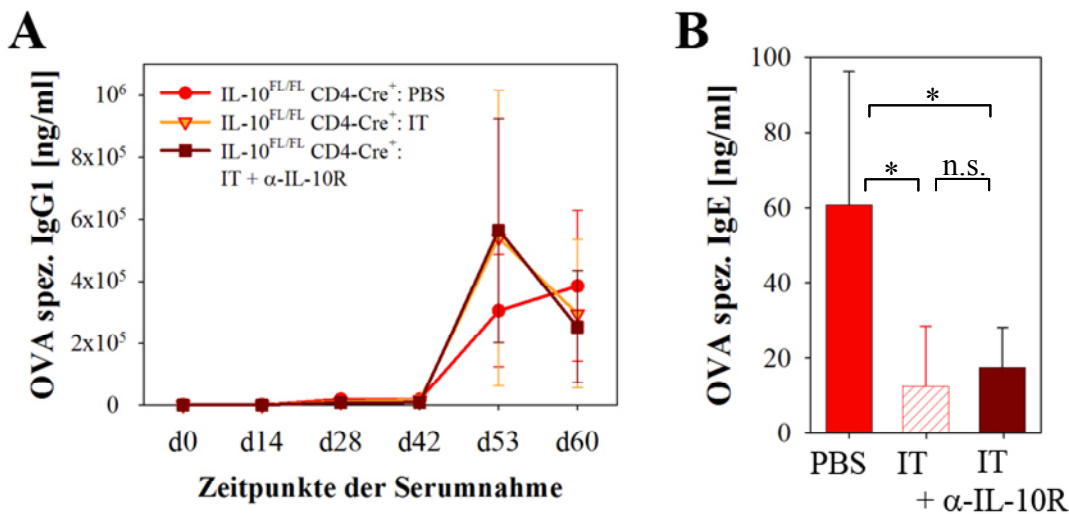


**Abbildung 3.29 Einfluss der Blockierung des IL-10R auf die Atemwegsentzündung von C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäusen nach Immuntherapie**

C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäuse wurden auf OVA sensibilisiert und anschließend mit einer OVA-spezifischen IT behandelt (IT). Einige Tiere erhielten 300  $\mu$ g Antikörper gegen den IL-10R vor der IT und vor der OVA-Provokation (IT +  $\alpha$ -IL-10R). Als Kontrolle zur IT erhielt eine Gruppe PBS (PBS). Die Gesamtzellzahl der BALF wurde bestimmt (A). Aus Zellen der BAL-Flüssigkeit wurden Cytospins angefertigt, mittels Diff-Quik angefärbt und pro Probe mind. 400 Zellen ausgezählt (A: absolute BAL Zellzahl, B: prozentualer Anteil an Eosinophilen in BALF, C: prozentualer Anteil an Makrophagen in BALF). Lungenhistologische Schnitte von IT-behandelten Tieren (D, mittlere Abbildung, IT) und Kontrolltieren (D, linke Abbildung, PBS) sowie mit  $\alpha$ -IL-10R Antikörper und IT-behandelten Tieren (D, rechte Abbildung, IT +  $\alpha$ -IL-10R) wurden mit PAS angefärbt. Die Konzentrationen der Zytokine IL-5 (E) und IL-13 (F) wurden in BALF mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert aus sechs Tieren pro Gruppe mit der entsprechenden SD eines repräsentativen Experiments von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet (n.s.: nicht signifikant).

Abbildung 3.29 zeigt die Analysen der Inflammation in der Lunge von C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäusen nach Applikation des  $\alpha$ -IL-10R Antikörpers und erfolgter IT. Diese Daten werden im Vergleich zu den Kontrollgruppen, die lediglich mit PBS behandelt wurden bzw. eine OVA IT ohne Antikörpergabe erhalten haben, betrachtet. Beim Betrachten der BAL Zellzahl in Abbildung 3.29 A ist zu erkennen, dass durch Gabe des  $\alpha$ -IL-10R Antikörpers die Zellzahl im Vergleich zu den IT-Tieren wieder anstieg. Diese Beobachtung wird durch den Anstieg des prozentualen Anteils an Eosinophilen und dem Abfall des prozentualen Anteils an Makrophagen bestätigt (Abbildung 3.29 B – C). Die histologischen Analysen des Lungengewebes der drei untersuchten Gruppen zeigten ebenfalls, dass die mit dem  $\alpha$ -IL-10R Antikörper behandelte Gruppe wieder einen ähnlichen Entzündungsgrad wie die PBS Kontrollgruppe aufwies (Abbildung 3.29 D, rechtes vs. linkes Bild). Im Vergleich zur Gruppe der IT ohne  $\alpha$ -IL-10R Antikörper (Abbildung 3.29D, mittleres Bild) waren in den anderen beiden Gruppen deutlich Mukuszellen (Abbildung 3.29 D, Pfeilspitzen) und peribronchiale Infiltrate (Abbildung 3.29 D, Pfeile) zu erkennen. Die in der BALF untersuchten Th2 Zytokine reagierten nur in geringem Maß auf die Behandlung mit dem  $\alpha$ -IL-10R Antikörper. Das IL-5 verblieb auf einem vergleichsweise niedrigen Niveau wie nach der IT ohne Antikörpergabe (Abbildung 3.29 E) und das IL-13 wies im Vergleich zur IT ohne Antikörperverabreichung nur einen geringfügigen Anstieg auf (Abbildung 3.29 F).

Bei der Analyse der OVA-spezifischen Immunglobuline zeigte sich ebenfalls kein Einfluss durch die Behandlung mit  $\alpha$ -IL-10R Antikörper (Abbildung 3.30). Die Entwicklung des OVA-spezifischen IgG1 über den Zeitverlauf des Experiments entsprach auch nach Behandlung mit dem  $\alpha$ -IL-10R Antikörper (Abbildung 3.30 A, IT +  $\alpha$ -IL-10R AK) dem der regulären IT (Abbildung 3.30 A, IT). Das gleiche Bild ergab sich bei Betrachtung des OVA-spezifischen IgE in Abbildung 3.30 B, wo ebenfalls ein Effekt durch die Behandlung mit  $\alpha$ -IL-10R Antikörper ausblieb (Abbildung 3.30 B, IT vs. IT +  $\alpha$ -IL-10R AK).



**Abbildung 3.30 Einfluss der Blockierung des IL-10R auf OVA-spezifische Immunglobuline im Serum von C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäusen**

C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäuse wurden auf OVA sensibilisiert und anschließend mit einer OVA-spezifischen IT behandelt (IT). Einige Tiere erhielten 300 µg Antikörper gegen den IL-10R vor der IT und vor der OVA-Provokation (IT + α-IL-10R). Als Kontrolle zur IT erhielt eine Gruppe PBS (PBS). Es wurde der Zeitverlauf des OVA-spezifischen IgG1 (A), sowie das OVA-spezifische IgE (B) im Serum an d60 des Protokolls mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert aus sechs Tieren pro Gruppe mit der entsprechenden SD eines repräsentativen Experiments von zwei unabhängig durchgeführten Experimenten. Die statistische Analyse der Daten erfolgte für das OVA-spezifische IgG1 anhand einer Two-Way ANOVA mit einem Bonferroni Post Hoc Test und für das OVA-spezifische IgE anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet (n.s.: nicht signifikant).

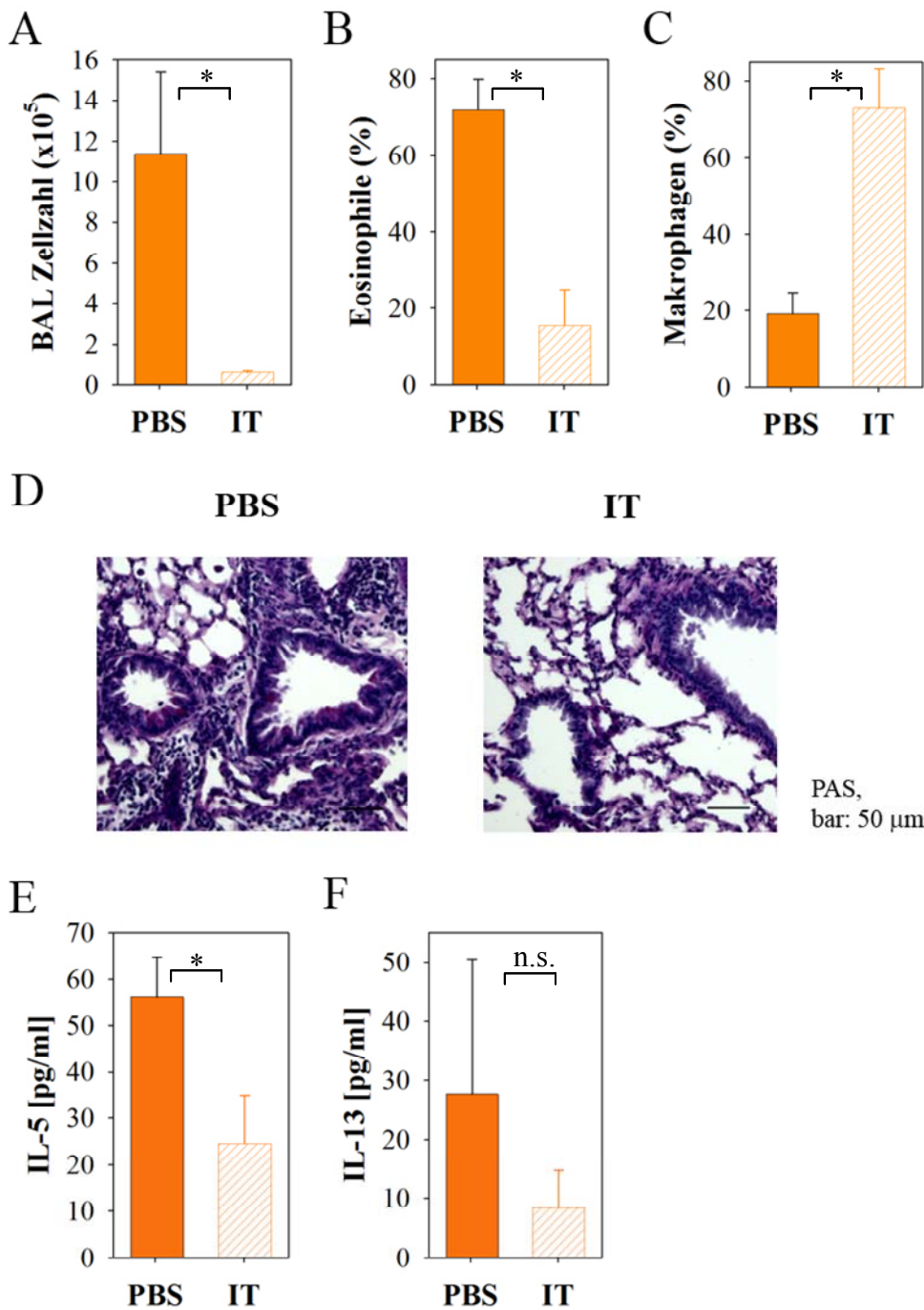
Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich die erfolgreiche IT in C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäusen nicht vollständig durch die Blockierung des IL-10R aufheben lässt, so dass davon auszugehen ist, dass neben IL-10 aus T Zell-unabhängigen Quellen auch andere Faktoren einen Beitrag zur erfolgreichen IT leisten.

### 3.2.4. Die Rolle von NKT Zellen bei der Immuntherapie

NKT Zellen wurden bereits in vielen Studien analysiert, jedoch existiert kein einheitliches Bild von ihrer physiologischen Rolle. Sie wurden sowohl mit protektiver als auch aggravierender Funktion beschrieben [186]. So gibt es kontroverse Daten bezüglich der Rolle von NKT Zellen bei der Th2-gerichteten Immunantwort [12, 39, 184, 201, 292]. Erkenntnisse über einen Einfluss von NKT Zellen während einer IT existieren bisher nicht. Allerdings wurden NKT Zellen bereits in Verbindung mit der Induktion von immunologischer Toleranz beschrieben [296]. Die Analyse der Atemwegsinfektion in NKT Zell-defizienten Mäusen nach IT sollte nun Aufschluss über eine mögliche Rolle von NKT Zellen bei der Wirksamkeit der IT geben.

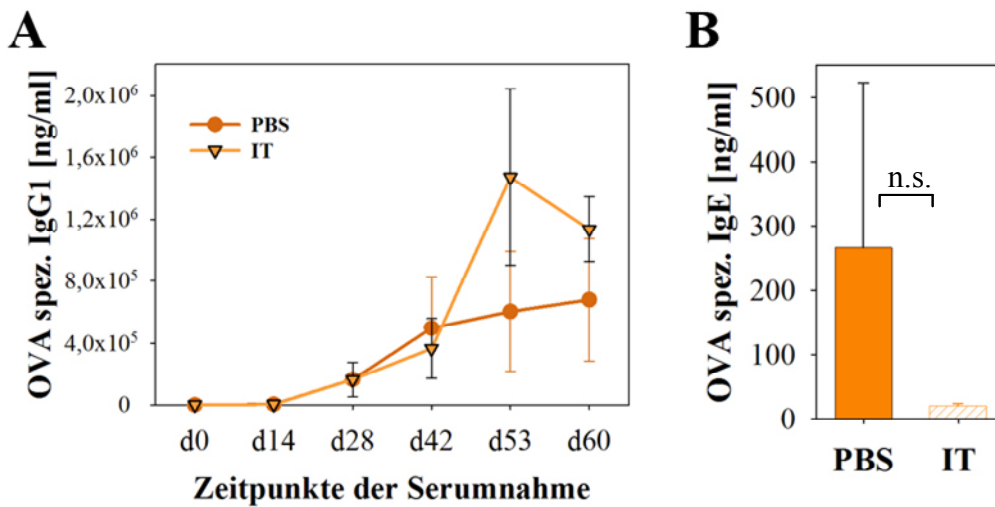


In Abbildung 3.31 zeigt sich deutlich, dass die sensibilisierten und provozierten NKT Zell-defizienten Tiere (CD1d k.o.) eine vergleichbare Entzündungsreaktion wie der Wildtyp aufwiesen (vgl. Abbildung 3.23). Dies spiegelte sich in der hohen Zellzahl in der BALF sowie im hohen prozentualen Anteil an Eosinophilen und geringen Anteil an Makrophagen in der BALF wider (siehe Abbildung 3.31 A – C). Unterstützt wurden diese Daten sowohl von der histologischen Analyse, die eine starke peribronchiale Infiltration mit inflammatorischen Zellen aufwies, als auch vom hohen IL-5 und IL-13 Level in der BALF (siehe Abbildung 3.31 D – F). Die Wirksamkeit der IT ist nicht durch fehlende NKT Zellen eingeschränkt. Auch hier zeigt sich ein vergleichbares Bild wie bei den Wildtypen. So war sowohl die Zellzahl in der BALF als auch der prozentuale Anteil an Eosinophilen stark reduziert und der Anteil an Makrophagen dominierend (siehe Abbildung 3.31 A – C). Auch die Konzentrationen von IL-5 und IL-13 waren in der BALF der NKT Zell-defizienten Mäusen nach IT vermindert. Die peribronchialen Infiltrate wurden nach IT kaum noch beobachtet (Abbildung 3.31 D – F). Die Analyse des gebildeten OVA-spezifischen IgG1 über den Verlauf der IT demonstriert wie auch bei den wt Tieren einen starken Anstieg nach IT mit einem Abfall nach der Allergenprovokation, der in den sensibilisierten, unbehandelten Tieren nicht zu beobachten war (Abbildung 3.32 A). Das OVA-spezifische IgE verblieb ebenfalls wie bei den wt Mäusen auch bei den NKT Zell-defizienten Mäusen nach IT auf einem niedrigen Niveau. Im Gegensatz dazu war bei den sensibilisierten, unbehandelten PBS Tieren eine hohe OVA-spezifische IgE Konzentration nach Provokation zu messen (Abbildung 3.32 B) (Daten siehe Kapitel 10.1). Demnach spielen NKT Zellen in diesem Hyposensibilisierungsmodell keine bedeutende Rolle.



**Abbildung 3.31 Analyse der Atemwegsentzündung von C57BL/6 NKT Zell defizienten Mäusen nach Immuntherapie**

C57BL/6 NKT Zell defiziente (CD1d k.o.) Mäuse wurden auf OVA sensibilisiert und anschließend mit einer OVA-spezifischen IT behandelt (IT). Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten PBS (PBS). Die Gesamtzellzahl der BALF wurde bestimmt (A). Aus Zellen der BALF wurden Cytospins angefertigt, mittels Diff-Quik angefärbt und pro Probe mind. 400 Zellen ausgezählt (B: prozentualer Anteil an Eosinophilen in BALF, C: prozentualer Anteil an Makrophagen in BALF). Die Konzentrationen der Zytokine IL-5 (D) und IL-13 (E) wurden in BALF mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert aus mindestens drei Tieren pro Gruppe mit der entsprechenden SD eines exemplarischen Experiments. Die statistische Analyse der Daten erfolgte anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Werte mit signifikantem Unterschied ( $p < 0,05$ ) sind mit einem Stern gekennzeichnet (n.s.: nicht signifikant).



**Abbildung 3.32 Bestimmung von OVA-spezifischen Immunglobulinen in Serum von C57BL/6 NKT Zell defizienten Mäusen**

C57BL/6 NKT Zell defiziente (CD1d k.o.) Mäuse wurden auf OVA sensibilisiert und anschließend mit einer OVA-spezifischen IT behandelt (IT). Die Tiere der Kontrollgruppe erhielten PBS (PBS). Es wurde der Zeitverlauf des OVA-spezifischen IgG1 (A), sowie das OVA-spezifische IgE (B) im Serum an d60 des Protokolls mittels ELISA bestimmt. Die Daten zeigen den Mittelwert aus mindestens drei Tieren pro Gruppe mit der entsprechenden SD eines exemplarischen Experiments. Die statistische Analyse der Daten erfolgte für das OVA-spezifische IgG1 anhand einer Two-Way ANOVA mit einem Bonferroni Post Hoc Test und für das OVA-spezifische IgE anhand einer One-Way ANOVA mit einem Tukey's Post Hoc Test. Es wurden keine signifikanten Unterschiede (n.s.: nicht signifikant;  $p > 0,05$ ) detektiert.

## 4. Diskussion

### 4.1. Funktionelle Modulation von pDC und cDC durch wässrigen Birkenpollenextrakt

Dendritischen Zellen wird bei der Entstehung von Sensibilisierungen und Hyperreaktivitäten gegenüber sonst harmlosen Substanzen eine Schlüsselrolle zugeschrieben. Verschiedene Subpopulationen von DC scheinen hierbei differenzielle Funktionen in Abhängigkeit des jeweiligen Maturationsstatus auszuüben.

In dieser Arbeit wurden die Einflüsse wässriger Pollenbestandteile auf ausgewählte funktionelle Eigenschaften von *in vitro* aus murinem Knochenmark generierten pDC und cDC untersucht. Hierbei wurde zunächst gezeigt, dass unter den gewählten Versuchsbedingungen diese Bestandteile keinen Einfluss auf die Maturation von pDC ausüben und die nach Aktivierung induzierte Typ I Interferonsekretion nicht modulieren. Das bedeutet, dass eine immunmodulatorische Wirkung der im wässrigen Milieu freigesetzten Birkenpollenbestandteile nicht über pDC vermittelt wird und somit eine Brechung der Toleranz nicht durch die hier analysierten Parameter zu erwarten ist-

Im Gegensatz zu den funktionell unveränderten pDC bewirkte der wässrige Birkenpollenextrakt eine funktionelle Modulation der cDC, die sich in Form einer veränderten Zytokinsekretion äußerte. In Abhängigkeit vom aktivierenden Liganden übte *Bet.*-APE einen differenziellen Einfluss auf die IL-10 Sekretion aus. Die analysierten Maturationsmarker blieben durch den Extrakt unbeeinflusst. Ausgewählte Phytoprostane als Bestandteile des Extrakts vermittelten teilweise eine Hemmung der IL-12 Produktion. Diese Inhibierung fiel deutlich geringer als beim Gesamtextrakt aus und lässt auf eine multifaktorielle Wirkung des Extrakts schließen. Phytoprostane stellen somit nur eine wirksame Substanzklasse des Extrakts dar. Diese funktionelle Veränderung der cDC durch *Bet.*-APE zeigt einen möglichen Weg der Immunmodulation während einer Allergieentstehung auf.

#### 4.1.1. Einfluss von *Bet.*-APE auf die Funktion der pDC in einem *in vitro* Modell

Die Bedeutung der pDC bei der Toleranzerhaltung in der Lunge wurde durch eine Studie von De Heer et al. belegt. Diese zeigt, dass die Depletion von pulmonalen pDC eine Sensibilisierung gegenüber sonst harmlosen Antigenen bewirkt und zu einer Infiltration der Atemwege mit Eosinophilen und einer Produktion von Th2-polarisierenden Zytokinen führt, was durch den adoptiven Transfer von pDC vor der Inhalation verhindert werden kann [67]. pDC zeichnen sich insbesondere durch die Sekretion von großen Mengen an Typ I Interferonen nach viraler oder bakterieller Stimulation aus [23]. Aufgrund der Assoziation von viralen Atemwegsinfektionen in der Kindheit und später auftretendem Asthma oder atopischen Erkrankungen [142] wurde in dieser

Arbeit der Fragestellung nachgegangen, ob wasserlösliche Substanzen aus Pollen einen Einfluss auf die Funktionalität der CpG-aktivierten pDC ausüben. Hierbei lag der Schwerpunkt der Analysen auf den Aktivierungsmarkern CD40 und CD69 und auf der IFN- $\alpha$  Produktion der pDC. Diese Parameter wurden jedoch nicht durch den wässrigen Pollenextrakt moduliert und scheinen somit in diesem *in vitro* Modell keinen maßgeblichen Einfluss auf die Toleranzbrechung zu haben (vgl. Kapitel 3.1.1.1). Auch wenn die IFN- $\alpha$  Produktion der pDC durch *Bet.*-APE in diesem *in vitro* Modell nicht moduliert wurde, könnte IFN- $\alpha$  *in vivo* dennoch eine wichtige Rolle spielen und z.B. über die Anzahl an IFN- $\alpha$  sekretierenden pDC reguliert werden. So wurde spekuliert, dass das Verhältnis zwischen pDC und cDC in der Lunge eine Rolle für die resultierende Immunantwort spielt [67]. Es wurde beschrieben, dass die Applikation von CpG-Motiven zur Akkumulation von pDC in der Lunge führt und so einen Schutz vor Atemwegsentzündungen bietet. Im Gegensatz dazu ruft eine Depletion der pulmonalen pDC eine verstärkte Atemwegsentzündung hervor [49, 67]. Diese Daten lassen allerdings noch keine Korrelation zwischen der Anzahl an pDC und dem Auftreten einer Atemwegsentzündung zu. Eine weitere Studie zeigt zwar, dass die Anzahl an pDC im Blut von allergischen, insbesondere asthmatischen Kindern im Vergleich zu gesunden Kontrollen verringert ist [129]. Eine andere Studie hingegen macht eine erhöhte Anzahl an pDC für eine Verringerung des cDC-pDC Verhältnisses im Blut verantwortlich und begründet damit die beobachtete Th2-Polarisierung des Immunsystems [216].

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass in diesem *in vitro* Modell keine Modulation der pDC durch *Bet.*-APE beobachtet wurde. Weiterführend könnte ein *in vivo* Modell Aufschluss über den Einfluss des wässrigen Pollenextrakts auf die pDC Population in der Allergieentstehung geben. Denkbar ist ebenfalls, dass neben Typ I Interferonen andere sekretierte Zytokine oder Chemokine der pDC durch den wässrigen Pollenextrakt moduliert werden und so eine Immunmodulation über pDC dennoch stattfindet.

#### 4.1.2. Funktionelle Modulation der cDC durch *Bet.*-APE

Neben der Analyse von pDC wurde auch die Rolle von konventionellen DC, häufig auch als myeloide DC bezeichnet, in Zusammenhang mit der Entstehung von primär respiratorischen allergischen Erkrankungen untersucht. Von besonderem Interesse für diese Arbeit sind hierbei die immunmodulatorischen Effekte, die von Pollen und Pollen assoziierten Lipidmediatoren (PALMs) ausgehen (vgl. Kapitel 1.2.2). Es zeigte sich, dass zwar die analysierten Maturationsmarker durch *Bet.*-APE und die darin enthaltenen Phytoprostane E<sub>1</sub> und F<sub>1</sub> unbeeinflusst blieben, aber die nach Aktivierung induzierte IL-12 Produktion durch *Bet.*-APE und PPE<sub>1</sub> dosisabhängig gehemmt wurde. Die IL-10 Sekretion wurde in Abhängigkeit vom aktivierenden TLR-Liganden differenziell durch *Bet.*-APE moduliert.

Obwohl cDC nach Aktivierung große Mengen des Th1-polarisierenden Zytokins IL-12 sekretieren, konnte gezeigt werden, dass cDC in Abhängigkeit von der Mikroumgebung während der

Aktivierung ebenfalls eine Th2-Polarisierung bewirken können [32, 131, 152]. Die genauen Faktoren, die eine Th2-Polarisierung durch die DC begünstigen und die zur Brechung der Toleranz gegenüber harmlosen Umweltsubstanzen führen, sind bisher nicht vollständig aufgeklärt. Eine Möglichkeit des Immunsystems, eine veränderte T Zell-Polarisierung hervorzurufen, besteht in der phänotypischen oder funktionellen Veränderung der DC. Wie in Kapitel 1.1.1.5 beschrieben, sind verschiedene Signale seitens der DC nötig, um T Zellen entsprechend der benötigten Immunreaktion zu polarisieren. Eine Modulation des kostimulatorischen Signals wurde weder durch den wässrigen Birkenpollenextrakt noch durch die darin enthaltenen Einzelsubstanzen Phytoprostan E<sub>1</sub> und F<sub>1</sub> induziert. Die Expression der Aktivierungsmarker CD86, CD40 und CD80 blieb unverändert durch die getesteten Substanzen (vgl. Abbildung 3.5). Auch die Expression des für die Präsentation von exogenen Peptiden verantwortlichen MHC Klasse II Komplexes veränderte sich durch die Behandlung der semi-maturen oder maturen cDC mit *Bet.*-APE, PPE<sub>1</sub> oder PPF<sub>1</sub> nicht (vgl. Abbildung 3.5). Daraus lässt sich ableiten, dass der wässrige Pollenextrakt in diesem murinen Modell keine phänotypische Veränderung der cDC bewirkt und somit eine Modulation der T Zell-Polarisierung über die hier analysierten kostimulatorischen Moleküle nicht stattfindet.

#### ***4.1.2.1. Ursachen für differenzielle Effekte zwischen dem humanen und murinen System***

Im Gegensatz zu der unveränderten Expression phänotypischer Marker auf murinen cDC durch *Bet.*-APE zeigte die Arbeit von Traidl-Hoffmann et al. eine erhöhte Expression des MHC Klasse II Komplexes auf immaturen als auch auf humanen LPS gereiften DC, sowie eine verstärkte Expression von CD80 und CD86 ausschließlich auf humanen LPS gereiften DC durch die Behandlung mit wässrigem Birkenpollenextrakt [315]. Diese Unterschiede lassen sich damit begründen, dass sich das murine System trotz hoher Homologien zum humanen System in vielen Punkten von diesem unterscheidet [231]. Ein wesentlicher Unterschied zwischen den murinen cDC und den humanen cDC besteht darin, dass murine cDC im Gegensatz zu den humanen cDC neben anderen TLR auch TLR9 exprimieren und sich somit durch ein breiteres Spektrum an Liganden, wie z.B. CpG-Motiven, aktivieren lassen (vgl. Tabelle 1.1) [87]. Neben dem Unterschied in der Spezies können die beobachteten Abweichungen auch durch verschiedenes Ausgangsmaterial bedingt sein. Dazu zählt, dass die murinen DC aus Knochenmarkszellen und die humanen DC aus peripherem Blut generiert wurden. Zwar wurde anhand eines genomweiten Genexpressionsprofils gezeigt, dass die unter Zusatz von GM-CSF generierten humanen und murinen cDC genetisch hohe Übereinstimmungen aufweisen [270], aber Medienzusätze wie die Konzentration des GM-CSF als auch die Charge des FCS können die Eigenschaften der generierten DC stark beeinflussen und zu Abweichungen bei den Analysen führen [205]. Des Weiteren könnte die Generierung und Stimulation der humanen DC unter Zugabe von IL-4 die abweichenden Beobachtungen der funktionellen Analyse erklären. Der im murinen System beobachtete Anstieg des IL-10 nach Stimulation mit LPS und *Bet.*-APE wird nicht im humanen Modell detektiert, sondern bleibt dort

unbeeinflusst. Eine Erklärung für diese Abweichung bietet die Studie von Guenova et al. [124]. Sie beschreibt, dass in Abhängigkeit der eingesetzten IL-4 Konzentration die Zytokinsekretion und Polarisierungseigenschaften der aus humanem Blut generierten DC beeinflusst werden. So hemmt der Zusatz von hohen Mengen an IL-4, wie von Traidl-Hoffmann et al. eingesetzt [315], die IL-10 Sekretion der DC.

#### ***4.1.2.2. Phytoprostan E<sub>1</sub>: nur eine wirksame Substanz des Bet.-APE***

Bei der funktionellen Analyse der mit dem wässrigen Pollenextrakt oder mit Phytoprostan E<sub>1</sub> oder F<sub>1</sub> behandelten cDC ergibt sich in Abhängigkeit vom TLR-Liganden ein differenzielles Bild der sekretierten Zytokine. Die Sekretion des IL-12p70 wurde sowohl von *Bet.*-APE als auch von PPE<sub>1</sub> unabhängig vom gewählten TLR-Liganden gehemmt, jedoch nicht durch PPF<sub>1</sub>. Die Hemmung von IL-12p70 durch PPE<sub>1</sub> fiel deutlich geringer aus als mit dem Gesamtextrakt, was in Einklang mit den Daten aus dem humanen System steht [110, 315]. Daraus lässt sich ableiten, dass PPE<sub>1</sub> eine der wirksamen Komponenten des *Bet.*-APE darstellt, aber noch weitere Substanzen enthalten sein müssen, die zur funktionellen Modulation der cDC beitragen. Hinzu kommt, dass die Konzentration des PPE<sub>1</sub> bei Verwendung eines Extrakts von 1 mg Pollen/ml durchschnittlich bei  $5,4 \times 10^{-8}$  M liegt [315] und somit deutlich unter der Konzentration von  $3 \times 10^{-6}$  M, durch die die Hemmung des IL-12p70 in diesem Versuchsansatz bedingt wird (vgl. Abbildung 3.6 E). Denkbar ist hier, dass additive Effekte verschiedener im Pollenextrakt enthaltener Substanzen, zu denen PPE<sub>1</sub> zählt, die Modulation der cDC bewirken.

#### ***4.1.2.3. Mögliche Rezeptoren für die wirksamen Komponenten des Bet.-APE auf cDC***

Zum Verständnis der Entstehung von Allergien ist es von großer Bedeutung, die Signaltransduktionswege, die durch im wässrigen Pollenextrakt enthaltenen Substanzen angeschaltet werden, zu kennen. Als mögliche Rezeptoren für PPE<sub>1</sub> kommen die Prostaglandinrezeptoren aufgrund der strukturellen Ähnlichkeit der pflanzlichen Phytoprostane zu den humanen Prostaglandinen in Frage [238]. Von den verschiedenen Prostaglandinrezeptoren exprimieren DC die Rezeptoren DP1, EP1-EP4 und IP [123]. Es wurde beschrieben, dass Prostaglandine und die entsprechenden Rezeptoren in der allergischen Entzündung der Lunge eine Rolle spielen [233]. Hierbei wurde die Bildung und Wirkung von Prostaglandinen meist mit einer Verbesserung der Symptomatik korreliert, jedoch scheint die resultierende Wirkung des jeweiligen Prostaglandins abhängig vom involvierten Rezeptor, der Zellpopulation und des Mikromilieus während der Aktivierung zu sein [133]. Bei der Analyse des Einflusses von PPE<sub>1</sub> (vgl. Abbildung 3.6) im Vergleich zu PGE<sub>2</sub> (vgl. Abbildung 3.7) auf die IL-12p70 Sekretion von cDC nach LPS oder CpG 2216-Aktivierung wird deutlich, dass trotz der analogen Struktur von PPE<sub>1</sub> zu PGE<sub>2</sub> PPE<sub>1</sub> nicht die gleiche Wirkung wie Prostaglandine hervorruft. PPE<sub>1</sub> führt unabhängig von der

Aktivierung zu einer verminderten IL-12p70 Sekretion, wohingegen PGE<sub>2</sub> nur nach Aktivierung über den TLR4 eine starke Reduktion der IL-12 Produktion bewirkt. Einen weiteren Beleg für die differenzielle Wirkungsweise von PPE<sub>1</sub> und PGE<sub>2</sub> liefert die Analyse des sekretierten IL-10. Die IL-10 Sekretion wird nach Aktivierung mit LPS durch die PGE<sub>2</sub> Behandlung stark induziert, während nach Aktivierung mit CpG2216 und Zugabe von PGE<sub>2</sub> IL-10 unverändert sekretiert wird. Im Gegensatz dazu lässt sich unabhängig vom TLR-Liganden nach PPE<sub>1</sub> Behandlung kein IL-10 im Zellkulturüberstand detektieren. Anhand dieser Daten kann man ableiten, dass die in *Bet*-APE enthaltenen Phytoprostane zwar über PG-Rezeptoren wirken könnten, dabei aber nicht die gleichen Wirkungen wie Prostaglandine vermitteln. Möglicherweise sind für die Signaltransduktion der Phytoprostane weitere, noch nicht detektierte Signalwege von Bedeutung. Eine aktuelle Studie bestätigt diese Annahme anhand von Analysen mit EP2- und EP4-Antagonisten, die die Hemmung des IL-12 durch *Bet*-APE, nicht aber durch PPE<sub>1</sub> aufheben. Hierbei wird deutlich, dass PPE<sub>1</sub> seine Effekte nur in geringem Maße über die Prostaglandinrezeptoren vermittelt, *Bet*-APE allerdings Liganden für diese Rezeptoren enthält [110].

Auch die zur Gruppe der nukleären Rezeptoren gehörenden Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptoren (PPAR)- $\alpha$ , - $\beta$  und - $\gamma$  stellen potentielle Kandidaten für die PALM-vermittelte Signaltransduktion dar. Zahlreiche Liganden, wie z.B. ungesättigte Fettsäuren, Eicosanoide und Derivate der Linolsäure konnten für die verschiedenen PPARs bestimmt werden. Von besonderem Interesse ist hier PPAR- $\gamma$ . Er wird von APC exprimiert und einige der bisher für PPAR- $\gamma$  detektierten Liganden, wie z.B. 9,13-HODE, sind auch in Pollen enthalten [302, 305, 313]. Verschiedene Funktionen von DC, wie z.B. deren Aktivierung, Zytokinproduktion und Maturation, können durch PPAR- $\gamma$  Liganden moduliert werden [245, 305]. Gilles et al. zeigt, dass durch Blockierung von PPAR- $\gamma$  die Inhibierung der IL-12 Sekretion von aktivierten DC durch PPE<sub>1</sub> fast vollständig aufgehoben wird und PPE<sub>1</sub> somit sein modulatorisches Potential möglicherweise anstatt über Prostaglandinrezeptoren über PPAR- $\gamma$  vermittelt [110].

#### ***4.1.2.4. Regulation der differenziellen Zytokinsekretion***

Die Wirkung des *Bet*-APE auf LPS aktivierte cDC zeichnet sich durch eine verminderte IL-12p70 bei gleichzeitig erhöhter IL-10 Produktion aus. Daraus ergibt sich die Fragestellung, ob die Reduktion des IL-12 durch die induzierte IL-10 Sekretion bedingt wird. Verschiedene Studien haben bereits einen Zusammenhang zwischen einer gehemmten IL-12 Produktion bei Anwesenheit von IL-10 beschrieben [24, 179]. Als interessantes Beispiel ist hier das durch LPS induzierte und über Cyclooxygenase-2 vermittelte PGE<sub>2</sub> zu nennen. Es induziert einen starken Anstieg von IL-10, welches eine Hemmung von induziertem IL-12 bewirkt [132]. Seine Wirkmechanismen könnten aufgrund der strukturellen Homologie zu den Phytoprostanen auch für diese gültig sein. Um die gehemmte IL-12 Sekretion auf die erhöhte IL-10 Sekretion zurückzuführen, wurde der Einfluss von *Bet*-APE auf die IL-12 Sekretion von IL-10-defizienten cDC analysiert (vgl. Abbildung 3.8).



Hierbei zeigte sich jedoch, dass die IL-12 Produktion unabhängig vom sekretierten IL-10 herunterreguliert wird. Die hier unabhängig vom sekretierten IL-10 beobachtete Reduktion des IL-12p70 könnte mit den in Pollen generierten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) zusammenhängen. Neben Proteinen und bioaktiven Lipidmediatoren enthalten Pollen auch NADPH Oxidasen, welche ROS erzeugen [40], die die IL-12p70 Produktion von DC hemmen könnten. Eine Studie von Kroening et al. zeigt, dass für die Reduktion der IL-12p70 Produktion von DC, die durch Zigarettenrauch-Extrakt verursacht wird, ROS verantwortlich sind. Der Zigarettenrauch-Extrakt verursacht oxidativen Stress, der zu einer permanenten ERK-Phosphorylierung führt. Das bewirkt eine Akkumulation des p40 Transkriptions-Repressors c-fos im Zellkern, so dass die Transkription der p40-Untereinheit gehemmt und die IL-12p70 Produktion inhibiert wird [185]. Auch die Analyse der IL-10- und IL-6-Freisetzung von LPS aktivierten und mit Zigarettenrauch-Extrakt behandelten DC stehen im Einklang mit den Daten von *Bet.*-APE behandelten DC, da auch hier IL-10 ansteigt und IL-6 unverändert sekretiert wird [326]. Diese Gemeinsamkeiten könnten ein Indiz dafür sein, dass der ERK-abhängige Signalweg der IL-12p70 Synthese in DC durch *Bet.*-APE induzierte ROS inhibiert wird. Eine Behandlung mit Antioxidanzien lässt eine Besserung von Pollen verursachten allergischen Atemwegsentzündungen vermuten [76]. Dies könnte anhand einer *in vitro* Studie belegt werden, indem zu den aktivierten cDC neben *Bet.*-APE auch ein Antioxidanz zugesetzt würde, wodurch die Reduktion des IL-12p70 aufgehoben werden könnte.

Ein weiterer c-fos abhängiger Signalweg wird über cAMP gesteuert. Es ist bekannt, dass *Bet.*-APE cAMP induziert [110]. Gebildetes cAMP verstärkt in Verbindung mit einer Aktivierung der Zelle durch LPS die Bildung von c-fos. Über c-fos können wie bereits beschrieben proinflammatorische Zytokine wie z.B. IL-12 gehemmt werden. Die durch cAMP bedingte Hemmung von IL-12 findet unabhängig von IL-10 statt [181]. Diese von IL-10 abgekoppelte Regulation des IL-12 verstärkt die Annahme, dass die differenzielle Sekretion des IL-10 nach *Bet.*-APE-Behandlung in Abhängigkeit des TLR-Liganden über einen vom IL-12 unabhängigen Signalweg gesteuert wird. So zeigte sich, dass durch eine *Bet.*-APE-Behandlung der cDC nach LPS-Aktivierung verstärkt IL-10 sekretiert wird, wohingegen eine Aktivierung mit CpG 2216 zu einer gehemmten Sekretion des IL-10 führt, jedoch in beiden Fällen eine Hemmung des IL-12p70 beobachtet wird (vgl. Abbildung 3.6A - B). Die Signaltransduktion über TLR4 und TLR9 gleicht sich in der Verwendung des Adapterproteins MyD88, unterscheidet sich aber in der Verwendung des Adapterproteins TRIF, welches im Gegensatz zum TLR9 nur über den TLR4 rekrutiert wird (vgl. Abbildung 1.2). Häcker et al. zeigen, dass der Signalweg über TRIF unter Verwendung von TRAF3 essentiell für die Expression von IL-10 und Typ I IFN ist, aber nur eine untergeordnete Rolle bei der Produktion von proinflammatorischen Zytokinen spielt [128]. Sollten nun Komponenten von *Bet.*-APE einen hemmenden Einfluss auf den MyD88-Signalweg ausüben, würde dies erklären, warum bei einer Aktivierung mit CpG 2216 IL-10 gehemmt wird, eine Aktivierung mit LPS aber zu einer Induktion des IL-10 führt, da in diesem Fall die gesteigerte IL-10 Sekretion über TRIF reguliert würde.

Einen weiteren Unterschied in der Signaltransduktion könnte die erst wenig beschriebene Bindung von JAK2 an TLR4 nach Aktivierung mit LPS darstellen [177]. Über diesen JAK-Signalweg zeigt sich ebenfalls eine selektive Regulation von IL-10 in murinen cDC, in denen nach Inhibierung mit dem JAK Inhibitor I zwar das LPS- und Imiquimod-induzierte IL-10, nicht aber IL-12p40, IL-6 oder TNF- $\alpha$  in geringerer Menge freigesetzt werden [139]. Dies impliziert, dass bei einer Aktivierung von JAK2 IL-10 unabhängig von IL-12 induziert werden könnte. Diese Daten deuten an, dass Substanzen des wässrigen Pollenextrakts direkt oder indirekt die Signalwege über TRAF3 oder JAK2 aktivieren könnten, was zu einer erhöhten Produktion des IL-10 nach LPS-Aktivierung führt. Gezielte Studien zur Signaltransduktion in murinen cDC sind nötig, um diesen Mechanismus aufzuklären.

## **4.2. Auswirkungen des wässrigen Pollenextrakts auf die Interaktion von cDC mit T Zellen**

Eine funktionelle Modulation der DC alleine bedeutet noch nicht, dass eine veränderte Immunreaktion auftritt. Erst nach Interaktion von DC mit T Zellen wird deutlich, ob eine modulierte T Zell-Polarisation als Folge der modifizierten DC auftritt. Diese Auswirkungen der durch *Bet.*-APE funktionell veränderten cDC auf die T Zell-Polarisierung wurden anhand drei verschiedener Testsysteme analysiert. Im allogenen System erfolgt die Aktivierung der CD4<sup>+</sup> aufgereinigten T Zellen aufgrund der Erkennung von fremden HLA-Molekülen des zweiten Mausstamms. Das zweite, antigenspezifische System setzt sich aus CD4<sup>+</sup> angereicherten T Zellen einer transgenen Maus mit einem hohen Prozentsatz an T Zellen, die spezifisch ein Peptid des Ovalbumins erkennen, und cDC des gleichen Mausstamms zusammen. Dort erfolgt die Aktivierung der T Zellen durch die Erkennung von präsentierten Ovalbumin-Peptiden auf den cDC. Das dritte Testsystem besteht aus einem NKT Zell-Hybridom, welches durch die Erkennung von CD1d-präsentiertem  $\alpha$ -GalCer auf cDC aktiviert wird. Sowohl im allogenen als auch im antigenspezifischen Testsystem war keine eindeutige Verschiebung der T Zell-Polarisierung durch *Bet.*-APE behandelte cDC zu beobachten. Weder die Proliferationsfähigkeit noch die analysierte Zytokinsekretion der T Zellen änderten sich in großem Maße. Im NKT-Zell Testsystem war eine deutliche Hemmung aller analysierten Zytokine bei Koinkubation mit *Bet.*-APE behandelten cDC zu verzeichnen. Dies deutet auf eine Modulation der Lipidpräsentation hin, wodurch die resultierende Immunreaktion bei Kontakt mit PALMs durch eine eingeschränkte Aktivierung der NKT Zellen modifiziert ausfallen könnte. Nach Stimulation der NKT Zellen mit *Bet.*-APE und Kokultur mit  $\alpha$ -GalCer präsentierenden cDC konnte anhand des detektierten Zytokinprofils eine Netto Th2 Polarisierung des Systems beobachtet werden. Diese Daten verdeutlichen, welche Bedeutung die zeitliche und örtliche Reihenfolge des Kontakts zwischen immunmodulatorischen Substanzen und verschiedenen Immunzellen für die resultierende Immunantwort haben kann. Geeignete Modellsysteme sind nötig, um die real ablaufenden Reaktionen nachzustellen.

### **4.2.1. Indirekter Einfluss von *Bet.*-APE auf die allogene und antigenspezifische T Zell-Proliferation**

Eine Modulation der Dendritischen Zellen in Interaktion mit T Zellen kann eine modifizierte T Zell-Polarisierung bewirken und zu einer veränderten Immunantwort führen. Hierfür sind, wie in Kapitel 1.1.1.5. erläutert, verschiedene Signale der DC erforderlich. Wie bereits in Kapitel 4.1.2 beschrieben, konnte bei der Analyse der murinen cDC keine phänotypische Veränderung durch Bestandteile des wässrigen Pollenextrakts beobachtet werden, sondern lediglich eine Veränderung der funktionellen Eigenschaften in Form einer modifizierten Zytokinsekretion. Diese Modulation der cDC übt keinen Einfluss auf deren allostimulatorische und antigenspezifische Aktivität aus, was durch eine größtenteils unveränderte Proliferation naiver CD4<sup>+</sup> T Zellen in einer Kokultur mit *Bet.*-APE behandelten cDC verdeutlicht wird (vgl. Abbildung 3.9 und Abbildung 3.14). Diese Ergebnisse stehen im Kontrast zu den Daten aus dem humanen System, in dem durch *Bet.*-APE die allostimulatorische Kapazität der DC erhöht und daraus resultierend die Proliferation der T Zellen verstärkt wird [315]. Möglicherweise ist die fehlende Modulation der analysierten kostimulatorischen Moleküle auf den cDC durch *Bet.*-APE teilweise für die verschiedenen Beobachtungen verantwortlich. Weitere mögliche Gründe für die unterschiedlichen Beobachtungen im humanen und murinen System wurden bereits in Kapitel 4.1.2.1 diskutiert.

### **4.2.2. Indirekter Einfluss von *Bet.*-APE auf die allogene und antigenspezifische T Zell-Zytokinsekretion**

Auch wenn die Proliferationsrate der T Zellen durch *Bet.*-APE behandelte cDC nicht verändert ist, erscheint es möglich, dass die modifizierte Zytokinsekretion der *Bet.*-APE behandelten cDC in Abhängigkeit von ihrem Maturationsgrad einen Einfluss auf die T Zell-Polarisierung ausübt. Daher bietet das Zytokinprofil der kokultivierten T Zellen neben der Proliferationsrate einen weiteren Anhaltspunkt für eine veränderte T Zell-Polarisierung. Im humanen System wurde anhand einer Verschiebung von der IFN- $\gamma$  zu einer IL-4 Sekretion eine deutliche Th2 Polarisation der mit *Bet.*-APE modifizierten DC in einer Kokultur mit T Zellen beschrieben [315].

#### ***4.2.2.1. Toleranz statt Th2 Polarisation durch *Bet.*-APE behandelte cDC?***

Die im humanen System beobachtete Th2 Polarisation durch *Bet.*-APE behandelte DC steht im Gegensatz zu den hier gezeigten Daten, bei denen keine Modulation der T Zell-Polarisation erkennbar ist. Als Erklärung lässt sich die Induktion der IL-10 Sekretion der murinen cDC durch *Bet.*-APE Behandlung nennen, die im humanen System nicht beobachtet wird. Denkbar ist, dass somit unter den hier gewählten Bedingungen anstatt einer Th2 Polarisation eine tolerogene T Zell-Population induziert wird. *In vitro* Studien belegen, dass in Abhängigkeit von sekretiertem IL-10

immature DC aus naiven allogeenen CD4<sup>+</sup> T Zellen Typ 1 regulatorische T Zellen induzieren können [198]. Diese Tr1 Zellen zeichnen sich durch ein distinktes Zytokinprofil aus. Sie produzieren IL-10, TGF- $\beta$  und IFN- $\gamma$ , aber keine oder nur geringe Mengen an IL-2 oder IL-4 [25]. Auch in einem antigenspezifischen Modell wurde beschrieben, dass in Anwesenheit von IL-10 CD4<sup>+</sup> regulatorische T Zellen mit sowohl verminderter Proliferationskapazität und hoher IL-10 als auch niedriger oder fehlender IL-2 und IL-4 Produktion induziert werden können, die eine antigenspezifische Immunantwort hemmen [122]. Solch ein spezifisches Zytokinprofil ist in dieser Arbeit nicht deutlich zu erkennen (vgl. Abbildung 3.10, Abbildung 3.12 und Abbildung 3.15), so dass eindeutige Belege für die Induktion einer tolerogenen T Zell-Population hier fehlen.

#### ***4.2.2.2. Einfluss der eingesetzten Antigenkonzentration auf die T Zell-Polarisierung***

Es fehlt nicht nur der Hinweis auf die Induktion einer tolerogenen T Zell-Population, sondern auch der Nachweis einer Th2 Polarisierung der T Zellen, wie sie im humanen System beobachtet wird [315]. Dabei könnte die hier eingesetzte Antigenkonzentration von 23,4  $\mu$ M im antigenspezifischen Testsystem die Ausprägung einer Th2 Polarisierung unterstützen. Eine Studie von Hosken et al. belegt, dass insbesondere sehr hohe Antigenkonzentrationen (>10  $\mu$ M) als auch sehr kleine Dosen (<0,05  $\mu$ M) die Entstehung einer Th2 Polarisierung in einem antigenspezifischen System mit erhöhten IL-4 und gehemmten IFN- $\gamma$  Mengen begünstigen [144]. Im Gegensatz dazu zeigen Daten von Boonstra et al., dass nur eine sehr geringe Antigenkonzentration von 0,01  $\mu$ M eine Th2 Polarisierung der antigenspezifischen T Zellen bewirkt und höhere Dosen eine Th1 Polarisierung unterstützen [42]. Bei dem hier verwendeten Modell ist zu bedenken, dass die DC ausschließlich vor der Kokultur mit Ovalbumin inkubiert wurden und sich somit kein freies, sondern nur über MHC Klasse II präsentiertes Protein in der Kokultur befand. Dennoch ist nicht auszuschließen, dass verschiedene Antigenkonzentrationen während der Stimulation der cDC einen Einfluss auf die spätere T Zell-Polarisierung ausüben.

#### ***4.2.2.3. Einfluss des Stimulator-Responder Verhältnisses in der Kokultur auf die T Zell-Polarisierung***

Neben der Antigenkonzentration könnte auch das Verhältnis zwischen Stimulations- und Responderzellen einen Effekt auf die Polarisierung der T Zellen ausüben. So wurde z.B. in einem humanen Modell deutlich, dass bei einem geringen Stimulator-Responder Verhältnis von 1:300 eine Th2 Polarisierung der naiven T Zellen begünstigt wird. Ein hohes Verhältnis von 1:4 bewirkte eine Th1 Polarisierung mit erhöhter IFN- $\gamma$  Sekretion [310]. In dem hier gezeigten Modell wurde ein Verhältnis von 1:30 analysiert. Ob dieses Verhältnis eine Th1 oder Th2 Polarisierung unterstützt, lässt sich anhand der gezeigten Daten nicht ermitteln, denn es sind nur geringe und nicht schlüssige

Unterschiede in der Zytokinsekretion der T Zellen nach Kokultur mit *Bet.*-APE behandelten cDC zu beobachten (vgl. Abbildung 3.10, Abbildung 3.12 und Abbildung 3.15).

#### ***4.2.2.4. Einfluss von GM-CSF in der cDC-Kultur auf die T Zell-Polarisierung***

Es ist nicht auszuschließen, dass die durch *Bet.*-APE möglicherweise induzierten tolerogenen DC durch die Generierung und Stimulation in Anwesenheit von GM-CSF bzw. im humanen System von GM-CSF und IL-4 ihre eigentliche Wirkung bei der T Zell-Polarisierung nicht vollständig entfalten können. So zeigte Xiao et al. an einem Beispiel, dass sich die regulatorischen Eigenschaften der durch TGF- $\beta$  induzierten tolerogenen DC nach Generierung in Anwesenheit von GM-CSF und IL-4 verringerten [346]. Eine solche Hemmung der tolerogenen Eigenschaften der DC könnte die nicht einheitlich beobachteten Effekte in dem hier analysierten Modell erklären und die Th2 Polarisation der naiven T Zellen im humanen System begründen (vgl. Traidl-Hoffmann et al. [315]).

#### ***4.2.2.5. Einfluss des Maturationsgrades der cDC auf die T Zell-Polarisierung***

Des Weiteren existieren kontroverse Daten zur Rolle des Maturationsgrades der cDC auf die regulatorischen Eigenschaften der DC und der daraus resultierenden T Zell-Polarisierung. Häufig wird immaturren oder semi-maturren DC eine tolerogene Funktion zugeschrieben [162, 206]. Aber auch mature DC scheinen ein tolerogenes Potential aufzuweisen. Einige Studien beschreiben im Gegensatz zu der häufig beobachteten Anergie von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen gegenüber TCR-Stimulation, dass mature DC CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen zur Proliferation anregen und diese vergleichbare Proliferationsraten wie CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen aufweisen können [48, 347]. Insbesondere die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86 auf DC als auch deren Produktion von IL-2 spielen für die Expansion von antigenspezifischen Tregs eine wichtige Rolle [347]. In einer anderen Studie wiederum zeigte sich kein Einfluss des Maturationsgrades der DC auf die Expansionsfähigkeit von regulatorischen T Zellen [212].

Ein Indiz dafür, dass die maturateden cDC unabhängig von einer *Bet.*-APE Behandlung keine regulatorische Aktivität der T Zellen begünstigen, könnte das von diesen DC sekretierte IL-6 sein (vgl. Abbildung 3.6 C). So wurde beschrieben, dass insbesondere die IL-6 Sekretion von DC nach TLR Aktivierung zur Brechung der suppressiven Eigenschaften von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs beiträgt und die Aktivierung von Effektorzellen ermöglicht [260].

#### **4.2.2.6. Einfluss von IL-2 auf die T Zell-Polarisierung**

Neben der eingesetzten Antigenkonzentration und des Stimulator-Responder-Verhältnisses existieren weitere exogene Faktoren, die die T Zell-Polarisierung durch DC beeinflussen können. Zu diesen Faktoren zählt z.B. der Zusatz von IL-2 zur Kokultur. IL-2 dient in erster Linie zur Unterstützung des T Zell-Überlebens in der Kultur, da IL-2 die T Zell-Proliferation fördert. Diese kann mögliche Effekte der cDC überdecken. In einer murinen allogenen als auch antigenspezifischen MLR wurde gezeigt, dass bei Anwesenheit von IL-2 im Kulturmedium die durch den Zusatz von IL-10 gehemmte Proliferation der T Zellen partiell neutralisiert wird [355] und IL-2 in Konzentrationen von mehr als 10 U/ml die suppressiven Eigenschaften sowie die verminderte Proliferationsfähigkeit von CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T Zellen aufhebt [307]. Im Gegensatz dazu zeigte eine andere Studie, dass sich Tregs sowohl in einer antigenspezifischen als auch allogenen MLR durch DC expandieren lassen und eine besonders effektive Expansion durch den Zusatz von IL-2 zur Kultur beobachtet wird [347, 348]. Dennoch erscheint es möglich, dass in dem hier verwendeten Modell die Zugabe von IL-2 zur Kokultur eine mögliche Induktion von regulatorischen T Zellen überdeckt. Eine Studie mit humanen Th1, Th2 und Tr1 Zellklonen zeigt, dass insbesondere die Th1 und Th2 Zellklone in Anwesenheit von IL-2 zur Proliferation angeregt werden, die Tr1 Zellklone hingegen in Anwesenheit von IL-2 eine geringere Proliferationsrate aufweisen. Erst hohe Konzentrationen von IL-2 im Bereich von 2560 U/ml (entspricht 80 ng/ml) führten zu einer deutlichen Proliferationssteigerung aller T Zellklone. Von Bedeutung könnte der Befund sein, dass durch Zugabe von IL-15 die Teilungsfähigkeit aller Zellklone unterstützt wird [25]. Sollte IL-15 im murinen System die gleiche Wirkung haben, stellt dies eine Optimierungsmöglichkeit für weitere Versuchsreihen mit veränderter Fragestellung dar.

#### **4.2.2.7. Einfluss des Mausstamms auf die T Zell-Polarisierung**

Verdeutlicht wird allerdings, dass der Ursprung der Responder T Zellen einen Einfluss auf die Quantität der sekretierten Th1 oder Th2 Zytokine hat. So produzieren Th2 betonte BALB/c T Zellen deutlich mehr IL-4 als IFN- $\gamma$  (vgl. Abbildung 3.10 A – C). Im Vergleich dazu ist die Sekretion von IFN- $\gamma$  aus Th1 betonten C57BL/6 T Zellen höher als das von ihnen sekretierte IL-4 (vgl. Abbildung 3.10 D – F). IL-10 wird in beiden Systemen in größerem Maße als IL-4 gebildet, jedoch überwiegt es die Menge an IFN- $\gamma$  nur im Th2 gerichteten BALB/c System (vgl. Abbildung 3.10).

Zusammenfassend lässt sich für die T Zell-Polarisierung durch *Bet.*-APE behandelte cDC im allogenen und antigenspezifischen Testsystem sagen, dass unabhängig vom Maturationsgrad die *Bet.*-APE behandelten cDC keine eindeutige Modulation der T Zell-Polarisierung bewirken. Wie ausführlich diskutiert wurde, üben hierbei viele Faktoren einen Einfluss auf die *in vitro* nachgestellte Immunreaktion aus.

### 4.2.3. Direkter und indirekter Einfluss von *Bet.-APE* auf NKT Zellen

Neben der klassischen Polarisierung von T Zellen steht DC ein weiterer Weg zur Verfügung, die Immunantwort zu beeinflussen. Hierbei aktivieren sie durch CD1d präsentierte Lipide eine spezielle Subpopulation von T Zellen, die NKT Zellen, die nach Aktivierung große Mengen an immunmodulatorischen Zytokinen sekretieren, wodurch sie sowohl schützende als auch aggravierende immunologische Wirkungen vermitteln (vgl. Kapitel 1.1.2.6). Insbesondere den invarianten NKT (iNKT) Zellen wird bei der Entstehung von Asthma eine essentielle Rolle zugeschrieben. Auch bei Atemwegsentzündungen in sensibilisierten und provozierten Tieren zeigte sich beim Fehlen der iNKT Zellen eine verbesserte Symptomatik [12]. Die Rolle von iNKT Zellen bei respiratorischen Erkrankungen im Menschen wird derzeit kontrovers diskutiert. Zum einen heißt es, dass iNKT Zellen in den Atemwegen von Asthmatikern nicht erhöht vorkommen [242, 329]. Zum anderen liegen Daten vor, die eine erhöhte Anzahl von iNKT Zellen im respiratorischen Trakt von Asthmatikern dokumentieren [10, 215, 262]. Deutlich wird jedoch, dass iNKT Zellen eine Zellpopulation in der Lunge repräsentieren und somit beim Eintritt von Antigenen in die Atemwege mit den in der Lunge anwesenden DC in Kontakt kommen. Daraus ergibt sich die Möglichkeit, dass die von Pollen im wässrigen Milieu freigesetzten Lipidmediatoren durch Modulation der cDC auch einen Einfluss auf die CD1d-abhängige Lipidpräsentation ausüben können und die NKT Zell-Funktion beeinflussen.

Zur Analyse der durch *Bet.-APE* bewirkten funktionellen Veränderung von NKT Zellen wurde die Zytokinproduktion von mononukleären Zellen der Leber oder der Milz in Anwesenheit von *Bet.-APE* bei NKT Zell-spezifischer Aktivierung untersucht. In beiden Zellsystemen wurde die Freisetzung aller analysierten Zytokine inhibiert, wobei die IFN- $\gamma$  Sekretion stärker als die IL-4 oder IL-13 Sekretion gehemmt wurde. Gezielte Kokulturen von NKT Zellen mit  $\alpha$ -GalCer präsentierenden cDC unterstützten das Ziel, die beobachteten Effekte in der Mischkultur einer definierten Zellpopulation zuordnen zu können. Hierfür wurde vor der Kokultur entweder die NKT Zellpopulation oder die cDC Zellpopulation mit *Bet.-APE* behandelt. Es zeigte sich, dass sowohl die cDC als auch die NKT Zellen in ihrer Funktion durch *Bet.-APE* moduliert werden und sich diese Effekte additiv in den Mischkulturen widerspiegeln.

Diese Daten bestätigen, dass *Bet.-APE* sehr potente Komponenten enthält, die vielschichtig die Funktion von zahlreichen Immunzellen, insbesondere DC und NKT Zellen, modulieren und somit die resultierende Immunantwort beeinflussen können.

#### 4.2.3.1. Indirekter Einfluss von *Bet.-APE* auf NKT Zellen durch modulierte cDC

Da bereits nachgewiesen wurde, dass Lipide aus Pollen CD1-abhängig gebunden werden und NKT Zellen aktivieren können [5], wurde in einer Kokultur von *Bet.-APE* behandelten cDC mit einem

NKT Zell-Hybridom analysiert, ob *Bet.*-APE behandelte cDC ohne  $\alpha$ -GalCer-Präsentation NKT Zellen aktivieren und eine Zytokinsekretion induzieren. Diese Hypothese bestätigte sich jedoch nicht (Daten zu Abbildung 3.21 siehe Anhang Kapitel 10.1). Allerdings zeigte sich eine Modulation der NKT Zellen nach  $\alpha$ -GalCer Beladung der *Bet.*-APE behandelten cDC. Diese veränderte NKT Zell-Funktion äußerte sich in einer gleichmäßigen Hemmung der Produktion von sowohl Th1 als auch Th2 polarisierenden Zytokinen (siehe Abbildung 3.21 A – C). Daraus lässt sich ableiten, dass die in *Bet.*-APE enthaltenen Lipide keine natürlichen Liganden zur Aktivierung von NKT Zellen darstellen. Doch die Reduktion aller in diesem Modell analysierten Zytokine nach Stimulation mit *Bet.*-APE und anschließender Aktivierung mit  $\alpha$ -GalCer deutet an, dass Komponenten von *Bet.*-APE entweder die Expression von CD1d modulieren oder die Antigenpräsentation über CD1d beeinträchtigen, so dass die Aktivierung der NKT Zellen nicht optimal durch  $\alpha$ -GalCer erfolgen kann. Eine Analyse der CD1d Expression auf den murinen DC ergab allerdings, dass unabhängig vom Aktivierungsgrad *Bet.*-APE die Expression von CD1d auf cDC nicht beeinflusst (vgl. Abbildung 3.22). Eine Beobachtung im humanen System mit DC aus Atemwegen von Asthmatikern beschreibt hingegen sogar einen Anstieg an CD1d exprimierenden DC nach der Aufnahme von ganzen Pollen [298]. Da die Expression von CD1d durch *Bet.*-APE nicht beeinflusst wird, ist es denkbar, dass stattdessen die in *Bet.*-APE enthaltenen Lipide mit der CD1d-Bindungstasche interagieren oder deren Konformation modifizieren. Es zeigt sich, dass sich die Struktur von CD1d mit der Bindung von  $\alpha$ -GalCer verändert. In einem unbeladenen Zustand weist die Bindungstasche eine offene Konformation auf, was die Beladung mit einem Lipid begünstigt [180]. Sollte *Bet.*-APE die Präsentation von  $\alpha$ -GalCer über eine veränderte Konformation beeinflussen, könnte dies Auswirkungen auf die hohe Bindungsaffinität zwischen CD1d- $\alpha$ -GalCer und dem entsprechenden TCR auf den NKT Zellen haben [52] und so möglicherweise eine verminderte Aktivierung der NKT Zellen bedingen. Diese Hypothese könnte durch eine Röntgenkristallstrukturanalyse von CD1d vor und nach Behandlung mit *Bet.*-APE belegt werden. Weiterhin könnte man durch *in vitro* Experimente, in denen die Reihenfolge der zugegebenen Stimulanzen verändert wird, erste Anhaltspunkte erhalten, ob diese Hypothese der kompetitiven Bindung von in *Bet.*-APE enthaltenen Lipiden mit  $\alpha$ -GalCer an CD1d zutrifft. Zu bedenken ist bei diesen Erklärungen, dass möglicherweise die konstitutive Expression von CD1d auf den aus Knochenmark generierten DC kein natürliches Bild widerspiegelt, so dass die beobachteten Effekte eventuell keine real existierende Reaktion repräsentieren.

*In vivo* könnte die Interaktion von *Bet.*-APE mit CD1d-Molekülen große Bedeutung haben. Denkbar ist, dass bei einer entstehenden Atemwegsentszündung endogene Glycolipide gebildet werden und diese durch Pollenbestandteile ihre CD1d abhängige Aktivierung der iNKT Zellen nur eingeschränkt ausüben können. Dies könnte die Sekretion der für die Entstehung der AHR wichtigen Zytokine inhibieren und als Schutzmechanismus einen Erklärungsansatz bieten, weshalb die meisten Menschen nicht allergisch reagieren. Neben einer erhöhten Anzahl an CD1d



exprimierenden DC in Asthmatikern fehlen bislang im humanen System weitere Belege, dass iNKT Zellen einen Beitrag zur Symptomatik leisten [298].

#### **4.2.3.2. Direkter Einfluss von *Bet.-APE* auf NKT Zellen**

Da bei einem ersten Kontakt der Pollen in den Atemwegen nicht nur DC, sondern auch NKT Zellen präsent sind, ist es von Interesse, auch den direkten Effekt von *Bet.-APE* auf NKT Zellen zu untersuchen. Bei Behandlung der NKT Zellen mit *Bet.-APE* vor der Kokultur zeigte sich eine deutliche Hemmung des Th1 Zytokins IFN- $\gamma$  bei gleichzeitig geringer Induktion des Th2 Zytokins IL-4 und deutlicher Induktion des IL-13 (siehe Abbildung 3.21 D – F). Auch hier induzierte *Bet.-APE* in Abwesenheit von  $\alpha$ -GalCer-beladenen cDC keine Zytokinsekretion in NKT Zellen. Es ist denkbar, dass *Bet.-APE* eine phänotypische Veränderung der NKT Zellen induziert und die Expression kostimulatorischer Moleküle modifiziert, was die Interaktion mit den DC beeinflusst und zu einer differentiellen Sekretion der Zytokine führt. Als mögliches Beispiel kommt eine modifizierte Expression von CD40L in Frage. Hayakawa et al. beschreibt in einer Studie, dass bei einer Blockierung der CD40-CD40L Interaktion insbesondere die durch  $\alpha$ -GalCer induzierte IFN- $\gamma$  Sekretion gehemmt, dafür die IL-4 Sekretion verstärkt wird [136]. Weiterhin erscheint es aufgrund der Herunterregulation von IFN- $\gamma$  möglich, dass *Bet.-APE* einen Einfluss auf den in NKT Zellen konstitutiv exprimierten Transkriptionsfaktor T-bet ausübt, da dieser Faktor für die Regulation der IFN- $\gamma$  Produktion essentiell ist [282].

#### **4.2.3.3. Auswirkungen von *Bet.-APE* auf NKT Zellen aus Leber und Milz**

Bei der Stimulation der mononukleären Zellen aus der Leber oder der Milz mit steigenden Konzentrationen von *Bet.-APE* und der spezifischen iNKT Zellaktivierung mit  $\alpha$ -GalCer wird IFN- $\gamma$  konzentrationsabhängig durch *Bet.-APE* gehemmt. Die Effekte von *Bet.-APE* auf IL-4 und IL-13 fallen deutlich verhaltener aus und zeigen teilweise nur eine geringfügige Hemmung in der höchsten Konzentration (vgl. Abbildung 3.18 und Abbildung 3.20). Interessant ist, dass sich die Auswirkungen des *Bet.-APE* auf die Einzelzellpopulationen als annähernd additive Effekte in den Mischkulturen widerspiegeln (vgl. Abbildung 3.18 D – F und Abbildung 3.20D – F mit Abbildung 3.21).

Dennoch lässt sich diese beobachtete Netto Th2 Polarisierung der Mischkulturen nicht eindeutig auf eine Modulation der enthaltenen iNKT Zellen oder cDC durch *Bet.-APE* zurückführen. Diese Zellpopulationen sind zwar initial durch die  $\alpha$ -GalCer Präsentation und Aktivierung an der Zytokinsekretion beteiligt, doch ist eine Reaktionskaskade mit Aktivierung weiterer Zellpopulationen, die ebenfalls durch *Bet.-APE* funktionell verändert sein könnten, denkbar. Ein Beispiel dafür bietet eine Studie von Sen et al. Sie zeigt, dass iNKT Zellen der bronchialen Schleimhaut von Asthmatikern primär einen durch die Sekretion von IFN- $\gamma$  und IL-2

charakterisierten Th1 Phänotyp aufweisen, gleichzeitig aber in CD3<sup>+</sup> T Zellen die Expression von Th2 gerichteten Zytokinen wie IL-4 und IL-13 induzieren und somit einen Beitrag zur Entstehung von allergischem Asthma leisten [285]. Im Gegensatz dazu zeigt eine andere Studie, dass iNKT Zellen auch direkt durch die Produktion von IL-4 und IL-13 einen Einfluss auf die Entstehung einer Atemwegsentzündung und AHR ausüben können und bei der Pathogenese von allergischem Asthma eine Rolle spielen [12, 201]. Ebenfalls kann nicht ausgeschlossen werden, dass die dominierende Produktion von IL-4 und IL-13 neben einer Th2 Polarisierung auch die Induktion von regulatorischen T Zellen bewirkt. Nach einer Studie von Skapenko et al. ist es möglich, dass IL-4R bindende Zytokine wie IL-4 und IL-13 in Abhängigkeit von antigenspezifischer Stimulation und B7-Kostimulation die Umwandlung von naiven humanen CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> Zellen in Foxp3-exprimierende CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Tregs unterstützt [291].

### **4.3. Der Einfluss von T Zell-unabhängigem und aus T Zellen stammendem IL-10 auf die Immuntherapie**

Die Zahl allergischer Erkrankungen nimmt stetig zu und betrifft immer mehr Menschen mit einem wachsenden Anteil an allergischem Asthma. Bisher stehen zahlreiche Medikamente zur Behandlung der Symptome zur Verfügung. Die einzige kausale Behandlungsmethode, das fehlgesteuerte Immunsystem zu regulieren, stellt derzeit die spezifische Immuntherapie dar. Zur Aufklärung der Wirkmechanismen wurde von van Oosterhout et al. ein murines IT-Modell zum allergischen Asthma etabliert, welches in Analogie zu einem im humanen angewandten Protokoll mit mittlerer Dosissteigerung zweimal pro Woche über acht Wochen durchgeführt wird [323]. Er zeigt, dass diese IT eine signifikante Verbesserung der Symptomatik in sensibilisierten und provozierten Mäusen bewirkt. Ein verkürztes Hochdosis-IT-Protokoll mit nur drei subkutanen Ovalbumininjektionen weist eine vergleichbare Wirksamkeit auf [331] und dient in dieser Arbeit als Grundlage für die Optimierung des Protokolls für die Analysen mit C57BL/6 Mäusen. Die Wirksamkeit der IT in Wildtypen wurde mit der in konditionellen *knock out* Mäusen, deren T Zellen IL-10-defizient sind, verglichen, um einen formalen Beleg für die häufig beschriebene Rolle von IL-10 aus T Zellen bei der IT zu erhalten. Als zentrales Ergebnis dieser Arbeit zeigte sich jedoch, dass T Zell-abhängiges IL-10 für die verminderte Inflammation in der Lunge nach IT nur eine geringe Bedeutung hat und T Zell-unabhängiges IL-10 für die Wirksamkeit der IT von Relevanz ist. Als Quelle dieses essentiellen IL-10 sind B Zellen, DC, Mastzellen, Makrophagen oder Monozyten denkbar. NKT Zellen spielen für eine verbesserte Symptomatik durch eine IT keine wesentliche Rolle, wie die Untersuchung von NKT Zell-defizienten Mäusen im Rahmen dieser Arbeit zeigte.

### 4.3.1. Rolle von Gesamt-IL-10 bei der Immuntherapie

Der genaue Wirkmechanismus der IT ist bisher nicht vollständig aufgeklärt. Verschiedene Studien haben bereits eine essentielle Rolle für IL-10 in einer erfolgreichen IT aufgezeigt. Die ersten Studien hierzu wurden 1997 von Bellinghausen et al. und 1998 von Akdis et al. veröffentlicht. Sie zeigten unabhängig voneinander, dass CD4<sup>+</sup> Zellen aus PBMC von Insektengift-Allergikern nach erfolgreicher IT verstärkt IL-10 sekretieren und durch Neutralisierung des IL-10 die durch die IT gehemmte Proliferation und Zytokinsekretion von allergenspezifischen T Zellen aufgehoben werden konnte [15, 33]. Durch intrazelluläre Zytokinbestimmung konnten Akdis et al. verdeutlichen, dass neben CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Zellen auch B Zellen und Monozyten zur IL-10 Sekretion beitragen [15]. Vissers et al. zeigten *in vivo*, dass durch die Gabe eines Antikörpers gegen den IL-10 Rezeptor während einer IT in wt Mäusen die Wirksamkeit der IT deutlich vermindert wird. Allerdings konnte in der Zellkultur von Lungenzellen und Brustlymphknoten der immuntherapierten Mäuse nach OVA-Restimulation kein Anstieg von IL-10 sekretierenden CD4<sup>+</sup> Zellen detektiert werden. Dennoch wird in dieser Studie deutlich, welchen Stellenwert IL-10 für den Erfolg einer IT einnimmt [331]. Seitdem haben zahlreiche weitere Studien eine Korrelation zwischen IL-10 und dem Erfolg einer IT beschrieben [14, 98, 164, 244, 249]. Auch in dieser Arbeit konnte der Zusammenhang zwischen IL-10 und der Wirksamkeit der IT durch Anwendung einer IT bei IL-10-defizienten Mäusen gezeigt werden (vgl. Abbildung 3.25). Vor Anwendung der IT galt es, IL-10 k.o. Mäuse mit Wildtypen im OVA-Asthmamodelle ohne IT zu vergleichen. In sensibilisierten wt wie IL-10 k.o. Mäusen führte eine Allergenprovokation zu einer vergleichbaren Zellzahlerhöhung in der BALF sowie zu einer ausgeprägten Eosinophilie in den Atemwegen (vgl. Abbildung 3.23 und Abbildung 3.25). Dies ist im Einklang mit der zitierten Literatur. Dort wird zwar beschrieben, dass in IL-10-defizienten Mäusen nur eine eingeschränkte allergische AHR induziert werden kann, aber eine Inflammation der Lunge sogar verstärkt oder zumindest vergleichbar mit Wildtypen zu beobachten ist [163, 208]. Im Gegensatz zu den Daten von Mäkelä et al. und Justice et al. trat in der vorliegenden Arbeit bei IL-10 k.o. Mäusen keine zeitgleiche Induktion von IL-5 als Indikator einer Th2-gerichteten Reaktion parallel zur Inflammation in der Lunge auf. Dies steht im Einklang mit einem verminderten IL-5 Gehalt in der BALF bei gleichzeitiger Infiltration mit Eosinophilen in der Lunge, die von Tournoy et al. beobachtet wurde [312]. Es zeigte sich, dass möglicherweise nicht die lokale IL-5 Produktion in der Lunge, sondern systemisch zirkulierendes IL-5 die antigeninduzierte Rekrutierung der Eosinophilen in die Lunge begünstigt [341]. Neben IL-5 lenken weitere Botenstoffe wie z.B. IL-4, IL-13, Adhäsionsmoleküle, Chemokine wie RANTES und Eotaxine die Eosinophilen zu den inflammatorischen Regionen. Hier stellen insbesondere IL-5 und Eotaxine selektive Signale für die Rekrutierung von Eosinophilen dar [272]. Eotaxin wird durch IL-4 und IL-13 über einen STAT-6 abhängigen Signalweg induziert und kann auch IL-5 unabhängig Eosinophile in das Lungengewebe lenken [222, 361]. Ein weiteres Indiz dafür, dass neben IL-5 weitere Moleküle einen Einfluss auf die Rekrutierung von Eosinophilen in

die Lunge ausüben, liefert eine humane Studie, in der die eosinophile Inflammation der Lunge nach Behandlung mit  $\alpha$ -IL-5 nur zu 55% vermindert war [96].

Nachdem die OVA-sensibilisierten IL-10 k.o. Mäuse eine vergleichbare Entzündung nach aerogener Allergenexposition wie die Wildtypen entwickelten, wurden die Auswirkungen einer IT in IL-10 k.o. Mäusen untersucht. Wie bereits erwähnt zeigte die IT in IL-10 k.o. Mäusen keine vollständige Wirksamkeit. Es war trotz Behandlung weiterhin eine intensive eosinophile Atemwegsinfektion im Vergleich zu den Wildtypen zu beobachten (vgl. Abbildung 3.25). So bestätigte sich die Hypothese, dass der Erfolg einer IT im Mausmodell von IL-10 abhängig ist.

### 4.3.2. Rolle von T Zell-abhängigem IL-10 in der Immuntherapie

Es stellt sich die Frage, aus welcher Zellpopulation das für die Wirksamkeit der IT essentielle IL-10 stammt. In verschiedenen Studien wurde bereits angedeutet, dass insbesondere regulatorische T Zellen durch die Sekretion von IL-10 einen wichtigen Bestandteil des Wirkmechanismus der IT ausmachen. So zeigte Meiler et al., dass sich nach wiederholten Insektenstichen bei Imkern das Verhältnis von antigenspezifischen Th1, Th2 und Treg Zellen zugunsten der IL-10 produzierenden Tr1 Zellen verschiebt [228]. Ebenso ergab sich eine erhöhte Anzahl an IL-10 produzierenden allergenspezifischen  $CD4^+CD25^+$  Zellen in der Peripherie von immuntherapierten Probanden [98, 164]. Eine Studie von Joetham et al. verdeutlicht, dass das intratracheale Applizieren von  $CD4^+CD25^+$  naiven T Zellen vor der Allergenprovokation von sensibilisierten Mäusen eine verbesserte Symptomatik bewirkt, die jedoch nicht nach Applikation von  $CD4^+CD25^+$  Tregs aus IL-10-defizienten Mäusen beobachtet werden kann. Interessanterweise kann der suppressive Effekt wieder hergestellt werden, wenn diese IL-10-defizienten  $CD4^+CD25^+$  Zellen über Nacht mit rekombinantem IL-10 inkubiert werden, da sie dann in der Lage sind, TGF- $\beta$  zu sekretieren, welches für die verbesserte Symptomatik verantwortlich ist [159]. Im Gegensatz dazu zeigt eine Studie von Kearley et al., dass der systemische Transfer von  $CD4^+CD25^+$  Zellen aus IL-10-defizienten TCR transgenen DO11.10 Mäusen doch eine Verbesserung der Symptomatik bewirken kann. Dies wird hier auf die Induktion von IL-10 in Empfänger- $CD4^+$  Zellen zurückgeführt, da diese Zellpopulation die einzige mit verstärkter IL-10 Sekretion ausmachte. Ein Einfluss von induziertem TGF- $\beta$  wurde ausgeschlossen, da keine erhöhte TGF- $\beta$  Sekretion detektiert werden konnte. Weiterhin wurde nach Transfer von  $CD4^+CD25^+$  Zellen weder in Makrophagen, DC, Granulozyten noch in  $CD8^+$  T Zellen eine IL-10 Sekretion nachgewiesen. Lediglich ein geringer Prozentsatz an B Zellen sekretierte in unveränderter Weise IL-10 [175]. Eine weitere Studie zeigt anhand von Mäusen mit IL-10-defizienten Foxp3<sup>+</sup> Zellen, dass IL-10 aus diesen regulatorischen Foxp3<sup>+</sup> T Zellen die Ausprägung einer AHR und Atemwegsinfektion in sensibilisierten Mäusen nach Allergenprovokation vermindert [274].

Bislang fehlt der formale Beleg für die Quelle des IL-10, die im Zusammenhang mit einer allergischen Reaktion tatsächlich essentiell für den Erfolg einer IT ist, denn IL-10 wird von vielen

verschiedenen Zelltypen sekretiert. Seine jeweilige Rolle hängt nicht nur von der Quelle, sondern auch von der Art und Intensität des Stimulus sowie vom Wirkungsort ab. Um nun formal zu zeigen, dass das für die IT essentielle IL-10 im untersuchten Modell tatsächlich aus T Zellen stammt, wurde die IT an konditionellen *knock out* Mäusen mit IL-10-defizienten T Zellen angewandt. Entgegen den Erwartungen war eine Infiltration der Lunge mit Eosinophilen in diesen Mäusen nach IT nicht mehr zu beobachten (vgl. Abbildung 3.27), so dass von T Zellen freigesetztes IL-10 nicht essentiell für den Erfolg einer IT im untersuchten Modell zu sein scheint. Gleichzeitig bewirkte allerdings eine Neutralisierung des verbleibenden IL-10 in diesen Mäusen nur eine partielle Aufhebung der durch die IT verbesserten Lungeninflammation (vgl. Abbildung 3.29). Eine Erklärung hierfür ist, dass neben IL-10 weitere Botenstoffe, wie z.B. TGF- $\beta$ , zur Wirksamkeit der IT in dem hier verwendeten Modell beitragen und möglicherweise das fehlende IL-10 kompensieren [159]. Es ist allerdings auch nicht vollständig auszuschließen, dass eine zu geringe Menge an  $\alpha$ -IL-10R Antikörpern für eine vollständige Neutralisierung des verbleibenden T Zell-unabhängigen IL-10 appliziert wurde und aus diesem Grund nur eine partielle Aufhebung der Effekte zu beobachten ist. So wurden die Tiere in der Studie von Vissers et al. mit 500  $\mu$ g [331] im Gegensatz zu den in dieser Arbeit eingesetzten 300  $\mu$ g des  $\alpha$ -IL-10 Rezeptor Antikörpers behandelt. Allerdings wurde im Rahmen eines OVA-IT Versuchs an C57BL/6 wt Mäusen die Wirksamkeit des aufgereinigten  $\alpha$ -IL-10 Rezeptor Antikörpers beim Einsatz von 250  $\mu$ g vs. 500  $\mu$ g getestet. Hierbei wurde unabhängig von der eingesetzten Antikörper-Dosis eine Aufhebung der durch die IT verbesserten Lungeninflammation beobachtet. Sollte dennoch die applizierte Antikörper-Dosis nicht hoch genug gewesen sein, um die vollständige Aufhebung der Effekte der IT zu bewirken, ließe dies die Schlussfolgerung zu, dass neben anderen Botenstoffen T Zell-unabhängiges IL-10 in diesem Modell zum Erfolg der IT einen essentiellen Beitrag leistet. Dieses T Zell-unabhängige IL-10 könnte eine Hemmung von in der allergischen Reaktion involvierten Botenstoffen wie z.B. Eotaxin bewirken und zum Erfolg der IT in diesen konditionellen *knock out* Mäusen beitragen [58]. Als mögliche Quellen für dieses T Zell-unabhängige IL-10 kommen verschiedene Zelltypen, wie z.B. Makrophagen, B Zellen, Monozyten, DC und Mastzellen in Frage.

### **4.3.3. T Zell-unabhängiges IL-10 in der Immuntherapie**

#### ***4.3.3.1. B Zellen als Quelle des IL-10***

Von großem Interesse als Quelle des T Zell-unabhängigen IL-10 sind B Zellen. Erst vor kurzem wurden IL-10 produzierende B Zellen mit regulatorischen Funktionen beschrieben, die sich anhand der Expression von CD1d<sup>hi</sup> CD5<sup>+</sup> charakterisieren lassen und 1-2% der B220<sup>+</sup> Milzzellen, sowie 7-8% peritonealer B Zellen in Wildtypen ausmachen [220, 349]. In einem Modell zum allergischen Kontaktexzem konnte die verstärkte Symptomatik in CD19-defizienten oder B Zell-depletierten Mäusen durch adoptiven Transfer von CD1d<sup>hi</sup> CD5<sup>+</sup> B Zellen aus sensibilisierten Wildtypen wieder

aufgehoben werden [349]. Eine andere Studie zeigt, dass B-1b Zellen eine tolerogene Wirkung vermitteln. Ein adoptiver Transfer von B-1b Zellen aus OVA-sensibilisierten in naive B Zell-defiziente Tiere führte in diesen Tieren nach Sensibilisierung zu einer schwächeren Immunreaktion auf humoraler und zellulärer Ebene als in Kontrolltieren [70]. Auch in humanen B Zellen konnte nach Stimulation mit Allergenextrakten IL-10 induziert werden, welches die Sekretion von IgE hemmt, was ein weiterer Hinweis auf einen möglichen Wirkmechanismus der spezifischen IT ist [232]. Diese Studien lassen die Vermutung aufkommen, dass B Zellen die Quelle des T Zell-unabhängigen IL-10 in der IT darstellen. Auch die antigenspezifische Wirkungsweise der regulatorischen B Zellen steht im Einklang mit den hier gezeigten Daten (vgl. Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24). Es zeigte sich allerdings bei der Analyse des Einflusses von NKT Zellen unter Verwendung von CD1d defizienten Mäusen (vgl. Kapitel 1.2.4 Ergebnisse), dass Zellen, die CD1d exprimieren, wozu IL-10 produzierende regulatorische B Zellen zählen, keinen Einfluss auf die Wirksamkeit der IT ausüben. Die Expression von CD1d auf den regulatorischen B10 Zellen, die durch den Phänotyp  $CD1d^{hi}CD5^{+}$  charakterisiert werden, scheint mit der hohen IL-10 Sekretion der Zellen zu korrelieren. Yanaba et al. zeigten, dass B Zellen mit dem Phänotyp  $CD1d^{lo}CD5^{+}$  oder  $CD1d^{lo}CD5^{-}$  nur geringe Mengen an IL-10 sekretieren. Sobald CD1d aber auf diesen Zellen exprimiert wird - insbesondere in Kombination mit  $CD5^{+}$ , steigt der prozentuale Anteil an IL-10 produzierenden B Zellen stark an [350]. Daraus lässt sich ableiten, dass vermutlich diese  $CD1d^{hi}CD5^{+}$  regulatorischen B Zellen in diesem Modell keine Rolle spielen.

#### ***4.3.3.2. DC als Quelle des IL-10***

Neben regulatorischen B Zellen wurden auch regulatorische DC mit verstärkter IL-10 Sekretion assoziiert. Akbari et al. zeigte, dass DC der Atemwege durch IL-10 Produktion Toleranz vermitteln. Hierbei wurden pulmonale DC aus OVA-exponierten Wildtypen bzw. aus IL-10-defizienten Mäusen adoptiv in naive Wildtypen transferiert, diese sensibilisiert und mit Allergen provoziert. Nur die aus dem Wildtyp stammenden DC wirkten in den adoptiv transferierten Tieren tolerogen, was sich in einer Hemmung der Proliferation von restimulierten Milzzellen zeigte [9]. Ebenso induzierten IL-10 überexprimierende DC nach wiederholter Stimulation die Entstehung regulatorischer T Zellen aus naiven DO11.10  $CD4^{+}$  Zellen. Die tolerogene Funktion wurde im Anschluss durch die Hemmung der antigenspezifischen Proliferation von naiven DO11.10  $CD4^{+}$  Zellen *in vitro* belegt [100]. Auch *in vivo* konnte eine einmalige intratracheale Applikation von OVA-beladenen IL-10-transduzierten DC in naive Empfängertiere diese Tiere lang anhaltend vor einer Atemwegsentzündung und -überempfindlichkeitsreaktion nach Allergenprovokation schützen [137]. Auch Langerhans Zellen (LC) spielen möglicherweise eine Rolle bei der induzierten Toleranz, die durch s.c. Injektion von Antigen erreicht wurde. So zeigte Yoshiki et al. in einem Hyposensibilisierungsmodell zur Kontaktdermatitis (Typ IV Allergie), dass IL-10 produzierende LC durch Induktion von regulatorischen T Zellen die Immunreaktion inhibieren [353]. In einer

weiteren Studie wurde für aktivierte plasmazytoide DC ebenfalls eine tolerogene Wirkung aufgrund von sekretiertem IL-10 beschrieben [337].

Neben der IL-10 Sekretion der DC scheint ebenfalls die Bildung von Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) einen wichtigen Beitrag zur Toleranzinduktion durch DC zu leisten. So wurde beschrieben, dass DC der oralen Schleimhäute mit Langerhans-ähnlicher Morphologie den hoch affinen FcεRI-Rezeptor für IgE exprimieren und bei Bindung von IgE IL-10, TGF-β und IDO sekretieren, wodurch die T Zell-Proliferation gehemmt werden kann [19, 240, 333]. Unterstützt werden diese Daten von einer Studie, die zeigt, dass die Expression von IDO in DC aus drainierenden Lymphknoten der Nase zur Toleranzinduktion gegenüber eingeatmeten Antigenen beiträgt [321]. Insbesondere bei der Analyse der Rolle von IDO in der IT wurde deutlich, dass eine Inhibierung des Enzyms während der IT, nicht aber während der späteren Allergenprovokation, partiell die positive Wirkung der IT aufhebt [306].

#### ***4.3.3.3. Monozyten und Makrophagen als Quelle des IL-10***

Nicht nur B Zellen und DC sekretieren IL-10. Auch Monozyten stellen eine Quelle für T Zell-unabhängiges IL-10 dar. Akdis et al. detektierte nach IT neben CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> regulatorischen T Zellen auch B Zellen und Monozyten als Quellen für induziertes IL-10 in humanem Blut [15].

Möglicherweise spielt auch das IL-10 aus Makrophagen eine Rolle bei der Toleranzerhaltung und –induktion. So wurde beschrieben, dass alveolare Makrophagen von Asthmatikern weniger IL-10 produzieren als vergleichbare gesunde Kontrollen [160]. Hinzu kommt, dass neben CD3<sup>+</sup> T Zellen auch CD68<sup>+</sup> Makrophagen nach IT in der Nasenschleimhaut von Probanden als Quelle für sekretiertes IL-10 detektiert wurden [249].

#### ***4.3.3.4. Mastzellen als Quelle des IL-10***

Seit kurzem ist auch bekannt, dass Mastzellen neben ihrer Effektorfunktion auch immunsuppressive Wirkungen ausüben können, für die bisher noch keine distinkte Subpopulation beschrieben wurde [104]. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Beobachtung, dass induziertes antigenspezifisches IgG1 über den FcγRIII-Rezeptor auf Mastzellen IL-10 induzieren kann. Dieses von Mastzellen stammende IL-10 ist in der Lage, die auftretende Symptomatik der allergischen Kontaktdermatitis zu vermindern [119]. Es ist denkbar, dass IL-10 aus Mastzellen nicht nur einen hemmenden Effekt auf die allergische Kontaktdermatitis hat, sondern ebenfalls in der IT der Typ I Allergie von Interesse ist. So könnte das durch die IT induzierte antigenspezifische IgG1 in den Mastzellen IL-10 induzieren, wie es für die Typ IV Allergie bereits gezeigt werden könnte [119] und so einen Beitrag zur Wirksamkeit der IT leisten.

#### 4.3.4. Bedeutung von OVA-spezifischem IgG1 während der IT

Ein besonderes Kennzeichen der Hochdosis-IT ist der starke Anstieg des OVA-spezifischen IgG1 mit dem Verlauf der Injektionen. Dieser wird in allen hier untersuchten Mauslinien beobachtet und fällt außer in der IL-10-defizienten Maus nach der Allergenprovokation wieder ab (vgl. Abbildung 3.24, Abbildung 3.26, Abbildung 3.28, Abbildung 3.30 und Abbildung 3.32). Eine mögliche funktionelle Bedeutung dieses Anstiegs könnte sich aus der Klassifizierung des IgG1 in zwei Subklassen (anaphylaktisch vs. nicht-anaphylaktisch) ergeben. Die Bildung dieser zwei IgG1 Subklassen wird in einer Studie von Faquim-Mauro et al. im murinen System beschrieben. Hierbei wird gezeigt, dass in Abhängigkeit vom Antigen und dem verwendeten Adjuvanz bei der Sensibilisierung zwei Subklassen von IgG1 gebildet werden können, die sich anhand ihrer anaphylaktischen Aktivität unterscheiden. Aluminumhydroxid als Adjuvanz induziert hauptsächlich das anaphylaktische IgG1, wohingegen das Th1-induzierende Complete Freund's Adjuvanz bevorzugt die Bildung des nicht-anaphylaktischen IgG1 bewirkt [91, 92].

Anaphylaktisches IgG1 wird im Rahmen von allergischen Reaktionen mit einer Verstärkung der Atemwegsentzündungen assoziiert [207]. Eine Studie zur Induktion von mukosaler Toleranz während bzw. nach der Immunisierung von Keller et al. belegt, dass neben einer verbesserten Symptomatik der allergischen Reaktion eine verminderte Produktion von anaphylaktischem IgG1 und IgE zu beobachten ist. Das nicht-anaphylaktische IgG1 bleibt durch die Toleranzinduktion unbeeinflusst [176]. Übertragen auf die hier gezeigten Daten könnte durch die Applikation von OVA V, wie auch in der Studie von Keller et al. verwendet, bei der IT eine Verschiebung von anaphylaktischem zu nicht-anaphylaktischem IgG1 unter Mitwirkung von induziertem IL-10 und IFN- $\gamma$  auftreten [290]. Die Hemmung der Bildung von anaphylaktischem IgG1 in den IL-10-defizienten Mäusen ist durch die fehlende Induktion von IL-10 nur begrenzt möglich [290]. Das würde bedeuten, dass in diesen Tieren bei der IT weiterhin anaphylaktisches IgG1 induziert wird, welches neben der erhöhten Sterblichkeit während der IT die starke Entzündung der Atemwege erklären könnte. Eine Korrelation der Wirksamkeit der IT mit dem Verhältnis von anaphylaktischem zu nicht-anaphylaktischem IgG1 ist denkbar. Überträgt man dieses Modell der zwei Subklassen des IgG1 auf das humane System, würden diese Subklassen bei IgG4 auftreten, da murines IgG1 dem humanen IgG4 entspricht [204]. Ein solches Modell würde erklären, warum beim Menschen die Menge des Gesamt-IgG4 nicht immer mit dem Erfolg der IT korreliert werden kann und zahlreiche kontroverse Daten diesbezüglich veröffentlicht sind [2, 79, 200, 225]. Neue Studien demonstrieren immer häufiger, dass die durch eine IT induzierten allergenspezifischen IgG Antikörper blockierende Eigenschaften aufweisen und funktionelle Tests bezüglich dieser protektiven IgG Antikörper als Parameter für die Wirksamkeit der IT geeigneter erscheinen als der Gesamt-IgG Gehalt des Serums [97, 237, 249, 336].



### 4.3.5. Bedeutung von OVA-spezifischem IgE in der IT

Die Bildung von OVA-spezifischem IgE wird bei sensibilisierten C57BL/6 Mäusen durch die Allergenprovokation induziert. Eine IT verhindert diese Induktion, so dass nur geringe Mengen an OVA-spezifischem IgE im Serum detektierbar sind. Interessant ist, dass in dieser Arbeit sämtliche analysierten Mauslinien nach IT und Allergenprovokation keine OVA-spezifischen IgE Konzentrationen im Serum aufweisen. Das ist erstaunlich, da bei der IL-10-defizienten Maus nach IT weiterhin eine schwere Entzündung in der Lunge zu beobachten ist. Auch nach Neutralisation von T Zell-unabhängigem IL-10 in Mäusen mit IL-10-defizienten CD4<sup>+</sup> T Zellen ist keine Erhöhung des OVA-spezifischem IgE zu erkennen. Allerdings wird hierbei auch nur eine partielle Aufhebung der verbesserten Lungeninflammation verzeichnet (vgl. Abbildung 3.29 und Abbildung 3.30 B). Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die Menge des OVA-spezifischen IgE im Serum der Mäuse nicht im Zusammenhang mit dem Ausmaß der allergischen Entzündung in der Lunge steht. Im Gegensatz zu diesen Daten ging die bei Vissers et al. durch Neutralisation von IL-10 bedingte Aufhebung der IT-Wirkung und somit verstärkte Inflammation der Lunge einher mit einer Erhöhung des OVA-spezifischen IgE [331]. Diese Diskrepanz zwischen der Studie von Vissers et al. und der vorliegenden Arbeit könnte in der Analyse von zwei verschiedenen Mausstämmen begründet sein. Verschiedene Studien haben belegt, dass in Abhängigkeit vom Mausstamm nach Behandlung mit dem gleichen Sensibilisierungsprotokoll genotypbedingt verschiedene Ausprägungen der Atemwegsinfammation auftreten können [46, 339, 360]. In diesen Studien werden unter anderem C57BL/6 und BALB/c Mäuse untersucht, wobei beide Mausstämme vergleichbare Infiltrationen der Lunge mit Eosinophilen entwickeln, C57BL/6 Mäuse allerdings mit einer deutlich geringeren Konzentration an OVA-spezifischem IgE im Serum [46].

### 4.3.6. Die Rolle von IL-13 in der IT

Auch IL-13 leistet einen wichtigen Beitrag zur allergischen Inflammation der Lunge. Es dient als Indikator für eine Th2-gerichtete Immunreaktion [344]. So ist es verständlich, dass IL-13 in Wildtypen nach IT in geringer Konzentration im BALF nachweisbar ist (vgl. Abbildung 3.23 F). Allerdings ist erstaunlich, dass bei IL-10 *knock out* Mäusen mit weiterhin auftretender eosinophiler Inflammation der Lunge trotz IT IL-13 durch die IT in der BALF partiell herunterreguliert wird. Dies ist im Einklang mit Daten einer Studie, die zeigt, dass eine Inhibierung von IL-4 und IL-13 während einer IT keinen wesentlichen Einfluss auf die resultierende allergische Atemwegsentzündung hat [115]. Daher scheint das in der BALF gemessene IL-13 nicht mit der Inflammation in der Lunge zu korrelieren. Eine Bestätigung liefert eine Studie mit sensibilisierten IL-13 *knock out* Mäusen, die nach Provokation weiterhin eine Eosinophilie in der Lunge aufweisen. Stattdessen scheint IL-13 von größerer Bedeutung für die AHR zu sein. Bei der Blockierung von IL-13 ist eine Hemmung der AHR, nicht aber der allergischen Atemwegsentzündung zu beobachten [340, 343].

Des Weiteren scheint die ausgeprägte Reduktion des IL-13 in Wildtypen nach der IT (vgl. Abbildung 3.23 F) partiell durch T Zell-unabhängiges IL-10 bedingt zu sein. Im Vergleich zu den Wildtypen wird in den IL-10 *knock out* Mäusen nur eine partielle Reduktion des IL-13 in der BALF nach IT beobachtet (vgl. Abbildung 3.25 F). Neben T Zell-unabhängigem IL-10 scheinen noch weitere Faktoren an der Regulation des IL-13 während der IT beteiligt zu sein. Diese Hypothese wird auch durch die Ergebnisse während der Neutralisierung des T Zell-unabhängigen IL-10 in den Mäusen mit IL-10-defizienten T Zellen gestützt. Hierbei wird die Hemmung des IL-13 in der BALF nur sehr marginal aufgehoben, was die Wirkung von T Zell-abhängigem und unabhängigen IL-10 auf die IL-13 Regulation während der IT ausschließt (vgl. Abbildung 3.29 F). Stattdessen könnten Chemokine an der Regulation des IL-13 beteiligt sein, da ihnen ein Einfluss auf IL-13 im Zusammenhang mit allergischen Entzündungsreaktionen zugeschrieben wird [361].

#### 4.4. NKT Zellen in der Immuntherapie

NKT Zellen zeichnen sich durch ihre schnelle Zytokinsekretion nach Aktivierung aus, wodurch sie die adaptive Immunantwort beeinflussen und regulieren können. Allerdings sind die Mechanismen der Aktivierung *in vivo* und die daraus resultierenden Effekte für die Immunantwort nicht vollständig geklärt. In dieser Arbeit zeigte sich, dass das Fehlen von NKT Zellen in dem hier angewendeten Sensibilisierungsmodell keinen Einfluss auf die Atemwegsentzündung hat, da sich die analysierten Parameter nicht vom Wildtyp unterscheiden (vgl. Abbildung 3.23 und Abbildung 3.24 mit Abbildung 3.31 und Abbildung 3.32). Auch die Daten von Smiley et al. zeigen, dass CD1-defiziente Mäuse nach Immunisierung vergleichbare Mengen an IgE wie die Kontrolltiere produzieren können. Somit besitzen sie weiterhin das Potential, eine Th2-Immunantwort zu induzieren, so dass NKT Zellen keine essentielle Rolle für die Induktion einer Th2-Antwort spielen [292]. Daten von Korsgren et al. unterstützen die Aussage, dass NKT Zellen auf die Entstehung einer Atemwegsentzündung keinen Einfluss haben und demonstrieren dies anhand der gemessenen Eosinophilie und des induzierten allergenspezifischen IgE in CD1d-defizienten Mäusen [184]. Kontrovers zu diesen Daten beschreibt eine Studie von Bilenki et al., dass CD1d k.o. Mäusen eine verminderte Infiltration mit Eosinophilen in der Lunge sowie geringere Konzentrationen von IL-4 und Eotaxin nach Sensibilisierung und Provokation mit Beifuß aufweisen [39]. Auch Lisbonne et al. und Akbari et al. unterstützen diese Daten anhand von Analysen in NKT Zell-defizienten Mäusen, in denen nach Sensibilisierung und Provokation mit OVA eine verringerte Anzahl an Eosinophilen in der BALF sowie weniger IL-4, IL-5 und OVA-spezifisches IgE im Vergleich zum Wildtyp detektiert wurden [12, 201].

Bei der Analyse des Einflusses von NKT Zellen auf die Wirksamkeit der IT wurden vergleichbare Ergebnisse wie mit Wildtyp Tieren erzielt, so dass NKT Zellen in diesem Modell nicht essentiell zum Erfolg der IT beitragen (vgl. Abbildung 3.31 Abbildung 3.32). Die beschriebene Induktion von regulatorischen T Zellen durch NKT Zell-abhängiges IL-10 [296] kann keine wesentliche Rolle

während der IT spielen, da in dieser Arbeit gezeigt wurde, dass IL-10 aus T Zellen für die Wirksamkeit der IT von untergeordneter Bedeutung ist (vgl. Kapitel 4.3). Auch das mit NKT Zell vermittelter Induktion von peripherer Toleranz in Verbindung gebrachte Chemokin MIP-2 (Makrophagen inflammatorisches Protein-2), durch das die NKT Zellen zur Milz rekrutiert werden, wo sie regulatorische T Zellen induzieren, trägt nicht essentiell zum Erfolg der IT bei [93]. Möglicherweise spielen NKT Zellen nur bei diesem murinen Modell der Hyposensibilisierung gegen das Modellantigen OVA eine untergeordnete Rolle. Bei der IT im humanen System könnten die applizierten Allergenextrakte (Glyco-) oder (Phospho-) Lipide enthalten, die NKT Zellen aktivieren und darüber die Toleranzinduktion beeinflussen [5]. So zeigte sich auch, dass eine einmalige Gabe des Modellliganden  $\alpha$ -GalCer zur Aktivierung von NKT Zellen die Symptomatik der Atemwegsinfektion inhibieren konnte [127, 217, 234]. Weitere Studien zur IT mit pflanzlichen Allergenextrakten könnten hier Aufschluss über eine mögliche Rolle von NKT Zellen bei der peripheren Toleranzinduktion in der IT geben.

#### 4.5. Fazit

Weltweit steigt die Zahl der allergischen Erkrankungen insbesondere in der westlichen Welt drastisch an. Die Anfälligkeit der Menschen für Allergien und Asthma nimmt zu, so dass die Entwicklung von kausalen Therapien notwendig ist. Hierfür sind genaue Kenntnisse der Mechanismen zur Entstehung von Allergien und der damit verbundenen Toleranzbrechung erforderlich, welche bisher nur unvollständig geklärt sind. Teile dieser Arbeit haben verdeutlicht, dass neben DC auch NKT Zellen durch Substanzen des wässrigen Pollenextrakts eines weit verbreiteten Allergens moduliert werden. Das wirft die Frage auf, ob bei der Toleranzbrechung während der Entstehung von Allergien auch Organe wie die Leber, die einen hohen Prozentsatz an NKT Zellen aufweisen, eine Rolle spielen könnten. Die Etablierung von geeigneten *in vivo* Modellen scheint hierfür unerlässlich zu sein, um auf dem Gebiet weitere Erkenntnisse zu erzielen.

Die Daten zur IT verdeutlichen, dass der Wirkmechanismus sehr komplexer Natur ist und vielschichtige Zellpopulationen und Botenstoffe beteiligt sind. Wenn weiterführende Studien die ursprüngliche Quelle des für die Wirksamkeit so wichtigen IL-10 determiniert haben, lässt sich möglicherweise darüber eine neue Therapieform erarbeiten, in der gezielt IL-10 in der verantwortlichen Zellpopulation induziert wird. Zur Etablierung und Überprüfung der Wirksamkeit einer neuen Therapie werden *in vivo* Modelle von großem Nutzen sein.

Weiterhin demonstrieren die Daten, dass viele Randbedingungen Einfluss auf die beobachteten Ergebnisse nehmen, so dass die Wahl der Reagenzien und der Versuchsbedingungen für ein Modellsystem sorgfältig verglichen und geprüft werden müssen. Dies ist erforderlich, um die überaus komplexe (Dys-)Funktion des Immunsystems aufklären zu können. Bevor wirksame Therapien entwickelt werden können, ist es von großem Nutzen, die Mechanismen zur Entstehung der Erkrankung sehr genau zu kennen.

## 5. Zusammenfassung

Eine Zunahme der Prävalenz von Allergien ist in der westlichen Welt deutlich zu erkennen. Um nicht nur die Symptome behandeln, sondern die Allergien auch frühzeitig verhindern zu können, ist es essentiell, die Mechanismen der Entstehung vollständig zu verstehen und aufzuklären. Eine große Rolle bei der Allergieentstehung scheinen Dendritische Zellen (DC) zu spielen, die anhand ihrer Differenzierung und Funktionalität die Polarisierung der Immunantwort beeinflussen können. So konnte bereits im humanen System gezeigt werden, dass humane DC durch wässrige Pollenextrakte und den darin enthaltenen Pollen assoziierten Lipid Mediatoren (PALMs), phänotypisch und funktionell reifen, wodurch eine veränderte Zytokinproduktion auftritt, die sich T Zell-vermittelt in einer Polarisierung der Immunantwort in Richtung Th2 bemerkbar macht.

Im ersten Teil dieser Arbeit wurden verschiedene DC-Subpopulationen, plasmazytoide DC (pDC) und konventionellen DC (cDC), aus murinem Knochenmark generiert und der Einfluss von wässrigem Birkenpollenextrakt (*Bet.*-APE) und einiger darin enthaltenen PALMs auf diese Zellpopulationen analysiert.

Die pDC zeigten keine phänotypischen Veränderungen durch *Bet.*-APE oder Phytoprostan E1 (PPE<sub>1</sub>). Auch das von pDC als Hauptproduzent sekretierte IFN- $\alpha$  blieb unverändert nach *Bet.*-APE Behandlung. Die cDC wurden phänotypisch durch *Bet.*-APE oder PPE<sub>1</sub> ebenfalls nicht verändert, jedoch trat eine funktionelle Beeinflussung in Form einer veränderten Zytokinsekretion auf. Die Auswirkung dieser funktionellen Veränderung wurde zunächst in einer allogenen DC-T Zell Kokultur untersucht. Nachdem in diesem Modell keine indirekten Effekte der funktionell veränderten cDC auf die T Zellen zu beobachten war, wurden Proliferation und Zytokinsekretion in einem antigenspezifischen Modell analysiert. Die Ovalbumin-spezifischen T Zellen wurden mit Ovalbumin beladenen cDC kokultiviert, die zuvor mit *Bet.*-APE behandelt wurden. Auch hier ließ sich kein bedeutender Einfluss der funktionell veränderten cDC auf die Polarisierung der T Zellen und somit auf die resultierende Immunantwort beobachten.

Eine Subpopulation der T Zellen stellen die CD1d limitierten T Zell-Rezeptor invarianten NKT Zellen dar. Diese zeichnen sich nach Aktivierung durch eine rasche Sekretion von großen Mengen an immunmodulatorischen Zytokinen aus, wodurch die innate und adaptive Immunantwort zügig induziert wird. NKT Zellen wird eine wichtige Rolle bei der Entstehung von allergischem Asthma zugeschrieben. Es zeigte sich, dass die durch *Bet.*-APE funktionell veränderten cDC nach Beladung mit  $\alpha$ -GalCer, dem Modellaktivator für NKT Zellen, und anschließender Kokultur mit dem NKT Zell Hybridom DN32.D3 eine unspezifische Herunterregulation der vom Hybridom sekretierten Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-4 und IL-13 bewirkte. Die Hypothese, dass *Bet.*-APE eine Modulation der Expression von Lipid-präsentierenden CD1d-Molekülen auf den cDC verursachte, konnte nicht bestätigt werden. Allerdings ist es denkbar, dass Komponenten von *Bet.*-APE die CD1d-abhängige Präsentation von  $\alpha$ -GalCer

durch Interaktion mit den CD1d-Molekülen beeinflusst und darüber die Hemmung der Zytokininduktion bedingt. Bei Behandlung des Hybridoms mit *Bet.*-APE und anschließender Kokultur mit  $\alpha$ -GalCer beladenen cDC wurde eine netto Th2-Polarisierung der NKT Zellen beobachtet. Die IFN- $\gamma$  Sekretion war mit steigenden Konzentrationen von *Bet.*-APE deutlich verringert, wohingegen die Th2-Zytokine IL-4 und IL-13 unverändert hoch sekretiert wurden.

Zusammenfassend für den ersten Teil der Arbeit lässt sich sagen, dass Substanzen des wässrigen Birkenpollenextrakts nicht die Funktion der pDC, jedoch der cDC verändern. Diese funktionellen Veränderungen der cDC haben unter den hier analysierten Bedingungen nur geringen Einfluss sowohl auf die antigenunspezifische als auch antigenspezifische T Zell-Polarisierung. Ein ungerichteter, nicht polarisierender Effekt konnte durch die modulierten cDC auf NKT Zellen gezeigt werden. Interessanterweise übte *Bet.*-APE einen netto Th2-polarisierenden Effekt auf die NKT Zellen aus. Daraus lässt sich folgern, dass NKT Zellen möglicherweise einen Beitrag zur Toleranzbrechung leisten und weitere Analysen *in vivo* nötig sind, um dies zu belegen.

Die bisher einzige wirksame lang anhaltende Therapie für Typ 1 Allergien ist die antigenspezifische Immuntherapie (IT). Die Wirkmechanismen sind allerdings noch nicht vollständig aufgeklärt. Humane Studien deuten an, dass eine regulatorische Immunantwort induziert wird, die die Entstehung der allergischen Entzündung hemmt. Hierbei scheint die IL-10 Produktion von allergenspezifischen T Zellen eine wichtige Rolle zu spielen. Es konnte bereits gezeigt werden, dass Antikörper gegen den IL-10R *in vivo* die erfolgreiche IT verhindern. Da jedoch IL-10 von vielen Zellpopulationen sekretiert wird, fehlte noch immer der formelle Beweis, dass aus T Zellen stammendes IL-10 der Schlüssel zur erfolgreichen IT darstellt. Um dies zu untersuchen, wurde zunächst ein *in vivo* Hyposensibilisierungsmodell für C57BL/6-Mäuse etabliert. Mit Hilfe von IL-10 *knock out* Mäusen und Mäusen mit einer Cre/loxP vermittelten konditionellen Inaktivierung der IL-10 Produktion in T Zellen wurde der Einfluss des IL-10 auf eine erfolgreiche IT analysiert. Es wurde bestätigt, dass IL-10 essentiell für eine wirksame Therapie ist. Allerdings zeigte sich entgegen der bisherigen Hypothese, dass auch in Abwesenheit von T Zell-produziertem IL-10 eine erfolgreiche IT gemessen an einer verminderten Inflammation der Lunge möglich ist. Durch eine Behandlung mit einem Antikörper gegen den IL-10 Rezeptor in diesen Mäusen wurde die Wirksamkeit der IT teilweise aufgehoben. Daraus lässt sich ableiten, dass auch andere IL-10 produzierende Zellpopulationen als T Zellen sowie weitere Botenstoffe einen Beitrag zur erfolgreichen IT leisten. NKT Zellen spielen bei der Wirksamkeit der IT in diesem Modell keine Rolle.

## 6. Summary

In the Western hemisphere, an increased prevalence of allergies is in evidence. In order to not only treat the symptoms, but to prevent allergies at an early stage, it is essential to fully understand the mechanisms of their development. Dendritic cells (DC) appear to play a major role in allergy development, as their differentiation and functionality can influence the polarization of the immune response. It has already been shown in the human system that human DC mature phenotypically and functionally due to aqueous pollen extracts and the pollen associated lipid mediators (PALMs) included therein. This causes a modified production of cytokines which becomes noticeable due to a T cell mediated Th2 polarization of the immune response.

In the first part of this work, DC subpopulations plasmacytoid DC (pDC) and conventional DC (cDC) were generated from murine bone marrow, and the influence of aqueous birch pollen extract (*Bet.*-APE) as well as some of the included PALMs on these cell populations were analyzed.

The pDC did not show any phenotypical modifications due to *Bet.*-APE or Phytoprostan E1 (PPE<sub>1</sub>). Furthermore, the IFN- $\alpha$  secreted by pDC, being its main source, remained unchanged after treatment with *Bet.*-APE. The cDC were also not phenotypically modified by *Bet.*-APE or PPE<sub>1</sub>. However, a functional impact in the form of a modified secretion of cytokines occurred. Firstly, the effects of this functional modification were examined in an allogenic DC-T cell co-culture. In this model, no indirect effects of the functionally modified cDC on the T cells could be observed, so the proliferation and cytokine production were analyzed in an antigen specific model. The Ovalbumin specific T cells were co-cultured with Ovalbumin-loaded cDC, which had been treated with *Bet.*-APE beforehand. This also did not show any significant effect of the functionally modified cDC on the polarization of the T cells and consequently on the resulting immune response.

CD1d limited T cell receptor invariant NKT cells constitute a subpopulation of T cells. They are characterized by a rapid secretion of large amounts of immunomodulatory cytokines after activation, whereby the innate and adaptive immune response is rapidly induced. NKT cells are credited with an important role during development of allergic asthma. It was shown that the functionally modified cDC, after being loaded with  $\alpha$ -GalCer (the model activator of NKT cells) and co-cultured with the NKT cell hybridoma DN32.D3, caused an unspecific down modulation of the cytokines IFN- $\gamma$ , IL-4 and IL-13 secreted by the hybridoma. The hypothesis of *Bet.*-APE causing a modulation of the expression of lipid-presenting CD1d molecules on the cDC could not be confirmed. However, it is conceivable that components of *Bet.*-APE influence the CD1d-dependent presentation of  $\alpha$ -GalCer through interaction with the CD1d molecules and furthermore account for the inhibition of cytokine induction. After treating the hybridoma with *Bet.*-APE followed by a co-culture with  $\alpha$ -GalCer-loaded cDC, a net Th2 polarization of the NKT cells was observed. The secretion of IFN- $\gamma$  was significantly reduced with increasing

concentrations of *Bet.*-APE, whereas the secretion of Th2 cytokines IL-4 and IL-13 remained unchanged.

Summarizing the first part of this work, it can be said that substances of the aqueous birch pollen extract do not modify the function of pDC, but that of cDC. Under the here analyzed conditions, these functional modifications of the cDC only have a minor influence on the antigene specific as well as unspecific T cell polarization. A nondirectional, nonpolarizing effect of the modulated cDC on NKT cells could be shown. Interestingly, *Bet.*-APE exerted a net Th2 polarizing effect on NKT cells. Hence, it can be concluded that NKT cells may contribute to the breaking of tolerance and that further *in vivo* analyses are necessary to prove this.

So far, the only effective and long-lasting therapy for type 1 allergies is the antigene specific immunotherapy. However, the effecting mechanisms are not yet fully elucidated. Human studies indicate that a regulatory immune response is induced, which inhibits the allergic inflammation. The IL-10 production of allergene specific T cells appears to play an important role in this. It could already be shown that IL-10R antibodies prevent the successful immunotherapy *in vivo*. Since IL-10 is produced by a large number of cell populations, the formal proof of T cell produced IL-10 being the key to a successful immunotherapy has yet to be provided. In order to examine this, initially an *in vivo* hyposensitization model for C57BL/6 mice was established. Using IL-10 *knock out* mice and mice with a Cre/loxP mediated conditional knock out of IL-10 production in T cells, the influence of IL-10 on a successful immunotherapy was analyzed. It was confirmed that IL-10 is essential for an effective immunotherapy. However, it was shown that in opposition to the hitherto existing hypothesis, a successful immunotherapy, measured by the reduced inflammation of the lunge, is possible even in the absence of T cell produced IL-10. The effectiveness of the immunotherapy was partially reversed in these mice by a treatment with IL-10 receptor antibodies. Hence, it can be deduced that IL-10 producing cell populations other than T cells as well as other factors contribute to a successful immunotherapy. NKT cells do not influence the effectiveness of the immunotherapy in this model.

## 7. Literaturverzeichnis

1. Aalberse, R.C., R. van der Gaag, and J. van Leeuwen, *Serologic aspects of IgG4 antibodies. I. Prolonged immunization results in an IgG4-restricted response.* J Immunol, **1983**. 130(2): p. 722-6.
2. Aalberse, R.C., et al., *Allergen-specific IgG4 in atopic disease.* Allergy, **1993**. 48(8): p. 559-69.
3. Abbas, A.K., K.M. Murphy, and A. Sher, *Functional diversity of helper T lymphocytes.* Nature, **1996**. 383(6603): p. 787-93.
4. Ackerman, A.L. and P. Cresswell, *Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens.* Nat Immunol, **2004**. 5(7): p. 678-84.
5. Agea, E., et al., *Human CD1-restricted T cell recognition of lipids from pollens.* J Exp Med, **2005**. 202(2): p. 295-308.
6. Aggarwal, B.B., *Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword.* Nat Rev Immunol, **2003**. 3(9): p. 745-56.
7. Aicher, A., et al., *Characterization of human inducible costimulator ligand expression and function.* J Immunol, **2000**. 164(9): p. 4689-96.
8. Akashi, K., et al., *A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages.* Nature, **2000**. 404(6774): p. 193-7.
9. Akbari, O., R.H. DeKruyff, and D.T. Umetsu, *Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen.* Nat Immunol, **2001**. 2(8): p. 725-31.
10. Akbari, O., et al., *CD4+ invariant T-cell-receptor+ natural killer T cells in bronchial asthma.* N Engl J Med, **2006**. 354(11): p. 1117-29.
11. Akbari, O., et al., *Antigen-specific regulatory T cells develop via the ICOS-ICOS-ligand pathway and inhibit allergen-induced airway hyperreactivity.* Nat Med, **2002**. 8(9): p. 1024-32.
12. Akbari, O., et al., *Essential role of NKT cells producing IL-4 and IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity.* Nat Med, **2003**. 9(5): p. 582-8.
13. Akdis, C.A., *Future of allergen-specific immunotherapy: better understanding of the mechanisms, novel treatments, and long-term cure.* Immunol Allergy Clin North Am, **2006**. 26(2): p. xiii-xxii.
14. Akdis, C.A. and K. Blaser, *IL-10-induced anergy in peripheral T cell and reactivation by microenvironmental cytokines: two key steps in specific immunotherapy.* FASEB J, **1999**. 13(6): p. 603-9.
15. Akdis, C.A., et al., *Role of interleukin 10 in specific immunotherapy.* J Clin Invest, **1998**. 102(1): p. 98-106.
16. Akdis, M., et al., *Immune responses in healthy and allergic individuals are characterized by a fine balance between allergen-specific T regulatory 1 and T helper 2 cells.* J Exp Med, **2004**. 199(11): p. 1567-75.



17. Akira, S., S. Uematsu, and O. Takeuchi, *Pathogen recognition and innate immunity*. Cell, **2006**. 124(4): p. 783-801.
18. Albert, M.L., B. Sauter, and N. Bhardwaj, *Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs*. Nature, **1998**. 392(6671): p. 86-9.
19. Allam, J.P., et al., *Characterization of dendritic cells from human oral mucosa: a new Langerhans' cell type with high constitutive FcεpsilonRI expression*. J Allergy Clin Immunol, **2003**. 112(1): p. 141-8.
20. Allan, S.E., et al., *Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production*. Int Immunol, **2007**. 19(4): p. 345-54.
21. Anderson, C.F., et al., *CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis*. J Exp Med, **2007**. 204(2): p. 285-97.
22. Angenieux, C., et al., *Characterization of CD1e, a third type of CD1 molecule expressed in dendritic cells*. J Biol Chem, **2000**. 275(48): p. 37757-64.
23. Asselin-Paturel, C., et al., *Mouse type I IFN-producing cells are immature APCs with plasmacytoid morphology*. Nat Immunol, **2001**. 2(12): p. 1144-50.
24. Aste-Amezaga, M., et al., *Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10*. J Immunol, **1998**. 160(12): p. 5936-44.
25. Bacchetta, R., et al., *Growth and expansion of human T regulatory type 1 cells are independent from TCR activation but require exogenous cytokines*. Eur J Immunol, **2002**. 32(8): p. 2237-45.
26. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol, **2000**. 18: p. 767-811.
27. Barral, D.C. and M.B. Brenner, *CD1 antigen presentation: how it works*. Nat Rev Immunol, **2007**. 7(12): p. 929-41.
28. Behrendt, H. and W.M. Becker, *Localization, release and bioavailability of pollen allergens: the influence of environmental factors*. Curr Opin Immunol, **2001**. 13(6): p. 709-15.
29. Behrendt, H., et al., *Air pollution and allergy: experimental studies on modulation of allergen release from pollen by air pollutants*. Int Arch Allergy Immunol, **1997**. 113(1-3): p. 69-74.
30. Behrendt, H., et al., *Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization*. Int Arch Allergy Immunol, **2001**. 124(1-3): p. 121-5.
31. Behrendt, H., et al., *Timothy grass (Phleum pratense L.) pollen as allergen carriers and initiators of an allergic response*. Int Arch Allergy Immunol, **1999**. 118(2-4): p. 414-8.
32. Bellinghausen, I., et al., *Comparison of allergen-stimulated dendritic cells from atopic and nonatopic donors dissecting their effect on autologous naive and memory T helper cells of such donors*. J Allergy Clin Immunol, **2000**. 105(5): p. 988-96.
33. Bellinghausen, I., et al., *Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects*. Eur J Immunol, **1997**. 27(5): p. 1131-9.

34. Bendelac, A., et al., *CD1 recognition by mouse NK1+ T lymphocytes*. Science, **1995**. 268(5212): p. 863-5.
35. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, **2006**. 441(7090): p. 235-8.
36. Bevan, M.J., *Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay*. J Exp Med, **1976**. 143(5): p. 1283-8.
37. Bevan, M.J., *Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming*. J Immunol, **1976**. 117(6): p. 2233-8.
38. Biedermann, T., et al., *IL-4 instructs TH1 responses and resistance to Leishmania major in susceptible BALB/c mice*. Nat Immunol, **2001**. 2(11): p. 1054-60.
39. Bilenki, L., et al., *Natural killer T cells contribute to airway eosinophilic inflammation induced by ragweed through enhanced IL-4 and eotaxin production*. Eur J Immunol, **2004**. 34(2): p. 345-54.
40. Boldogh, I., et al., *ROS generated by pollen NADPH oxidase provide a signal that augments antigen-induced allergic airway inflammation*. J Clin Invest, **2005**. 115(8): p. 2169-79.
41. Bonifaz, L., et al., *Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8+ T cell tolerance*. J Exp Med, **2002**. 196(12): p. 1627-38.
42. Boonstra, A., et al., *Flexibility of mouse classical and plasmacytoid-derived dendritic cells in directing T helper type 1 and 2 cell development: dependency on antigen dose and differential toll-like receptor ligation*. J Exp Med, **2003**. 197(1): p. 101-9.
43. Bopp, T., et al., *Cyclic adenosine monophosphate is a key component of regulatory T cell-mediated suppression*. J Exp Med, **2007**. 204(6): p. 1303-10.
44. Bowie, A. and L.A. O'Neill, *The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products*. J Leukoc Biol, **2000**. 67(4): p. 508-14.
45. Braun, D., R.S. Longman, and M.L. Albert, *A two-step induction of indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) activity during dendritic-cell maturation*. Blood, **2005**. 106(7): p. 2375-81.
46. Brewer, J.P., A.B. Kisselgof, and T.R. Martin, *Genetic variability in pulmonary physiological, cellular, and antibody responses to antigen in mice*. Am J Respir Crit Care Med, **1999**. 160(4): p. 1150-6.
47. Briere, F., et al., *Human interleukin 10 induces naive surface immunoglobulin D+ (sIgD+) B cells to secrete IgG1 and IgG3*. J Exp Med, **1994**. 179(2): p. 757-62.
48. Brinster, C. and E.M. Shevach, *Bone marrow-derived dendritic cells reverse the anergic state of CD4+CD25+ T cells without reversing their suppressive function*. J Immunol, **2005**. 175(11): p. 7332-40.
49. Broide, D., et al., *Immunostimulatory DNA sequences inhibit IL-5, eosinophilic inflammation, and airway hyperresponsiveness in mice*. J Immunol, **1998**. 161(12): p. 7054-62.

50. Brustle, A., et al., *The development of inflammatory T(H)-17 cells requires interferon-regulatory factor 4*. Nat Immunol, **2007**. 8(9): p. 958-66.
51. Canonica, G.W. and G. Passalacqua, *Noninjection routes for immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, **2003**. 111(3): p. 437-48; quiz 449.
52. Cantu, C., 3rd, et al., *The paradox of immune molecular recognition of alpha-galactosylceramide: low affinity, low specificity for CD1d, high affinity for alpha beta TCRs*. J Immunol, **2003**. 170(9): p. 4673-82.
53. Cardell, S., et al., *CD1-restricted CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice*. J Exp Med, **1995**. 182(4): p. 993-1004.
54. Caux, C., et al., *Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking*. J Exp Med, **1994**. 180(4): p. 1263-72.
55. Chen, W., et al., *Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3*. J Exp Med, **2003**. 198(12): p. 1875-86.
56. Chen, Y., et al., *Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis*. Science, **1994**. 265(5176): p. 1237-40.
57. Chicha, L., D. Jarrossay, and M.G. Manz, *Clonal type I interferon-producing and dendritic cell precursors are contained in both human lymphoid and myeloid progenitor populations*. J Exp Med, **2004**. 200(11): p. 1519-24.
58. Chung, K.F., et al., *Induction of eotaxin expression and release from human airway smooth muscle cells by IL-1beta and TNFalpha: effects of IL-10 and corticosteroids*. Br J Pharmacol, **1999**. 127(5): p. 1145-50.
59. Coffman, R.L., et al., *Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice*. Science, **1989**. 245(4915): p. 308-10.
60. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, **2007**. 450(7169): p. 566-9.
61. Colonna, M., G. Trinchieri, and Y.J. Liu, *Plasmacytoid dendritic cells in immunity*. Nat Immunol, **2004**. 5(12): p. 1219-26.
62. Constant, S.L. and K. Bottomly, *Induction of Th1 and Th2 CD4+ T cell responses: the alternative approaches*. Annu Rev Immunol, **1997**. 15: p. 297-322.
63. Creagh, E.M. and L.A. O'Neill, *TLRs, NLRs and RLRs: a trinity of pathogen sensors that co-operate in innate immunity*. Trends Immunol, **2006**. 27(8): p. 352-7.
64. Croft, M., *Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity?* Nat Rev Immunol, **2003**. 3(8): p. 609-20.
65. Cunningham, A.J. and K.J. Lafferty, *A simple, conservative explanation of the H-2 restriction of interactions between lymphocytes*, in *Scand J Immunol*. **1977**. p. 1-6.
66. D'Amico, A. and L. Wu, *The early progenitors of mouse dendritic cells and plasmacytoid predendritic cells are within the bone marrow hemopoietic precursors expressing Flt3*. J Exp Med, **2003**. 198(2): p. 293-303.
67. de Heer, H.J., et al., *Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen*. J Exp Med, **2004**. 200(1): p. 89-98.

68. de la Salle, H., et al., *Assistance of microbial glycolipid antigen processing by CD1e*. Science, **2005**. 310(5752): p. 1321-4.
69. De Libero, G. and L. Mori, *How T cells get grip on lipid antigens*. Curr Opin Immunol, **2008**. 20(1): p. 96-104.
70. De Lorenzo, B.H., et al., *Tolerogenic property of B-1b cells in a model of allergic reaction*. Immunol Lett, **2007**. 114(2): p. 110-8.
71. Deaglio, S., et al., *Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression*. J Exp Med, **2007**. 204(6): p. 1257-65.
72. Dearman, R.J., et al., *Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells*. Immunology, **2008**.
73. Delbridge, L.M. and M.X. O'Riordan, *Innate recognition of intracellular bacteria*. Curr Opin Immunol, **2007**. 19(1): p. 10-6.
74. Dellabona, P., et al., *An invariant V alpha 24-J alpha Q/V beta 11 T cell receptor is expressed in all individuals by clonally expanded CD4-8- T cells*. J Exp Med, **1994**. 180(3): p. 1171-6.
75. Demay, R.M., *The Art & Science of Cytopathology*. 1st Edition ed. **1996**: American Society Clinical Pathology.
76. Dharajiya, N., et al., *Inhibiting pollen reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase-induced signal by intrapulmonary administration of antioxidants blocks allergic airway inflammation*. J Allergy Clin Immunol, **2007**. 119(3): p. 646-53.
77. Diao, J., et al., *In situ replication of immediate dendritic cell (DC) precursors contributes to conventional DC homeostasis in lymphoid tissue*. J Immunol, **2006**. 176(12): p. 7196-206.
78. Diao, J., et al., *Characterization of distinct conventional and plasmacytoid dendritic cell-committed precursors in murine bone marrow*. J Immunol, **2004**. 173(3): p. 1826-33.
79. Djurup, R. and H.J. Malling, *High IgG4 antibody level is associated with failure of immunotherapy with inhalant allergens*. Clin Allergy, **1987**. 17(5): p. 459-68.
80. Dong, H., et al., *B7-H1, a third member of the B7 family, co-stimulates T-cell proliferation and interleukin-10 secretion*. Nat Med, **1999**. 5(12): p. 1365-9.
81. Durham, S.R., et al., *Grass pollen immunotherapy decreases the number of mast cells in the skin*. Clin Exp Allergy, **1999**. 29(11): p. 1490-6.
82. Durham, S.R., et al., *Long-term clinical efficacy of grass-pollen immunotherapy*. N Engl J Med, **1999**. 341(7): p. 468-75.
83. Durham, S.R., et al., *Grass pollen immunotherapy inhibits allergen-induced infiltration of CD4+ T lymphocytes and eosinophils in the nasal mucosa and increases the number of cells expressing messenger RNA for interferon-gamma*. J Allergy Clin Immunol, **1996**. 97(6): p. 1356-65.
84. East, L. and C.M. Isacke, *The mannose receptor family*. Biochim Biophys Acta, **2002**. 1572(2-3): p. 364-86.
85. Ebner, C., et al., *Immunological changes during specific immunotherapy of grass pollen allergy: reduced lymphoproliferative responses to allergen and shift from TH2 to TH1 in T-cell clones specific for Phl p 1, a major grass pollen allergen*. Clin Exp Allergy, **1997**. 27(9): p. 1007-15.

86. Eder, W., M.J. Ege, and E. von Mutius, *The asthma epidemic*. N Engl J Med, **2006**. 355(21): p. 2226-35.
87. Edwards, A.D., et al., *Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines*. Eur J Immunol, **2003**. 33(4): p. 827-33.
88. Egawa, T., et al., *Genetic evidence supporting selection of the Valpha14i NKT cell lineage from double-positive thymocyte precursors*. Immunity, **2005**. 22(6): p. 705-16.
89. Eisenbarth, S.C., et al., *Lipopolysaccharide-enhanced, toll-like receptor 4-dependent T helper cell type 2 responses to inhaled antigen*. J Exp Med, **2002**. 196(12): p. 1645-51.
90. Fallarino, F., et al., *Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells*. Nat Immunol, **2003**. 4(12): p. 1206-12.
91. Faquim-Mauro, E.L., et al., *Cutting edge: mouse IgG1 antibodies comprise two functionally distinct types that are differentially regulated by IL-4 and IL-12*. J Immunol, **1999**. 163(7): p. 3572-6.
92. Faquim-Mauro, E.L. and M.S. Macedo, *Induction of IL-4-dependent, anaphylactic-type and IL-4-independent, non-anaphylactic-type IgG1 antibodies is modulated by adjuvants*. Int Immunol, **2000**. 12(12): p. 1733-40.
93. Faunce, D.E., K.H. Sonoda, and J. Stein-Streilein, *MIP-2 recruits NKT cells to the spleen during tolerance induction*. J Immunol, **2001**. 166(1): p. 313-21.
94. Figdor, C.G., Y. van Kooyk, and G.J. Adema, *C-type lectin receptors on dendritic cells and Langerhans cells*. Nat Rev Immunol, **2002**. 2(2): p. 77-84.
95. Flacher, V., et al., *Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria*. J Immunol, **2006**. 177(11): p. 7959-67.
96. Flood-Page, P., et al., *Anti-IL-5 treatment reduces deposition of ECM proteins in the bronchial subepithelial basement membrane of mild atopic asthmatics*. J Clin Invest, **2003**. 112(7): p. 1029-36.
97. Francis, J.N., et al., *Grass pollen immunotherapy: IL-10 induction and suppression of late responses precedes IgG4 inhibitory antibody activity*. J Allergy Clin Immunol, **2008**. 121(5): p. 1120-1125 e2.
98. Francis, J.N., S.J. Till, and S.R. Durham, *Induction of IL-10+CD4+CD25+ T cells by grass pollen immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, **2003**. 111(6): p. 1255-61.
99. Freeman, G.J., et al., *Engagement of the PD-1 immunoinhibitory receptor by a novel B7 family member leads to negative regulation of lymphocyte activation*. J Exp Med, **2000**. 192(7): p. 1027-34.
100. Fu, C.L., et al., *Induction of IL-10 producing CD4+ T cells with regulatory activities by stimulation with IL-10 gene-modified bone marrow derived dendritic cells*. Clin Exp Immunol, **2008**. 153(2): p. 258-68.
101. Fujii, S., et al., *Activation of natural killer T cells by alpha-galactosylceramide rapidly induces the full maturation of dendritic cells in vivo and thereby acts as an adjuvant for combined CD4 and CD8 T cell immunity to a coadministered protein*. J Exp Med, **2003**. 198(2): p. 267-79.
102. Funk, C.D., *Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology*. Science, **2001**. 294(5548): p. 1871-5.

103. Gafvelin, G., et al., *Cytokine and antibody responses in birch-pollen-allergic patients treated with genetically modified derivatives of the major birch pollen allergen Bet v 1*. Int Arch Allergy Immunol, **2005**. 138(1): p. 59-66.
104. Galli, S.J., M. Grimbaldston, and M. Tsai, *Immunomodulatory mast cells: negative, as well as positive, regulators of immunity*. Nat Rev Immunol, **2008**. 8(6): p. 478-86.
105. Galli, S.J., S. Nakae, and M. Tsai, *Mast cells in the development of adaptive immune responses*. Nat Immunol, **2005**. 6(2): p. 135-42.
106. Gallucci, S. and P. Matzinger, *Danger signals: SOS to the immune system*. Curr Opin Immunol, **2001**. 13(1): p. 114-9.
107. Gapin, L., et al., *NKT cells derive from double-positive thymocytes that are positively selected by CD1d*. Nat Immunol, **2001**. 2(10): p. 971-8.
108. Garin, M.I., et al., *Galectin-1: a key effector of regulation mediated by CD4+CD25+ T cells*. Blood, **2007**. 109(5): p. 2058-65.
109. Gerosa, F., et al., *Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells*. J Exp Med, **2002**. 195(3): p. 327-33.
110. Gilles, S., et al., *Pollen-derived E1-phytoprostanes signal via PPAR-gamma and NF-kappaB-dependent mechanisms*. J Immunol, **2009**. 182(11): p. 6653-8.
111. Gilliet, M. and Y.J. Liu, *Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells*. J Exp Med, **2002**. 195(6): p. 695-704.
112. Ginhoux, F., et al., *Langerhans cells arise from monocytes in vivo*. Nat Immunol, **2006**. 7(3): p. 265-73.
113. Godfrey, D.I. and S.P. Berzins, *Control points in NKT-cell development*. Nat Rev Immunol, **2007**. 7(7): p. 505-18.
114. Godfrey, D.I., et al., *NKT cells: what's in a name?* Nat Rev Immunol, **2004**. 4(3): p. 231-7.
115. Gogishvili, T., et al., *Inhibition of IL-4/IL-13 does not enhance the efficacy of allergen immunotherapy in murine allergic airway inflammation*. Int Arch Allergy Immunol, **2007**. 142(2): p. 165-74.
116. Gondek, D.C., et al., *Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism*. J Immunol, **2005**. 174(4): p. 1783-6.
117. Granucci, F., et al., *Inducible IL-2 production by dendritic cells revealed by global gene expression analysis*. Nat Immunol, **2001**. 2(9): p. 882-8.
118. Greenwald, R.J., G.J. Freeman, and A.H. Sharpe, *The B7 family revisited*. Annu Rev Immunol, **2005**. 23: p. 515-48.
119. Grimbaldston, M.A., et al., *Mast cell-derived interleukin 10 limits skin pathology in contact dermatitis and chronic irradiation with ultraviolet B*. Nat Immunol, **2007**. 8(10): p. 1095-104.
120. Grossman, W.J., et al., *Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells*. Blood, **2004**. 104(9): p. 2840-8.
121. Grouard, G., et al., *The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand*. J Exp Med, **1997**. 185(6): p. 1101-11.

122. Groux, H., et al., *A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis*. Nature, **1997**. 389(6652): p. 737-42.
123. Gualde, N. and H. Harizi, *Prostanoids and their receptors that modulate dendritic cell-mediated immunity*. Immunol Cell Biol, **2004**. 82(4): p. 353-60.
124. Guenova, E., et al., *IL-4-mediated fine tuning of IL-12p70 production by human DC*. Eur J Immunol, **2008**.
125. Guermonprez, P., et al., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annu Rev Immunol, **2002**. 20: p. 621-67.
126. Gutermuth, J., et al., *Immunomodulatory effects of aqueous birch pollen extracts and phytoprostanoids on primary immune responses in vivo*. J Allergy Clin Immunol, **2007**. 120(2): p. 293-9.
127. Hachem, P., et al., *Alpha-galactosylceramide-induced iNKT cells suppress experimental allergic asthma in sensitized mice: role of IFN-gamma*. Eur J Immunol, **2005**. 35(10): p. 2793-802.
128. Hacker, H., et al., *Specificity in Toll-like receptor signalling through distinct effector functions of TRAF3 and TRAF6*. Nature, **2006**. 439(7073): p. 204-7.
129. Hagendorens, M.M., et al., *Differences in circulating dendritic cell subtypes in cord blood and peripheral blood of healthy and allergic children*. Clin Exp Allergy, **2003**. 33(5): p. 633-9.
130. Hahn, B.H., et al., *Tolerogenic treatment of lupus mice with consensus peptide induces Foxp3-expressing, apoptosis-resistant, TGFbeta-secreting CD8+ T cell suppressors*. J Immunol, **2005**. 175(11): p. 7728-37.
131. Hammad, H., et al., *Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors*. Blood, **2001**. 98(4): p. 1135-41.
132. Harizi, H., et al., *Cyclooxygenase-2-induced prostaglandin e(2) enhances the production of endogenous IL-10, which down-regulates dendritic cell functions*. J Immunol, **2002**. 168(5): p. 2255-63.
133. Hata, A.N. and R.M. Breyer, *Pharmacology and signaling of prostaglandin receptors: multiple roles in inflammation and immune modulation*. Pharmacol Ther, **2004**. 103(2): p. 147-66.
134. Hawiger, D., et al., *Dendritic cells induce peripheral T cell unresponsiveness under steady state conditions in vivo*. J Exp Med, **2001**. 194(6): p. 769-79.
135. Hawrylowicz, C.M. and A. O'Garra, *Potential role of interleukin-10-secreting regulatory T cells in allergy and asthma*. Nat Rev Immunol, **2005**. 5(4): p. 271-83.
136. Hayakawa, Y., et al., *Differential regulation of Th1 and Th2 functions of NKT cells by CD28 and CD40 costimulatory pathways*. J Immunol, **2001**. 166(10): p. 6012-8.
137. Henry, E., et al., *Dendritic cells genetically engineered to express IL-10 induce long-lasting antigen-specific tolerance in experimental asthma*. J Immunol, **2008**. 181(10): p. 7230-42.
138. Heufler, C., et al., *Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon-gamma production by T helper 1 cells*. Eur J Immunol, **1996**. 26(3): p. 659-68.

139. Hirata, N., et al., *Selective regulation of interleukin-10 production via Janus kinase pathway in murine conventional dendritic cells*. Cell Immunol, **2009**.
140. Hochrein, H., M. O'Keeffe, and H. Wagner, *Human and mouse plasmacytoid dendritic cells*. Hum Immunol, **2002**. 63(12): p. 1103-10.
141. Holgate, S.T. and R. Polosa, *Treatment strategies for allergy and asthma*. Nat Rev Immunol, **2008**. 8(3): p. 218-30.
142. Holt, P.G. and P.D. Sly, *Interactions between RSV infection, asthma, and atopy: unraveling the complexities*. J Exp Med, **2002**. 196(10): p. 1271-5.
143. Hori, S., T. Nomura, and S. Sakaguchi, *Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3*. Science, **2003**. 299(5609): p. 1057-61.
144. Hosken, N.A., et al., *The effect of antigen dose on CD4+ T helper cell phenotype development in a T cell receptor-alpha beta-transgenic model*. J Exp Med, **1995**. 182(5): p. 1579-84.
145. Hoyer, K.K., et al., *Interleukin-2 in the development and control of inflammatory disease*. Immunol Rev, **2008**. 226: p. 19-28.
146. Hubert, P., et al., *The cross-talk between dendritic and regulatory T cells: good or evil?* J Leukoc Biol, **2007**. 82(4): p. 781-94.
147. Hysi, P., et al., *NOD1 variation, immunoglobulin E and asthma*. Hum Mol Genet, **2005**. 14(7): p. 935-41.
148. Imbusch, R. and M.J. Mueller, *Formation of isoprostane F(2)-like compounds (phytoprostanes F(1)) from alpha-linolenic acid in plants*. Free Radic Biol Med, **2000**. 28(5): p. 720-6.
149. Inaba, K., et al., *Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo*. J Exp Med, **1993**. 178(2): p. 479-88.
150. Ito, T., et al., *Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand*. J Exp Med, **2007**. 204(1): p. 105-15.
151. Ivanov, II, et al., *The orphan nuclear receptor RORgamma directs the differentiation program of proinflammatory IL-17+ T helper cells*. Cell, **2006**. 126(6): p. 1121-33.
152. Jakob, T., C. Traidl-Hoffmann, and H. Behrendt, *Dendritic cells--the link between innate and adaptive immunity in allergy*. Curr Allergy Asthma Rep, **2002**. 2(2): p. 93-5.
153. Janeway, C.A., Jr., et al., *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*. 6th Edition ed. **2005**: Churchill Livingstone.
154. Jankovic, D., et al., *Conventional T-bet(+)Foxp3(-) Th1 cells are the major source of host-protective regulatory IL-10 during intracellular protozoan infection*. J Exp Med, **2007**. 204(2): p. 273-83.
155. Jankovic, D., et al., *Single cell analysis reveals that IL-4 receptor/Stat6 signaling is not required for the in vivo or in vitro development of CD4+ lymphocytes with a Th2 cytokine profile*. J Immunol, **2000**. 164(6): p. 3047-55.
156. Jeannin, P., et al., *IgE versus IgG4 production can be differentially regulated by IL-10*. J Immunol, **1998**. 160(7): p. 3555-61.



157. Jiang, H. and L. Chess, *The specific regulation of immune responses by CD8+ T cells restricted by the MHC class Ib molecule, Qa-1*. Annu Rev Immunol, **2000**. 18: p. 185-216.
158. Jiang, W., et al., *The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing*. Nature, **1995**. 375(6527): p. 151-5.
159. Joetham, A., et al., *Naturally occurring lung CD4(+)CD25(+) T cell regulation of airway allergic responses depends on IL-10 induction of TGF-beta*. J Immunol, **2007**. 178(3): p. 1433-42.
160. John, M., et al., *Inhaled corticosteroids increase interleukin-10 but reduce macrophage inflammatory protein-1alpha, granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, and interferon-gamma release from alveolar macrophages in asthma*. Am J Respir Crit Care Med, **1998**. 157(1): p. 256-62.
161. Johnson, A.G., *Immunologie auf 70 Seiten*. **2001**, Stuttgart: Georg Thieme Verlag.
162. Jonuleit, H., et al., *Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells*. J Exp Med, **2000**. 192(9): p. 1213-22.
163. Justice, J.P., et al., *IL-10 gene knockout attenuates allergen-induced airway hyperresponsiveness in C57BL/6 mice*. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, **2001**. 280(2): p. L363-8.
164. Jutel, M., et al., *IL-10 and TGF-beta cooperate in the regulatory T cell response to mucosal allergens in normal immunity and specific immunotherapy*. Eur J Immunol, **2003**. 33(5): p. 1205-14.
165. Jutel, M., et al., *Allergen-specific immunotherapy with recombinant grass pollen allergens*. J Allergy Clin Immunol, **2005**. 116(3): p. 608-13.
166. Jutel, M., et al., *Bee venom immunotherapy results in decrease of IL-4 and IL-5 and increase of IFN-gamma secretion in specific allergen-stimulated T cell cultures*. J Immunol, **1995**. 154(8): p. 4187-94.
167. Kadowaki, N., et al., *Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens*. J Exp Med, **2001**. 194(6): p. 863-9.
168. Kaiko, G.E., et al., *Immunological decision-making: how does the immune system decide to mount a helper T-cell response?* Immunology, **2008**. 123(3): p. 326-38.
169. Kalinski, P., et al., *T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal*. Immunol Today, **1999**. 20(12): p. 561-7.
170. Kanazawa, N., *Dendritic cell immunoreceptors: C-type lectin receptors for pattern-recognition and signaling on antigen-presenting cells*. J Dermatol Sci, **2007**. 45(2): p. 77-86.
171. Kaplan, M.H., et al., *Stat6 is required for mediating responses to IL-4 and for development of Th2 cells*. Immunity, **1996**. 4(3): p. 313-9.
172. Kapsenberg, M.L., *Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization*. Nat Rev Immunol, **2003**. 3(12): p. 984-93.
173. Karsunky, H., et al., *Flt3 ligand regulates dendritic cell development from Flt3+ lymphoid and myeloid-committed progenitors to Flt3+ dendritic cells in vivo*. J Exp Med, **2003**. 198(2): p. 305-13.

174. Kay, A.B., *100 years of 'Allergy': can von Pirquet's word be rescued?* Clin Exp Allergy, **2006**. 36(5): p. 555-9.
175. Kearley, J., et al., *Resolution of airway inflammation and hyperreactivity after in vivo transfer of CD4+CD25+ regulatory T cells is interleukin 10 dependent.* J Exp Med, **2005**. 202(11): p. 1539-47.
176. Keller, A.C., et al., *Hierarchical suppression of asthma-like responses by mucosal tolerance.* J Allergy Clin Immunol, **2006**. 117(2): p. 283-90.
177. Kimura, A., et al., *Suppressor of cytokine signaling-1 selectively inhibits LPS-induced IL-6 production by regulating JAK-STAT.* Proc Natl Acad Sci U S A, **2005**. 102(47): p. 17089-94.
178. Knox, R.B., et al., *Major grass pollen allergen Lol p 1 binds to diesel exhaust particles: implications for asthma and air pollution.* Clin Exp Allergy, **1997**. 27(3): p. 246-51.
179. Koch, F., et al., *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**. 184(2): p. 741-6.
180. Koch, M., et al., *The crystal structure of human CD1d with and without alpha-galactosylceramide.* Nat Immunol, **2005**. 6(8): p. 819-26.
181. Koga, K., et al., *Cyclic adenosine monophosphate suppresses the transcription of proinflammatory cytokines via the phosphorylated c-Fos protein.* Immunity, **2009**. 30(3): p. 372-83.
182. Kolls, J.K. and A. Linden, *Interleukin-17 family members and inflammation.* Immunity, **2004**. 21(4): p. 467-76.
183. Kondo, M., I.L. Weissman, and K. Akashi, *Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow.* Cell, **1997**. 91(5): p. 661-72.
184. Korsgren, M., et al., *Natural killer cells determine development of allergen-induced eosinophilic airway inflammation in mice.* J Exp Med, **1999**. 189(3): p. 553-62.
185. Kroening, P.R., et al., *Cigarette smoke-induced oxidative stress suppresses generation of dendritic cell IL-12 and IL-23 through ERK-dependent pathways.* J Immunol, **2008**. 181(2): p. 1536-47.
186. Kronenberg, M., *Toward an understanding of NKT cell biology: progress and paradoxes.* Annu Rev Immunol, **2005**. 23: p. 877-900.
187. Kronenberg, M. and L. Gapin, *The unconventional lifestyle of NKT cells.* Nat Rev Immunol, **2002**. 2(8): p. 557-68.
188. Kuhn, R., et al., *Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis.* Cell, **1993**. 75(2): p. 263-74.
189. Kuwana, M., *Induction of anergic and regulatory T cells by plasmacytoid dendritic cells and other dendritic cell subsets.* Hum Immunol, **2002**. 63(12): p. 1156-63.
190. Langenkamp, A., et al., *Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells.* Nat Immunol, **2000**. 1(4): p. 311-6.
191. Lantz, O. and A. Bendelac, *An invariant T cell receptor alpha chain is used by a unique subset of major histocompatibility complex class I-specific CD4+ and CD4-8- T cells in mice and humans.* J Exp Med, **1994**. 180(3): p. 1097-106.

192. Latchman, Y., et al., *PD-L2 is a second ligand for PD-1 and inhibits T cell activation*. Nat Immunol, **2001**. 2(3): p. 261-8.
193. Lebman, D.A. and R.L. Coffman, *Interleukin 4 causes isotype switching to IgE in T cell-stimulated clonal B cell cultures*. J Exp Med, **1988**. 168(3): p. 853-62.
194. Lebre, M.C., et al., *Double-stranded RNA-exposed human keratinocytes promote Th1 responses by inducing a Type-1 polarized phenotype in dendritic cells: role of keratinocyte-derived tumor necrosis factor alpha, type I interferons, and interleukin-18*. J Invest Dermatol, **2003**. 120(6): p. 990-7.
195. Lee, P.P., et al., *A critical role for Dnmt1 and DNA methylation in T cell development, function, and survival*. Immunity, **2001**. 15(5): p. 763-74.
196. Lemaitre, B., et al., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, **1996**. 86(6): p. 973-83.
197. Leslie, D.S., et al., *CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells*. J Exp Med, **2002**. 196(12): p. 1575-84.
198. Levings, M.K., et al., *Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells*. Blood, **2005**. 105(3): p. 1162-9.
199. Liang, S.C., et al., *Interleukin (IL)-22 and IL-17 are coexpressed by Th17 cells and cooperatively enhance expression of antimicrobial peptides*. J Exp Med, **2006**. 203(10): p. 2271-9.
200. Lichtenstein, L.M., et al., *IgE antibody measurements in ragweed hay fever. Relationship to clinical severity and the results of immunotherapy*. J Clin Invest, **1973**. 52(2): p. 472-82.
201. Lisbonne, M., et al., *Cutting edge: invariant V alpha 14 NKT cells are required for allergen-induced airway inflammation and hyperreactivity in an experimental asthma model*. J Immunol, **2003**. 171(4): p. 1637-41.
202. Liu, Y.J., *IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors*. Annu Rev Immunol, **2005**. 23: p. 275-306.
203. Longphre, M., et al., *Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells*. J Clin Invest, **1999**. 104(10): p. 1375-82.
204. Lucas, A.H., *IgG subclass-restricted immune responses to allergens*. Springer Semin Immunopathol, **1990**. 12(4): p. 385-400.
205. Lutz, M.B. and S. Rossner, *Factors influencing the generation of murine dendritic cells from bone marrow: the special role of fetal calf serum*. Immunobiology, **2007**. 212(9-10): p. 855-62.
206. Lutz, M.B. and G. Schuler, *Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity?* Trends Immunol, **2002**. 23(9): p. 445-9.
207. Macedo-Soares, M.F., et al., *Lung eosinophilic inflammation and airway hyperreactivity are enhanced by murine anaphylactic, but not nonanaphylactic, IgG1 antibodies*. J Allergy Clin Immunol, **2004**. 114(1): p. 97-104.
208. Makela, M.J., et al., *IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2000**. 97(11): p. 6007-12.

209. Manavalan, J.S., et al., *High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells*. *Transpl Immunol*, **2003**. 11(3-4): p. 245-58.
210. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. *Nature*, **2006**. 441(7090): p. 231-4.
211. Manz, M.G., et al., *Dendritic cell potentials of early lymphoid and myeloid progenitors*. *Blood*, **2001**. 97(11): p. 3333-41.
212. Marguti, I., et al., *Expansion of CD4+ CD25+ Foxp3+ T cells by bone marrow-derived dendritic cells*. *Immunology*, **2009**. 127(1): p. 50-61.
213. Mariani, V., et al., *Immunomodulatory mediators from pollen enhance the migratory capacity of dendritic cells and license them for Th2 attraction*. *J Immunol*, **2007**. 178(12): p. 7623-31.
214. Mariathasan, S. and D.M. Monack, *Inflammasome adaptors and sensors: intracellular regulators of infection and inflammation*. *Nat Rev Immunol*, **2007**. 7(1): p. 31-40.
215. Matangkasombut, P., et al., *Natural killer T cells in the lungs of patients with asthma*. *J Allergy Clin Immunol*, **2009**. 123(5): p. 1181-5.
216. Matsuda, H., et al., *Alteration of balance between myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood of patients with asthma*. *Am J Respir Crit Care Med*, **2002**. 166(8): p. 1050-4.
217. Matsuda, H., et al., *alpha-Galactosylceramide, a ligand of natural killer T cells, inhibits allergic airway inflammation*. *Am J Respir Cell Mol Biol*, **2005**. 33(1): p. 22-31.
218. Matsuda, J.L., et al., *CD1d-restricted iNKT cells, the 'Swiss-Army knife' of the immune system*. *Curr Opin Immunol*, **2008**. 20(3): p. 358-68.
219. Matsuda, J.L., et al., *Tracking the response of natural killer T cells to a glycolipid antigen using CD1d tetramers*. *J Exp Med*, **2000**. 192(5): p. 741-54.
220. Matsushita, T., et al., *Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression*. *J Clin Invest*, **2008**. 118(10): p. 3420-30.
221. Mattei, F., et al., *IL-15 is expressed by dendritic cells in response to type I IFN, double-stranded RNA, or lipopolysaccharide and promotes dendritic cell activation*. *J Immunol*, **2001**. 167(3): p. 1179-87.
222. Mattes, J., et al., *Intrinsic defect in T cell production of interleukin (IL)-13 in the absence of both IL-5 and eotaxin precludes the development of eosinophilia and airways hyperreactivity in experimental asthma*. *J Exp Med*, **2002**. 195(11): p. 1433-44.
223. Mazzoni, A. and D.M. Segal, *Controlling the Toll road to dendritic cell polarization*. *J Leukoc Biol*, **2004**. 75(5): p. 721-30.
224. McGeachy, M.J., et al., *TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology*. *Nat Immunol*, **2007**. 8(12): p. 1390-7.
225. McHugh, S.M., et al., *A placebo-controlled trial of immunotherapy with two extracts of *Dermatophagoides pteronyssinus* in allergic rhinitis, comparing clinical outcome with changes in antigen-specific IgE, IgG, and IgG subclasses*. *J Allergy Clin Immunol*, **1990**. 86(4 Pt 1): p. 521-31.

226. Medzhitov, R., P. Preston-Hurlburt, and C.A. Janeway, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, **1997**. 388(6640): p. 394-7.
227. Megiovanni, A.M., et al., *Polymorphonuclear neutrophils deliver activation signals and antigenic molecules to dendritic cells: a new link between leukocytes upstream of T lymphocytes*. J Leukoc Biol, **2006**. 79(5): p. 977-88.
228. Meiler, F., et al., *In vivo switch to IL-10-secreting T regulatory cells in high dose allergen exposure*. J Exp Med, **2008**. 205(12): p. 2887-98.
229. Mellor, A.L. and D.H. Munn, *IDO expression by dendritic cells: tolerance and tryptophan catabolism*. Nat Rev Immunol, **2004**. 4(10): p. 762-74.
230. Mendiratta, S.K., et al., *CD1d1 mutant mice are deficient in natural T cells that promptly produce IL-4*. Immunity, **1997**. 6(4): p. 469-77.
231. Mestas, J. and C.C. Hughes, *Of mice and not men: differences between mouse and human immunology*. J Immunol, **2004**. 172(5): p. 2731-8.
232. Milovanovic, M., et al., *Allergen extract-induced interleukin-10 in human memory B cells inhibits immunoglobulin E production*. Clin Exp Allergy, **2009**. 39(5): p. 671-8.
233. Moore, M.L. and R.S. Peebles, Jr., *Update on the role of prostaglandins in allergic lung inflammation: separating friends from foes, harder than you might think*. J Allergy Clin Immunol, **2006**. 117(5): p. 1036-9.
234. Morishima, Y., et al., *Suppression of eosinophilic airway inflammation by treatment with alpha-galactosylceramide*. Eur J Immunol, **2005**. 35(10): p. 2803-14.
235. Moseman, E.A., et al., *Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells*. J Immunol, **2004**. 173(7): p. 4433-42.
236. Mosmann, T.R. and R.L. Coffman, *TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties*. Annu Rev Immunol, **1989**. 7: p. 145-73.
237. Mothes, N., et al., *Allergen-specific immunotherapy with a monophosphoryl lipid A-adjuvanted vaccine: reduced seasonally boosted immunoglobulin E production and inhibition of basophil histamine release by therapy-induced blocking antibodies*. Clin Exp Allergy, **2003**. 33(9): p. 1198-208.
238. Mueller, M.J., *Radically novel prostaglandins in animals and plants: the isoprostanes*. Chem Biol, **1998**. 5(12): p. R323-33.
239. Muller, U.R., *Bee venom allergy in beekeepers and their family members*. Curr Opin Allergy Clin Immunol, **2005**. 5(4): p. 343-7.
240. Munn, D.H., et al., *Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase*. Science, **2002**. 297(5588): p. 1867-70.
241. Murphy, K.M., A.B. Heimberger, and D.Y. Loh, *Induction by antigen of intrathymic apoptosis of CD4+CD8+TCRlo thymocytes in vivo*. Science, **1990**. 250(4988): p. 1720-3.
242. Mutalithas, K., et al., *Bronchoalveolar lavage invariant natural killer T cells are not increased in asthma*. J Allergy Clin Immunol, **2007**. 119(5): p. 1274-6.
243. Naik, S.H., et al., *Intrasplenic steady-state dendritic cell precursors that are distinct from monocytes*. Nat Immunol, **2006**. 7(6): p. 663-71.

244. Nasser, S.M., et al., *Interleukin-10 levels increase in cutaneous biopsies of patients undergoing wasp venom immunotherapy*. Eur J Immunol, **2001**. 31(12): p. 3704-13.
245. Nencioni, A., et al., *Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma*. J Immunol, **2002**. 169(3): p. 1228-35.
246. Neumann, J., *Immunbiologie: Eine Einführung*. 1. Auflage ed. **2008**, Berlin: Springer-Verlag.
247. Noon, L., *Prophylactic inoculation against hay fever*. Lancet, **1911**. 1: p. 1572-1573.
248. Nouri-Aria, K.T., et al., *IL-9 and c-Kit+ mast cells in allergic rhinitis during seasonal allergen exposure: effect of immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, **2005**. 116(1): p. 73-9.
249. Nouri-Aria, K.T., et al., *Grass pollen immunotherapy induces mucosal and peripheral IL-10 responses and blocking IgG activity*. J Immunol, **2004**. 172(5): p. 3252-9.
250. O'Farrell, A.M., et al., *IL-10 inhibits macrophage activation and proliferation by distinct signaling mechanisms: evidence for Stat3-dependent and -independent pathways*. EMBO J, **1998**. 17(4): p. 1006-18.
251. O'Keeffe, M., et al., *Mouse plasmacytoid cells: long-lived cells, heterogeneous in surface phenotype and function, that differentiate into CD8(+) dendritic cells only after microbial stimulus*. J Exp Med, **2002**. 196(10): p. 1307-19.
252. Oderup, C., et al., *Cytotoxic T lymphocyte antigen-4-dependent down-modulation of costimulatory molecules on dendritic cells in CD4+ CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression*. Immunology, **2006**. 118(2): p. 240-9.
253. Ohkawara, Y., et al., *CD40 expression by human peripheral blood eosinophils*. J Clin Invest, **1996**. 97(7): p. 1761-6.
254. Omatsu, Y., et al., *Development of murine plasmacytoid dendritic cells defined by increased expression of an inhibitory NK receptor, Ly49Q*. J Immunol, **2005**. 174(11): p. 6657-62.
255. Pajno, G.B., et al., *Prevention of new sensitizations in asthmatic children monosensitized to house dust mite by specific immunotherapy. A six-year follow-up study*. Clin Exp Allergy, **2001**. 31(9): p. 1392-7.
256. Palucka, K. and J. Banchereau, *Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity*. J Clin Immunol, **1999**. 19(1): p. 12-25.
257. Pandiyan, P., et al., *CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells*. Nat Immunol, **2007**. 8(12): p. 1353-62.
258. Parchmann, S. and M.J. Mueller, *Evidence for the formation of dinor isoprostanes E1 from alpha-linolenic acid in plants*. J Biol Chem, **1998**. 273(49): p. 32650-5.
259. Parish, C.R., *Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies*. Immunol Cell Biol, **1999**. 77(6): p. 499-508.
260. Pasare, C. and R. Medzhitov, *Toll pathway-dependent blockade of CD4+CD25+ T cell-mediated suppression by dendritic cells*. Science, **2003**. 299(5609): p. 1033-6.
261. Penna, G. and L. Adorini, *1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation*. J Immunol, **2000**. 164(5): p. 2405-11.

262. Pham-Thi, N., et al., *Enhanced frequency of immunoregulatory invariant natural killer T cells in the airways of children with asthma*. J Allergy Clin Immunol, **2006**. 117(1): p. 217-8.
263. Plotz, S.G., et al., *Chemotaxis and activation of human peripheral blood eosinophils induced by pollen-associated lipid mediators*. J Allergy Clin Immunol, **2004**. 113(6): p. 1152-60.
264. Porubsky, S., et al., *Normal development and function of invariant natural killer T cells in mice with isoglobotrihexosylceramide (iGb3) deficiency*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2007**. 104(14): p. 5977-82.
265. Read, S., V. Malmstrom, and F. Powrie, *Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation*. J Exp Med, **2000**. 192(2): p. 295-302.
266. Reis e Sousa, C., P.D. Stahl, and J.M. Austyn, *Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro*. J Exp Med, **1993**. 178(2): p. 509-19.
267. Rifa'i, M., et al., *Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis*. J Exp Med, **2004**. 200(9): p. 1123-34.
268. Ring, J., *Angewandte Allergologie*. 3. Auflage ed. **2003**: Urban & Vogel.
269. Risoan, M.C., et al., *Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation*. Science, **1999**. 283(5405): p. 1183-6.
270. Robbins, S.H., et al., *Novel insights into the relationships between dendritic cell subsets in human and mouse revealed by genome-wide expression profiling*. Genome Biol, **2008**. 9(1): p. R17.
271. Roers, A., et al., *T cell-specific inactivation of the interleukin 10 gene in mice results in enhanced T cell responses but normal innate responses to lipopolysaccharide or skin irritation*. J Exp Med, **2004**. 200(10): p. 1289-97.
272. Rothenberg, E.V., J.E. Moore, and M.A. Yui, *Launching the T-cell-lineage developmental programme*. Nat Rev Immunol, **2008**. 8(1): p. 9-21.
273. Royer, B., et al., *Inhibition of IgE-induced activation of human mast cells by IL-10*. Clin Exp Allergy, **2001**. 31(5): p. 694-704.
274. Rubtsov, Y.P., et al., *Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces*. Immunity, **2008**. 28(4): p. 546-58.
275. Sakaguchi, S., *Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses*. Annu Rev Immunol, **2004**. 22: p. 531-62.
276. Salek-Ardakani, S., et al., *OX40 (CD134) controls memory T helper 2 cells that drive lung inflammation*. J Exp Med, **2003**. 198(2): p. 315-24.
277. Sallusto, F., et al., *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products*. J Exp Med, **1995**. 182(2): p. 389-400.
278. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *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**. 179(4): p. 1109-18.

279. Sato, K., et al., *Modified myeloid dendritic cells act as regulatory dendritic cells to induce anergic and regulatory T cells*. *Blood*, **2003**. 101(9): p. 3581-9.
280. Schandene, L., et al., *B7/CD28-dependent IL-5 production by human resting T cells is inhibited by IL-10*. *J Immunol*, **1994**. 152(9): p. 4368-74.
281. Schappi, G.F., et al., *Concentrations of the major birch tree allergen Bet v 1 in pollen and respirable fine particles in the atmosphere*. *J Allergy Clin Immunol*, **1997**. 100(5): p. 656-61.
282. Schoenborn, J.R. and C.B. Wilson, *Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses*. *Adv Immunol*, **2007**. 96: p. 41-101.
283. Schumann, J., et al., *Targeted expression of human CD1d in transgenic mice reveals independent roles for thymocytes and thymic APCs in positive and negative selection of Valpha14i NKT cells*. *J Immunol*, **2005**. 175(11): p. 7303-10.
284. Schwartz, R.H., et al., *T-cell clonal anergy*. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, **1989**. 54 Pt 2: p. 605-10.
285. Sen, Y., et al., *V alpha 24-invariant NKT cells from patients with allergic asthma express CCR9 at high frequency and induce Th2 bias of CD3+ T cells upon CD226 engagement*. *J Immunol*, **2005**. 175(8): p. 4914-26.
286. Sharpe, A.H. and G.J. Freeman, *The B7-CD28 superfamily*. *Nat Rev Immunol*, **2002**. 2(2): p. 116-26.
287. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. *Nat Rev Immunol*, **2002**. 2(3): p. 151-61.
288. Shortman, K. and S.H. Naik, *Steady-state and inflammatory dendritic-cell development*. *Nat Rev Immunol*, **2007**. 7(1): p. 19-30.
289. Siegal, F.P., et al., *The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood*. *Science*, **1999**. 284(5421): p. 1835-7.
290. Silva, A.S., et al., *Regulation of anaphylactic IgG1 antibody production by IL-4 and IL-10*. *Int Arch Allergy Immunol*, **2006**. 141(1): p. 70-8.
291. Skapenko, A., et al., *The IL-4 receptor alpha-chain-binding cytokines, IL-4 and IL-13, induce forkhead box P3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells from CD25-CD4+ precursors*. *J Immunol*, **2005**. 175(9): p. 6107-16.
292. Smiley, S.T., M.H. Kaplan, and M.J. Grusby, *Immunoglobulin E production in the absence of interleukin-4-secreting CD1-dependent cells*. *Science*, **1997**. 275(5302): p. 977-9.
293. Smith, T.R. and V. Kumar, *Revival of CD8+ Treg-mediated suppression*. *Trends Immunol*, **2008**. 29(7): p. 337-42.
294. Smith, W.L., L.J. Marnett, and D.L. DeWitt, *Prostaglandin and thromboxane biosynthesis*. *Pharmacol Ther*, **1991**. 49(3): p. 153-79.
295. Smits, H.H., et al., *Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development*. *Eur J Immunol*, **2004**. 34(5): p. 1371-80.
296. Sonoda, K.H., et al., *NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance*. *J Immunol*, **2001**. 166(1): p. 42-50.



297. Soumelis, V., et al., *Human epithelial cells trigger dendritic cell mediated allergic inflammation by producing TSLP*. Nat Immunol, **2002**. 3(7): p. 673-80.
298. Spinozzi, F. and S.A. Porcelli, *Recognition of lipids from pollens by CD1-restricted T cells*. Immunol Allergy Clin North Am, **2007**. 27(1): p. 79-92.
299. Steinbrink, K., et al., *Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells*. J Immunol, **1997**. 159(10): p. 4772-80.
300. Steinman, R.M. and Z.A. Cohn, *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. J Exp Med, **1973**. 137(5): p. 1142-62.
301. Stockinger, B., et al., *B cells solicit their own help from T cells*. J Exp Med, **1996**. 183(3): p. 891-9.
302. Straus, D.S. and C.K. Glass, *Anti-inflammatory actions of PPAR ligands: new insights on cellular and molecular mechanisms*. Trends Immunol, **2007**. 28(12): p. 551-8.
303. Swain, S.L., et al., *IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors*. J Immunol, **1990**. 145(11): p. 3796-806.
304. Szabo, S.J., et al., *Distinct effects of T-bet in TH1 lineage commitment and IFN-gamma production in CD4 and CD8 T cells*. Science, **2002**. 295(5553): p. 338-42.
305. Szatmari, I., E. Rajnavolgyi, and L. Nagy, *PPARgamma, a lipid-activated transcription factor as a regulator of dendritic cell function*. Ann N Y Acad Sci, **2006**. 1088: p. 207-18.
306. Taher, Y.A., et al., *Indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent tryptophan metabolites contribute to tolerance induction during allergen immunotherapy in a mouse model*. J Allergy Clin Immunol, **2008**. 121(4): p. 983-91 e2.
307. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state*. Int Immunol, **1998**. 10(12): p. 1969-80.
308. Takahashi, T., et al., *Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4*. J Exp Med, **2000**. 192(2): p. 303-10.
309. Takeda, K. and S. Akira, *Toll-like receptors in innate immunity*. Int Immunol, **2005**. 17(1): p. 1-14.
310. Tanaka, H., et al., *Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio*. J Exp Med, **2000**. 192(3): p. 405-12.
311. Ting, J.P. and B.K. Davis, *CATERPILLER: a novel gene family important in immunity, cell death, and diseases*. Annu Rev Immunol, **2005**. 23: p. 387-414.
312. Tournoy, K.G., J.C. Kips, and R.A. Pauwels, *Endogenous interleukin-10 suppresses allergen-induced airway inflammation and nonspecific airway responsiveness*. Clin Exp Allergy, **2000**. 30(6): p. 775-83.
313. Traidl-Hoffmann, C., et al., *Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes*. J Allergy Clin Immunol, **2002**. 109(5): p. 831-8.

314. Traidl-Hoffmann, C., et al., *Impact of pollen on human health: more than allergen carriers?* Int Arch Allergy Immunol, **2003**. 131(1): p. 1-13.
315. Traidl-Hoffmann, C., et al., *Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization.* J Exp Med, **2005**. 201(4): p. 627-36.
316. Trinchieri, G., S. Pflanz, and R.A. Kastelein, *The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses.* Immunity, **2003**. 19(5): p. 641-4.
317. Ueno, H., et al., *Dendritic cell subsets in health and disease.* Immunol Rev, **2007**. 219: p. 118-42.
318. Valenta, R., et al., *Recombinant allergens.* Allergy, **1998**. 53(6): p. 552-61.
319. Valladeau, J. and S. Saeland, *Cutaneous dendritic cells.* Semin Immunol, **2005**. 17(4): p. 273-83.
320. van der Aar, A.M., et al., *Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition.* J Immunol, **2007**. 178(4): p. 1986-90.
321. van der Marel, A.P., et al., *Blockade of IDO inhibits nasal tolerance induction.* J Immunol, **2007**. 179(2): p. 894-900.
322. van Gisbergen, K.P., et al., *Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN.* J Exp Med, **2005**. 201(8): p. 1281-92.
323. Van Oosterhout, A.J., et al., *Allergen immunotherapy inhibits airway eosinophilia and hyperresponsiveness associated with decreased IL-4 production by lymphocytes in a murine model of allergic asthma.* Am J Respir Cell Mol Biol, **1998**. 19(4): p. 622-8.
324. van Vliet, S.J., et al., *Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity.* Curr Opin Immunol, **2007**. 19(4): p. 435-40.
325. Varney, V.A., et al., *Influence of grass pollen immunotherapy on cellular infiltration and cytokine mRNA expression during allergen-induced late-phase cutaneous responses.* J Clin Invest, **1993**. 92(2): p. 644-51.
326. Vassallo, R., et al., *Cigarette smoke extract suppresses human dendritic cell function leading to preferential induction of Th-2 priming.* J Immunol, **2005**. 175(4): p. 2684-91.
327. Vercelli, D., *Advances in asthma and allergy genetics in 2007.* J Allergy Clin Immunol, **2008**. 122(2): p. 267-71.
328. Vieira, P.L., et al., *IL-10-secreting regulatory T cells do not express Foxp3 but have comparable regulatory function to naturally occurring CD4+CD25+ regulatory T cells.* J Immunol, **2004**. 172(10): p. 5986-93.
329. Vijayanand, P., et al., *Invariant natural killer T cells in asthma and chronic obstructive pulmonary disease.* N Engl J Med, **2007**. 356(14): p. 1410-22.
330. Visco, V., et al., *Human IgG monoclonal antibodies that modulate the binding of specific IgE to birch pollen Bet v 1.* J Immunol, **1996**. 157(2): p. 956-62.
331. Vissers, J.L., et al., *Allergen immunotherapy induces a suppressive memory response mediated by IL-10 in a mouse asthma model.* J Allergy Clin Immunol, **2004**. 113(6): p. 1204-10.

332. Vlad, G., et al., *Interleukin-10 induces the upregulation of the inhibitory receptor ILT4 in monocytes from HIV positive individuals*. Hum Immunol, **2003**. 64(5): p. 483-9.
333. von Bubnoff, D., et al., *Asymptomatic atopy is associated with increased indoleamine 2,3-dioxygenase activity and interleukin-10 production during seasonal allergen exposure*. Clin Exp Allergy, **2004**. 34(7): p. 1056-63.
334. Vremec, D., et al., *CD4 and CD8 expression by dendritic cell subtypes in mouse thymus and spleen*. J Immunol, **2000**. 164(6): p. 2978-86.
335. Vremec, D., et al., *The surface phenotype of dendritic cells purified from mouse thymus and spleen: investigation of the CD8 expression by a subpopulation of dendritic cells*. J Exp Med, **1992**. 176(1): p. 47-58.
336. Wachholz, P.A., et al., *Inhibition of allergen-IgE binding to B cells by IgG antibodies after grass pollen immunotherapy*. J Allergy Clin Immunol, **2003**. 112(5): p. 915-22.
337. Wakkach, A., et al., *Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo*. Immunity, **2003**. 18(5): p. 605-17.
338. Walker, S.M., et al., *Grass pollen immunotherapy for seasonal rhinitis and asthma: a randomized, controlled trial*. J Allergy Clin Immunol, **2001**. 107(1): p. 87-93.
339. Walsh, E.R., et al., *Strain-specific requirement for eosinophils in the recruitment of T cells to the lung during the development of allergic asthma*. J Exp Med, **2008**. 205(6): p. 1285-92.
340. Walter, D.M., et al., *Critical role for IL-13 in the development of allergen-induced airway hyperreactivity*. J Immunol, **2001**. 167(8): p. 4668-75.
341. Wang, J., et al., *Circulating, but not local lung, IL-5 is required for the development of antigen-induced airways eosinophilia*. J Clin Invest, **1998**. 102(6): p. 1132-41.
342. Weaver, C.T., et al., *Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties*. Immunity, **2006**. 24(6): p. 677-88.
343. Webb, D.C., et al., *Integrated signals between IL-13, IL-4, and IL-5 regulate airways hyperreactivity*. J Immunol, **2000**. 165(1): p. 108-13.
344. Wills-Karp, M., *Interleukin-13 in asthma pathogenesis*. Immunol Rev, **2004**. 202: p. 175-90.
345. Wilson, D.R., et al., *Grass pollen immunotherapy inhibits seasonal increases in basophils and eosinophils in the nasal epithelium*. Clin Exp Allergy, **2001**. 31(11): p. 1705-13.
346. Xiao, B.G., W.H. Zhu, and C.Z. Lu, *The presence of GM-CSF and IL-4 interferes with effect of TGF-beta1 on antigen presenting cells in patients with multiple sclerosis and in rats with experimental autoimmune encephalomyelitis*. Cell Immunol, **2007**. 249(1): p. 30-6.
347. Yamazaki, S., et al., *Direct expansion of functional CD25+ CD4+ regulatory T cells by antigen-processing dendritic cells*. J Exp Med, **2003**. 198(2): p. 235-47.
348. Yamazaki, S., et al., *Effective expansion of alloantigen-specific Foxp3+ CD25+ CD4+ regulatory T cells by dendritic cells during the mixed leukocyte reaction*. Proc Natl Acad Sci U S A, **2006**. 103(8): p. 2758-63.
349. Yanaba, K., et al., *A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5+ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses*. Immunity, **2008**. 28(5): p. 639-50.
350. Yanaba, K., et al., *The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals*. J Immunol, **2009**. 182(12): p. 7459-72.

351. Yang, G.X., et al., *Plasmacytoid dendritic cells of different origins have distinct characteristics and function: studies of lymphoid progenitors versus myeloid progenitors*. J Immunol, **2005**. 175(11): p. 7281-7.
352. Yang, X.O., et al., *STAT3 regulates cytokine-mediated generation of inflammatory helper T cells*. J Biol Chem, **2007**. 282(13): p. 9358-63.
353. Yoshiki, R., et al., *IL-10-producing Langerhans cells and regulatory T cells are responsible for depressed contact hypersensitivity in grafted skin*. J Invest Dermatol, **2009**. 129(3): p. 705-13.
354. Zelensky, A.N. and J.E. Gready, *The C-type lectin-like domain superfamily*. FEBS J, **2005**. 272(24): p. 6179-217.
355. Zeller, J.C., et al., *Induction of CD4+ T cell alloantigen-specific hyporesponsiveness by IL-10 and TGF-beta*. J Immunol, **1999**. 163(7): p. 3684-91.
356. Zeng, Z., et al., *Crystal structure of mouse CD1: An MHC-like fold with a large hydrophobic binding groove*. Science, **1997**. 277(5324): p. 339-45.
357. Zhang, J., et al., *Isolation of lymphocytes and their innate immune characterizations from liver, intestine, lung and uterus*. Cell Mol Immunol, **2005**. 2(4): p. 271-80.
358. Zhou, D., et al., *Lysosomal glycosphingolipid recognition by NKT cells*. Science, **2004**. 306(5702): p. 1786-9.
359. Zhu, J., et al., *Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion*. J Immunol, **2001**. 166(12): p. 7276-81.
360. Zhu, W. and M.I. Gilmour, *Comparison of allergic lung disease in three mouse strains after systemic or mucosal sensitization with ovalbumin antigen*. Immunogenetics, **2009**. 61(3): p. 199-207.
361. Zimmermann, N., et al., *Chemokines in asthma: cooperative interaction between chemokines and IL-13*. J Allergy Clin Immunol, **2003**. 111(2): p. 227-42; quiz 243.

## 8. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1 Differenzierung von Dendritischen Zellen aus Knochenmarkszellen	3
Abbildung 1.2 Die verschiedenen TLR mit ihren Liganden und ihren induzierten Signalwegen	6
Abbildung 1.3 T Zell-Polarisierung durch DC: Die 3-Signal Hypothese	10
Abbildung 1.4 Chemische Struktur des $\alpha$ -Galactosylceramid	18
Abbildung 1.5 Chemische Strukturen pflanzlicher Phytoprostane (A) und den homologen humanen Prostaglandinen (B)	23
Abbildung 1.6 Funktionelle Veränderungen der Immunzellen durch die spezifische Immuntherapie (SIT)	25
Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der Wirkungsweise eines A) Sandwich-ELISA und B) indirekten ELISA	54
Abbildung 2.2 Schema zum Ablauf der Immuntherapie	58
Abbildung 2.3 Temperatur- und Zeitverlauf der PCR	59
Abbildung 3.1 Toxizität von <i>Bet.</i> -APE bzw. PPE <sub>1</sub> auf BALB/c pDC	63
Abbildung 3.2 Expression von Oberflächenmarkern auf BALB/c pDC in Abhängigkeit von <i>Bet.</i> -APE bzw. PPE <sub>1</sub>	64
Abbildung 3.3 Einfluss von <i>Bet.</i> -APE bzw. PPE <sub>1</sub> auf die Sekretion von CpG 2216 induziertem IFN- $\alpha$ aus BALB/c pDC	65
Abbildung 3.4 Toxizität von <i>Bet.</i> -APE, PPE <sub>1</sub> und PPF <sub>1</sub> auf BALB/c cDC	66
Abbildung 3.5 Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf BALB/c cDC nach Inkubation mit <i>Bet.</i> -APE, PPE <sub>1</sub> , PPF <sub>1</sub>	67
Abbildung 3.6 Einfluss von <i>Bet.</i> -APE, PPE <sub>1</sub> und PPF <sub>1</sub> auf die Sekretion von LPS oder CpG 2216 induzierten Zytokinen aus BALB/c cDC	68
Abbildung 3.7 Sekretion von LPS oder CpG 2216 induzierten Zytokinen aus cDC nach Stimulation mit PGE <sub>2</sub>	70
Abbildung 3.8 Einfluss von <i>Bet.</i> -APE auf die Sekretion von LPS oder CpG 2216 induzierten Zytokinen aus C57BL/6 cDC	71
Abbildung 3.9 Proliferationsmessung von allogener MLR (BALB/c T Zellen mit C57BL/6 cDC) nach Inkubation der cDC + / - <i>Bet.</i> -APE	73
Abbildung 3.10 Intrazelluläre Zytokinbestimmung in CD4 <sup>+</sup> T Zellen nach allogener MLR mit cDC +/- <i>Bet.</i> -APE	74
Abbildung 3.11 Intrazelluläre Zytokinbestimmung der Kontrollen zur Th1 und Th2 Polarisierung im allogenen Kultursystem	75
Abbildung 3.12 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand von allogener MLR	77
Abbildung 3.13 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand der Kontrollen zur Th1 und Th2 Polarisierung von allogener MLR	78
Abbildung 3.14 Proliferationsmessung von OVA-spezifischen DO11.10 T Zellen	80
Abbildung 3.15 Intrazelluläre Zytokinbestimmung in OVA-spezifischen DO11.10 T Zellen	81
Abbildung 3.16 Intrazelluläre Zytokinbestimmung der Kontrolle zur Th1 und Th2 Polarisierung im antigenspezifischen DO11.10 T Zell-Kultursystem	82
Abbildung 3.17 Toxizität von <i>Bet.</i> -APE auf MNC der Leber	83
Abbildung 3.18 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand von MNC der Leber nach Stimulation mit <i>Bet.</i> -APE	85
Abbildung 3.19 Toxizität von <i>Bet.</i> -APE auf MNC der Milz	86
Abbildung 3.20 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand von MNC der Milz nach Stimulation mit <i>Bet.</i> -APE	87

---

Abbildung 3.22 Analyse der Expression von CD1d auf C57BL/6 cDC nach <i>Bet.</i> -APE Behandlung	89
Abbildung 3.23 Analyse der Atemwegsentzündung von C57BL/6 wt Mäusen nach Immuntherapie	91
Abbildung 3.24 Bestimmung von OVA-spezifischen Immunglobulinen in Serum von C57BL/6 wt Mäusen	92
Abbildung 3.25 Analyse der Atemwegsentzündung von C57BL/6 IL-10 k.o. Mäusen nach Immuntherapie	94
Abbildung 3.26 Bestimmung von Immunglobulinen in Serum von C57BL/6 IL-10 k.o. Mäusen	95
Abbildung 3.27 Analyse der Atemwegsentzündung von C57BL/6 IL-10 <sup>FL/FL</sup> Cre <sup>-</sup> und C57BL/6 IL-10 <sup>FL/FL</sup> CD4-Cre <sup>+</sup> Mäuse nach Immuntherapie	97
Abbildung 3.28 Bestimmung von OVA-spezifischen Immunglobulinen in Serum von C57BL/6 IL-10 <sup>FL/FL</sup> Cre <sup>-</sup> und C57BL/6 IL-10 <sup>FL/FL</sup> CD4-Cre <sup>+</sup> Mäusen	98
Abbildung 3.29 Einfluss der Blockierung des IL-10R auf die Atemwegsentzündung von C57BL/6 IL-10 <sup>FL/FL</sup> CD4-Cre <sup>+</sup> Mäusen nach Immuntherapie	99
Abbildung 3.30 Einfluss der Blockierung des IL-10R auf OVA-spezifische Immunglobuline im Serum von C57BL/6 IL-10 <sup>FL/FL</sup> CD4-Cre <sup>+</sup> Mäusen	101
Abbildung 3.31 Analyse der Atemwegsentzündung von C57BL/6 NKT Zell defizienten Mäusen nach Immuntherapie	103
Abbildung 3.32 Bestimmung von OVA-spezifischen Immunglobulinen in Serum von C57BL/6 NKT Zell defizienten Mäusen	104
Abbildung 10.1 Bestimmung des prozentualen Anteils an pDC an d8 der Generierung	216
Abbildung 10.2 Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der Aktivierungsmarker von pDC	216
Abbildung 10.3 Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Aktivierungsmarker von cDC	217
Abbildung 10.4 Bestimmung der Zellteilungsintervalle <i>j</i> zur Berechnung der Zellteilungen	218
Abbildung 10.5 Bestimmung des Anteils an zytokinproduzierender Zellen nach intrazellulären Zytokinakkumulation	219
Abbildung 10.6 Bestimmung des prozentualen Anteils an NKT Zellen von Milz und Leber	219
Abbildung 10.7 Test auf Mykoplasmenkontamination in den verwendeten Hybridomen	220

## 9. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1.1 TLR Expression in humanen und murinen DC Subtypen</b>	<b>5</b>
<b>Tabelle 1.2 Prozentualer Anteil an iNKT Zellen von Lymphozyten in verschiedenen Organen von Maus und Mensch</b>	<b>19</b>
<b>Tabelle 2.3 Verwendete Differenzierungsfaktoren für die Generierung von DC aus Knochenmark</b>	<b>45</b>
<b>Tabelle 2.4 Verwendete TLR- und CD1d-Liganden</b>	<b>45</b>
<b>Tabelle 2.5 Verwendete Prostaglandin- und Phytoprostan-Stimuli</b>	<b>45</b>
<b>Tabelle 2.6 Übersicht der eingesetzten DC – T-Zell-Verhältnisse für den allogenen Proliferationsansatz</b>	<b>46</b>
<b>Tabelle 2.7 Übersicht der eingesetzten DC – T-Zell-Verhältnisse für den antigenspezifischen Proliferationsansatz</b>	<b>47</b>
<b>Tabelle 2.8 Übersicht über die eingesetzten Standardkonzentrationen und die Assay Range der Zytokin-ELISA</b>	<b>55</b>
<b>Tabelle 2.9 Übersicht der Probenverdünnungen der Immunglobulin-ELISA</b>	<b>56</b>
<b>Tabelle 2.10 Übersicht der eingesetzten Standards der Immunglobulin-ELISA</b>	<b>56</b>
<b>Tabelle 10.1 Zusammenstellung der Endotoxinkonzentrationen in <i>Bet.</i>-APE und OVA</b>	<b>220</b>

## 10. Anhang

### 10.1. Datenanhang

Daten zur Abbildung 3.1 Toxizität von *Bet.*-APE bzw. PPE<sub>1</sub> auf BALB/c pDC

lebende Zellen [%]								
Aktivierung pDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	CpG	CpG	CpG	CpG
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	0,0	0,3	1,0	2,5	0,0	0,3	1,0	2,5
V1	54,14	69,57	68,67	63,75	73,40	72,40	71,22	69,06
V2	96,28	78,82	77,94	77,40	82,05	78,50	77,93	72,85
V3	49,15	48,78	47,09	39,76	42,86	37,51	39,06	38,11
MW	66,52	65,72	64,57	60,30	66,10	62,80	62,74	60,01
SEM	12,20	7,25	7,46	8,98	9,71	10,43	9,79	8,98
n	3	3	3	3	3	3	3	3
Aktivierung pDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	CpG	CpG	CpG	CpG
PPE <sub>1</sub> [M]	0,0	3×10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	0,0	3×10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>
V1	54,14	70,78	71,22	68,93	73,40	73,25	73,85	73,27
V2	96,28		76,37	77,61	82,05		81,34	81,31
V3	49,15		48,91	50,73	42,86		37,65	37,12
MW	66,52	70,78	65,50	65,76	66,10	73,25	64,28	63,90
SEM	12,20		6,88	6,47	9,71	11,01	11,01	11,10
n	3	1	3	3	3	1	3	3

Daten zur Abbildung 3.2 A Expression von Oberflächenmarkern auf BALB/c pDC:

MFI CD40								
Aktivierung pDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	CpG	CpG	CpG	CpG
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	0,0	0,3	1,0	2,5	0,0	0,3	1,0	2,5
V1	6,74	5,64	5,30	6,52	17,97	34,15	18,23	15,94
V2	6,64	6,48	6,18	6,40	25,64	23,95	21,17	26,16
V3	6,28	6,06	6,46	10,01	86,72	72,23	55,34	
MW	6,55	6,06	5,98	7,64	43,44	43,44	31,58	21,05
SEM	0,11	0,20	0,29	0,97	17,76	12,00	9,72	2,95
n	3	3	3	3	3	3	3	2
Aktivierung pDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	CpG	CpG	CpG	CpG
PPE <sub>1</sub> [M]	0,0	3×10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	0,0	3×10 <sup>-7</sup>	10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>
V1	6,74	6,59	7,56	7,27	17,97	34,00	25,89	28,80
V2	6,64	5,09	5,02	4,83	25,64	10,67	12,00	12,44
V3	6,28		4,94	4,01	86,72		41,78	42,33
MW	6,55	5,84	5,84	5,37	43,44	22,34	26,56	27,86



<b>SEM</b>	0,11	0,20	0,29	0,97	17,76	8,25	7,02	
<b>n</b>	3	2	3	3	3	2	3	3

### Daten zur Abbildung 3.2 B Expression von Oberflächenmarkern auf BALB/c pDC

MFI CD69								
Aktivierung pDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	CpG	CpG	CpG	CpG
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>1,0</b>	<b>2,5</b>	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>1,0</b>	<b>2,5</b>
<b>V1</b>	18,73	8,03	7,50	9,19	29,74	117,92	24,24	19,91
<b>V2</b>	5,21	4,48	4,39	4,61	30,89	24,61	20,87	23,88
<b>V3</b>	8,12	7,10	8,51	12,52	174,34	141,52	128,00	
<b>MW</b>	10,69	6,54	6,80	8,77	78,32	94,68	57,70	21,90
<b>SEM</b>	3,35	0,87	1,01	1,87	39,20	29,14	28,71	1,15
<b>n</b>	3	3	3	3	3	3	3	2
Aktivierung pDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	CpG	CpG	CpG	CpG
<b>PPE<sub>1</sub> [M]</b>	<b>0,0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>0,0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>
<b>V1</b>	18,73	16,50	16,47	17,50	29,74	131,17	111,65	110,43
<b>V2</b>	5,21	4,34	4,20	4,35	30,89	23,32	26,94	24,05
<b>V3</b>	8,12		5,94	5,67	174,34		74,80	84,74
<b>MW</b>	10,69	10,42	8,87	9,17	78,32	77,25	71,13	73,07
<b>SEM</b>	3,35	4,30	3,13	3,41	39,20	38,13	20,02	20,91
<b>n</b>	3	2	3	3	3	2	3	3

### Daten zur Abbildung 3.3 Einfluss von Bet.-APE bzw. PPE<sub>1</sub> auf die Sekretion von CpG 2216 induziertem IFN-α aus BALB/c pDC

Aktivierung pDC	IFN-α [pg/ml]				IFN-α [%] normiert			
	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>1,0</b>	<b>2,5</b>	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>1,0</b>	<b>2,5</b>
<b>V1</b>	9479,14	9640,62	9656,64	8119,21	100	101,70	101,87	85,65
<b>V2</b>	402,27	415,89	353,64	535,55	100	103,39	87,91	133,13
<b>V3</b>	1434,73	1241,11	1357,37	819,52	100	86,50	94,61	57,12
<b>MW</b>	3772,05	3765,87	3789,21	3158,09	100	97,20	94,80	91,97
<b>SEM</b>	2342,58	2406,23	2407,02	2026,47		4,38	3,29	18,10
<b>n</b>	3	3	3	3	3	3	3	3
Aktivierung pDC	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG	CpG
<b>PPE<sub>1</sub> [M]</b>	<b>0,0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>0,0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>
<b>V1</b>	9479,14	9920,88	9944,90	9912,87	100	104,66	104,91	104,58
<b>V2</b>	402,27	491,94	475,14	300,70	100	122,29	118,11	74,75
<b>V3</b>	1534,40	1906,46	1955,87	1785,80	100	124,25	127,47	116,38
<b>MW</b>	3805,27	4106,43	4125,30	3999,79	100	117,07	116,83	98,57
<b>SEM</b>	2331,67	2397,04	2401,34	2439,25		5,09	5,34	10,11

n	3	3	3	3	3	3	3	3
---	---	---	---	---	---	---	---	---

**Daten zur Abbildung 3.4 Toxizität von *Bet.*-APE, PPE<sub>1</sub> und PPF<sub>1</sub> auf BALB/c cDC**

lebende Zellen [%]								
Aktivierung cDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	LPS	LPS	LPS	LPS
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>1,0</b>	<b>2,5</b>	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>1,0</b>	<b>2,5</b>
V1	86,05	86,33	88,63	83,61	95,63	96,98	95,39	95,01
V2	94,8				90,83	89,455	90,315	86,7
V3	95,315	94,055	93,665	91,26	97,12		96,83	95,39
V4	90,29				96,18	96,465	96,25	95,075
V5	94,42				91,635	88,355	88,285	85,905
V6					93,075	91,21	91,46	90,73
MW	92,18	90,19	91,15	87,44	94,08	92,49	93,09	91,47
SEM	1,59	2,73	1,78	2,70	0,97	1,60	1,32	1,63
n	5	2	2	2	6	5	6	6
Aktivierung cDC	CpG	CpG	CpG	CpG				
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	<b>0,0</b>	<b>0,3</b>	<b>1,0</b>	<b>2,5</b>				
V1	92,045	93,4	90,11	92,705				
V2	89,775	88,275	89,28	89,71				
V3	94,29		95,065	94,475				
V4	95,08	95,385	95,76	94,915				
V5	84,985	83,79	87,255	86,295				
V6	88,345	89,545	91,145	91,045				
MW	90,75	90,08	91,44	91,52				
SEM	1,42	1,81	1,25	1,21				
n	6	5	6	6				
Aktivierung cDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	LPS	LPS	LPS	LPS
PPE <sub>1</sub> [M]	<b>0,0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>0,0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>
V1	94,97	96,59	97,195	91,87	94,365	93,735	95,02	93,17
V2	81,915		75,965	83,39	89,915		88,05	82,23
V3	93,83				92,94	92,68	92,22	92,23
V4	94,42	93,195	92,035	92,815	93,075	91,24	92,185	91,79
MW	91,28	94,89	88,40	89,36	92,57	92,55	91,87	89,86
SEM	2,71	1,20	5,22	2,45	0,82	0,59	1,24	2,22
n	4	2	3	3	4	3	4	4
Aktivierung cDC	CpG	CpG	CpG	CpG				
PPE <sub>1</sub> [M]	<b>0,0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>				
V1	92,045	90,77	92,635	88,275				
V2	79,935		81,84	73,27				
V3	88,08	90,55	89,98	87,735				
V4	88,345	90,835	90,685	92,225				
MW	87,10	90,72	88,79	85,38				
SEM	2,21	0,07	2,06	3,60				
n	4	3	4	4				

Aktivierung cDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	LPS	LPS	LPS	LPS
PPF <sub>1</sub> [M]	0,0	10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>	0,0	10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>
V1	94,42	93,56	93,055	93,5		92,135	93,285	90,72
V2					93,075	91,11	91,395	91,385
MW	94,42	93,56	93,06	93,50	93,08	91,62	92,34	91,05
SEM					SEM	0,36	0,67	0,24
n	1	1	1	1	1	2	2	2

Aktivierung cDC	CpG	CpG	CpG	CpG
PPF <sub>1</sub> [M]	0,0	10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	10 <sup>-5</sup>
V1		90,455	91,205	88,34
V2	88,345	90,23	90,405	88,84
MW	88,35	90,34	90,81	88,59
SEM		0,08	0,28	0,18
n	2	2	2	2

### Daten zur Abbildung 3.5 A Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf BALB/c cDC

MFI CD86								
Aktivierung cDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	LPS	LPS	LPS	LPS
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	0	0,3	1	2,5	0	0,3	1	2,5
V1	190,48				462,34	468,8	424,88	400,46
V2	221,33	197,22	197,61	170,75	574	558,15	529,69	432,93
V3	177,28				651,43		567,43	455,76
V4	188,52	182,86	210,62	220,24	559,15	580,09	533,61	447,03
V5	113,3				498,95	526,83	519,88	463,06
V6					340,06	300,63	313,3	274,49
MW	178,18	190,04	204,12	195,50	514,32	486,90	481,47	412,29
SEM	15,91	5,08	4,60	17,50	40,03	44,89	35,51	26,47
n	5	2	2	2	6	5	6	6

Aktivierung cDC	CpG	CpG	CpG	CpG
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	0	0,3	1	2,5
V1	360,59	367,21	362,34	338,85
V2	406,27	420,23	424,65	357,61
V3	461,05		437,78	400,46
V4	476,58	494,7	490,9	433,12
V5	444,68	477	452,03	375,23
V6	242,26	236,19	262,76	237,61
MW	398,57	399,07	405,08	357,15
SEM	32,51	41,57	30,32	25,05
n	6	5	6	6

Aktivierung cDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	LPS	LPS	LPS	LPS
PPE <sub>1</sub> [M]	0	3×10 <sup>-7</sup>	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	0	3×10 <sup>-7</sup>	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>
V1	122,64	109,58	104,9	137,83	462,34	483,96	470,98	406,88

V2	176,98		194,21	177,94	521,69		495,49	468,64
V3	188,52				498,95	467,81	471,93	452,78
V4	113,3	112,31	110,01	118,82	340,06	303,39	307,05	282,84
MW	150,36	110,95	136,37	144,86	455,76	418,39	436,36	402,79
SEM	33,46	0,97	23,64	14,23	35,04	47,10	37,65	36,43
n	4	2	3	3	4	3	4	4
Aktivierung cDC	CpG	CpG	CpG	CpG				
PPE <sub>1</sub> [M]	0	3×10 <sup>-7</sup>	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>				
V1	360,59	374,28	346,19	332,7				
V2	402,58		413,46	398,05				
V3	444,68	355,88	342,9	342,25				
V4	242,26	204,84	207,76	205,72				
MW	362,53	311,67	327,58	319,68				
SEM	79,99	43,83	37,34	35,18				
n	4	3	4	4				
Aktivierung cDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	LPS	LPS	LPS	LPS
PPF <sub>1</sub> [M]	0	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	1×10 <sup>-5</sup>	0	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	1×10 <sup>-5</sup>
V1	113,3	94,35	104,59	103,22	498,95	493,49	477,39	491,2
V2					340,06	319,84	323,59	323,36
MW	113,30	94,35	104,59	103,22	419,51	406,67	400,49	407,28
SEM					56,18	61,39	54,38	59,34
n	1	1	1	1	2	2	2	2
Aktivierung cDC	CpG	CpG	CpG	CpG				
PPF <sub>1</sub> [M]	0	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	1×10 <sup>-5</sup>				
V1	444,68	349,08	357,94	369,48				
V2	242,26	216,17	216,18	209,46				
MW	343,47	282,63	287,06	289,47				
SEM	71,57	46,99	50,12	56,58				
n	2	2	2	2				

### Daten zur Abbildung 3.5 B Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf BALB/c cDC

MFI CD80								
Aktivierung cDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	LPS	LPS	LPS	LPS
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	0,3	1	2,5	0	0,3	1	2,5
V1	466,22	518,06	471	228,25	221,33	259,68	222,01	187,18
V2	440,99				1093,19	38,07	72,56	746,06
V3	295,92	313,45	384,19	350,88	1212,36		1183,36	853,23
V4	1235,3				1007,55	1085,43	997,33	865,03
V5	960,59				2564,04	2977,11	3050,88	2591,46
V6					2496,75	2077,09	2255,72	1960,57
MW	679,80	415,76	427,60	289,57	1432,54	1287,48	1296,98	1200,59
SEM	159,68	72,34	30,69	43,36	342,54	495,44	433,10	332,45

n	5	2	2	2	6	5	6	6
---	---	---	---	---	---	---	---	---

Aktivierung cDC	CpG	CpG	CpG	CpG
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
V1	206,11	110,62	193,8	201,71
V2	988,08	60,22	697,68	277,35
V3	948,2		1118,54	1027,85
V4	905,93	1086,12	1022,21	932,19
V5	2406,2	2616,35	2493,38	2233,56
V6	1874,2	1723,63	1909,28	1822,97
<b>MW</b>	<b>1221,45</b>	<b>1119,39</b>	<b>1239,15</b>	<b>1082,61</b>
<b>SEM</b>	<b>292,94</b>	<b>435,73</b>	<b>310,45</b>	<b>303,81</b>
n	6	5	6	6

Aktivierung cDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	LPS	LPS	LPS	LPS
<b>PPE<sub>1</sub> [M]</b>	<b>0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>
V1	75,23	71,08	64,85	71,13	221,33	263,77	142,29	164,69
V2	82,25		318,66	283,72	579,62		124,74	91,95
V3	1235,3				2564,04	2511,33	2659,67	2524,74
V4	960,59	897,33	864,42	928,18	2496,75	2150,46	2106,21	2030,09
<b>MW</b>	<b>588,34</b>	<b>484,21</b>	<b>415,98</b>	<b>427,68</b>	<b>1465,44</b>	<b>1641,85</b>	<b>1258,23</b>	<b>1202,87</b>
<b>SEM</b>	<b>259,39</b>	<b>292,12</b>	<b>192,60</b>	<b>210,38</b>	<b>536,37</b>	<b>568,99</b>	<b>570,81</b>	<b>544,49</b>
n	4	2	3	3	4	3	4	4

Aktivierung cDC	CpG	CpG	CpG	CpG
<b>PPE<sub>1</sub> [M]</b>	<b>0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>
V1	206,11	176,00	157,06	186,04
V2	254,32		104,92	49,03
V3	2406,2	1959,72	1994,61	2038,72
V4	1874,2	1511,65	1541,85	1485,88
<b>MW</b>	<b>1185,21</b>	<b>1215,79</b>	<b>949,61</b>	<b>939,92</b>
<b>SEM</b>	<b>486,74</b>	<b>437,43</b>	<b>417,16</b>	<b>423,34</b>
n	4	3	4	4

Aktivierung cDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	LPS	LPS	LPS	LPS
<b>PPF<sub>1</sub> [M]</b>	<b>0</b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>1×10<sup>-5</sup></b>	<b>0</b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>1×10<sup>-5</sup></b>
V1	1235,3				2564,04	2685,69	2473,65	2622,62
V2	960,59	731,67	833,45	829,75	2496,75	2355,72	2271,33	2379,93
<b>MW</b>	<b>1097,95</b>	<b>731,67</b>	<b>833,45</b>	<b>829,75</b>	<b>2530,40</b>	<b>2520,71</b>	<b>2372,49</b>	<b>2501,28</b>
<b>SEM</b>	<b>97,12</b>				<b>23,79</b>	<b>116,66</b>	<b>71,53</b>	<b>85,80</b>
n	2	1	1	1	2	2	2	2

Aktivierung cDC	CpG	CpG	CpG	CpG
<b>PPF<sub>1</sub> [M]</b>	<b>0</b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>1×10<sup>-5</sup></b>
V1	2406,2	2097,02	2083,53	2167,77
V2	1874,2	1654,55	1588,67	1543,76
<b>MW</b>	<b>2140,20</b>	<b>1875,79</b>	<b>1836,10</b>	<b>1855,77</b>
<b>SEM</b>	<b>188,09</b>	<b>156,44</b>	<b>174,96</b>	<b>220,62</b>

n	2	2	2	2
---	---	---	---	---

### Daten zur Abbildung 3.5 C Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf BALB/c cDC

MFI CD40								
Aktivierung cDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	LPS	LPS	LPS	LPS
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
V1	58,5	67,32	58,94	49,68	94,6	104,79	97,34	86,01
V2	56,98				177,23	224,79	175,69	134,15
V3	73,91	80,75	31,24	94,23	188,08		194,03	158,29
V4	24,63				225,56	239,63	181,18	185,44
V5	14,62				97,88	113,31	107,15	77,76
V6					64,51	49,43	49,58	40,41
MW	45,73	74,04	45,09	71,96	141,31	146,39	134,16	113,68
SEM	9,99	4,75	9,79	15,75	23,89	32,90	21,58	20,40
n	5	2	2	2	6	5	6	6
Aktivierung cDC	CpG	CpG	CpG	CpG				
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>				
V1	100,46	90,44	83,72	85,48				
V2	135,4	203	211,19	184,14				
V3	116,6		174,77	159,99				
V4	181,26	247,9	188,64	175,87				
V5	97,81	98,35	90,07	73,59				
V6	48,22	46,7	41,88	38,58				
MW	113,29	137,28	131,71	119,61				
SEM	16,46	33,75	25,56	22,86				
n	6	5	6	6				
Aktivierung cDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	LPS	LPS	LPS	LPS
PPE <sub>1</sub> [M]	<b>0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>
V1	23,38	21,41	21,23	24,87	94,6	111,78	111,96	93,07
V2	66,38		73,28	49,11	204,16		158	202,04
V3	24,63				97,88	102,32	101,39	89,79
V4	14,62	15,47	14,87	19,84	64,51	54,74	51,2	47,15
MW	32,25	18,44	36,46	31,27	115,29	89,61	105,64	108,01
SEM	10,04	2,10	15,11	7,38	26,47	14,41	18,98	28,61
n	4	2	3	3	4	3	4	4
Aktivierung cDC	CpG	CpG	CpG	CpG				
PPE <sub>1</sub> [M]	<b>0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>				
V1	100,46	100,14	81,69	89,6				
V2	135,79		214,54	203,2				
V3	97,81	84,51	84,09	81,35				
V4	48,22	46,08	46,76	43,15				

<b>MW</b>	95,57	76,91	106,77	104,33				
<b>SEM</b>	15,59	13,11	31,98	29,86				
<b>n</b>	4	3	4	4				
<b>Aktivierung cDC</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unb.</b>	<b>unb.</b>	<b>unb.</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>
<b>PPF<sub>1</sub> [M]</b>	<b>0</b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>1×10<sup>-5</sup></b>	<b>0</b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>1×10<sup>-5</sup></b>
<b>V1</b>	14,62	13,6	14,07	14,85	97,88	108,3	103,1	99,62
<b>V2</b>					64,51	61,59	60,57	61,45
<b>MW</b>	14,62	13,60	14,07	14,85	81,20	84,95	81,84	80,54
<b>SEM</b>					11,80	16,51	15,04	13,50
<b>n</b>	1	1	1	1	2	2	2	2
<b>Aktivierung cDC</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>				
<b>PPF<sub>1</sub> [M]</b>	<b>0</b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>1×10<sup>-5</sup></b>				
<b>V1</b>	97,81	94,72	86,65	94,11				
<b>V2</b>	48,22	49,78	48,65	42,21				
<b>MW</b>	73,02	72,25	67,65	68,16				
<b>SEM</b>	17,53	15,89	13,44	18,35				
<b>n</b>	2	2	2	2				

#### Daten zur Abbildung 3.5 D Analyse der Expression von Oberflächenmarkern auf BALB/c cDC

<b>MFI MHC Klasse II</b>								
<b>Aktivierung cDC</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unb.</b>	<b>unb.</b>	<b>unb.</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
<b>V1</b>	729,81	815,96	717,49	443,43	395,31	419,48	407,54	508,34
<b>V2</b>	944,44				866,71	634,71	603,25	657,74
<b>V3</b>	868,28	927,87	1036,85	981,47	929,72		970,61	951,29
<b>V4</b>	591,69				1367,55	1252,36	1274,81	1358,84
<b>V5</b>	510,45				627,92	720,72	730,67	719,83
<b>V6</b>					719,92	635,2	639,86	613,37
<b>MW</b>	728,93	871,92	877,17	712,45	817,86	732,49	771,12	801,57
<b>SEM</b>	72,78	39,57	112,91	190,23	150,18	196,83	162,06	163,59
<b>n</b>	5	2	2	2	6	5	6	6
<b>Aktivierung cDC</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>				
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>				
<b>V1</b>	456,47	250,29	368,94	459,73				
<b>V2</b>	780,65	721,47	796,17	735,11				
<b>V3</b>	1146,48		1000,72	974,32				
<b>V4</b>	1417,98	1036,53	1198,22	1300,35				
<b>V5</b>	625,35	727,09	707,29	723,54				
<b>V6</b>	635,89	630,75	651,98	632,14				
<b>MW</b>	843,80	673,23	787,22	804,20				
<b>SEM</b>	166,62	178,30	151,70	155,39				

n	6	5	6	6				
Aktivierung cDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	LPS	LPS	LPS	LPS
PPE <sub>1</sub> [M]	0	3×10 <sup>-7</sup>	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	0	3×10 <sup>-7</sup>	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>
V1	349,07	60,95	407,59	489,25	395,31	439,98	281,55	213,14
V2	397,61		412,16	435,9	560,99		594,53	511,95
V3	591,69				627,92	649,78	683,01	671,39
V4	510,45	441,36	441,33	443,74	719,92	616,59	602,67	565,32
MW	462,21	251,16	420,36	456,30	576,04	568,78	540,44	490,45
SEM	38,77	85,06	6,10	9,60	59,31	53,16	76,71	85,04
n	4	2	3	3	4	3	4	4
Aktivierung cDC	CpG	CpG	CpG	CpG				
PPE <sub>1</sub> [M]	0	3×10 <sup>-7</sup>	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>				
V1	456,47	369,05	257,2	447,74				
V2	603,18		563,41	729,03				
V3	625,35	576,91	610,01	649,85				
V4	635,89	522,07	555,86	530,94				
MW	580,22	489,34	496,62	589,39				
SEM	36,21	50,78	69,89	53,99				
n	4	3	4	4				
Aktivierung cDC	unbehandelt	unb.	unb.	unb.	LPS	LPS	LPS	LPS
PPF <sub>1</sub> [M]	0	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	1×10 <sup>-5</sup>	0	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	1×10 <sup>-5</sup>
V1	591,69				627,92	653,72	599,17	654,46
V2	510,45	385,3	419,91	400,34	719,92	700,31	689,31	736,69
MW	551,07	385,30	419,91	400,34	673,92	677,02	644,24	695,58
SEM	28,72				32,53	16,47	31,87	29,07
n	2	1	1	1	2	2	2	2
Aktivierung cDC	CpG	CpG	CpG	CpG				
PPF <sub>1</sub> [M]	0	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	1×10 <sup>-5</sup>				
V1	625,35	631,37	666,02	652,95				
V2	635,89	548,54	536,84	532,3				
MW	630,62	589,96	601,43	592,63				
SEM	3,73	29,28	45,67	42,66				
n	2	2	2	2				

**Daten zur Abbildung 3.6 A Einfluss von von *Bet.*-APE, PPE<sub>1</sub> und PPF<sub>1</sub> auf die Sekretion von LPS oder CpG 2216 induzierten Zytokinen aus BALB/c cDC**

IL-12p70 [pg/ml]

Aktivierung cDC	LPS	LPS	LPS	LPS	CpG	CpG	CpG	CpG
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	0	0,3	1	2,5	0	0,3	1	2,5
V1	518,56	282,27	30,00	21,14	4270,97	2648,35	818,56	130,77
V2	472,89	280,04	204,94	171,62	5912,67	1136,36	302,16	2608,93
V3	162,10	116,48	83,00	66,18	6626,22	4320,44	1511,75	271,72
V4	149,08	105,19	45,33	24,08	1802,05	1160,23	340,16	77,60



<b>MW</b>	325,66	195,99	90,82	70,76	4652,98	2316,34	743,16	772,25
<b>SEM</b>	85,45	42,63	34,33	30,45	927,17	654,58	244,09	531,39
<b>n</b>	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>Aktivierung cDC</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>PPE<sub>1</sub> [M]</b>	<b>0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>
<b>V1</b>	799,84	617,79	590,92	299,84	4841,61	4564,42	3476,36	1545,91
<b>V2</b>					2685,01	3732,84	2663,34	1429,43
<b>V3</b>	379,97	248,86	242,94	171,76	6887,21	6278,41	5003,82	2509,97
<b>V4</b>	135,83	135,03	161,93	61,59	4846,17	4947,92	3806,99	884,02
<b>MW</b>	438,55	333,90	331,93	177,73	4815,00	4880,90	3737,63	1592,33
<b>SEM</b>	158,32	118,96	107,44	56,21	742,99	459,33	420,59	292,88
<b>n</b>	3	3	3	3	4	4	4	4
<b>Aktivierung cDC</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>PPF<sub>1</sub> [M]</b>	<b>0</b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>1×10<sup>-5</sup></b>	<b>0</b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>1×10<sup>-5</sup></b>
<b>V1</b>	135,83	137,64	151,20	137,95	4846,17	4635,34	5378,13	3737,54
<b>V2</b>	2307,87	1181,52	802,97	515,46	10435,55	6987,89	6056,69	5011,60
<b>V3</b>	816,77	766,03	770,72	782,83	3167,67	2643,59	2758,81	2918,39
<b>V4</b>	2198,32	2150,08	1965,78	1825,29	12143,84	13231,56	9886,55	10520,11
<b>V5</b>					8437,22	7344,00	6424,95	6395,38
<b>MW</b>	1364,70	1058,82	922,67	815,38	7806,09	6968,48	6101,03	5716,60
<b>SEM</b>	460,63	365,74	327,94	313,23	1502,06	1593,94	1022,35	1196,30
<b>n</b>	4	4	4	4	5	5	5	5

**IL-12p70 [%] normiert**

<b>Aktivierung cDC</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
<b>V1</b>	100,00	54,43	5,79	4,08	100,00	62,01	19,17	3,06
<b>V2</b>	100,00	59,22	43,34	36,29	100,00	44,12	19,22	5,11
<b>V3</b>	100,00	71,86	51,20	40,83	100,00	65,20	22,81	4,10
<b>V4</b>	100,00	70,56	30,41	16,15	100,00	64,38	18,88	4,31
<b>MW</b>	100,00	64,02	32,69	24,34	100,00	58,93	20,02	4,15
<b>SEM</b>		3,70	8,61	7,47		4,31	0,81	0,37
<b>n</b>	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>Aktivierung cDC</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>PPE<sub>1</sub> [M]</b>	<b>0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>
<b>V1</b>	100,00	77,24	73,88	37,49	100,00	94,27	71,80	31,93
<b>V2</b>					100,00	139,02	99,19	53,24
<b>V3</b>	100,00	65,50	63,94	45,20	100,00	91,16	72,65	36,44
<b>V4</b>	100,00	99,41	119,21	45,34	100,00	102,10	78,56	18,24
<b>MW</b>	100,00	80,72	85,68	42,68	100,00	106,64	80,55	34,96
<b>SEM</b>		8,12	13,89	2,12		9,56	5,54	6,25
<b>n</b>	3	3	3	3	4	4	4	4
<b>Aktivierung cDC</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>PPF<sub>1</sub> [M]</b>	<b>0</b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>1×10<sup>-5</sup></b>	<b>0</b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>1×10<sup>-5</sup></b>
<b>V1</b>	100,00	101,33	111,31	101,56	100,00	95,65	110,98	77,12

V2	100,00	51,20	34,79	22,33	100,00	66,96	58,04	48,02
V3	100,00	93,79	94,36	95,85	100,00	83,46	87,09	92,13
V4	100,00	97,81	89,42	83,03	100,00	108,96	81,41	86,63
V5					100,00	87,04	76,15	75,80
MW	100,00	86,03	82,47	75,69	100,00	88,41	82,73	75,94
SEM		10,14	14,35	15,76		6,20	7,67	6,80
n	4	4	4	4	5	5	5	5

**Daten zur Abbildung 3.6 B Einfluss von von *Bet.*-APE, PPE<sub>1</sub> und PPF<sub>1</sub> auf die Sekretion von LPS oder CpG 2216 induzierten Zytokinen aus BALB/c cDC**

**IL-10 [pg/ml]**

Aktivierung cDC	LPS	LPS	LPS	LPS	CpG	CpG	CpG	CpG
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	0	0,3	1	2,5	0	0,3	1	2,5
V1	31,23	45,16	69,94	95,21	70,20	62,01	47,80	52,05
V2	25,94	44,07	50,05	36,57	62,69	51,79	34,51	33,35
V3	31,97	46,06	61,52	38,61	21,67	19,85	8,10	2,60
V4					67,98	40,51	31,30	14,91
MW	29,71	45,10	60,50	56,80	55,63	43,54	30,43	25,72
SEM	1,34	0,41	4,08	13,59	9,90	7,82	7,15	9,36
n	3	3	3	3	4	4	4	4
Aktivierung cDC	LPS	LPS	LPS	LPS	CpG	CpG	CpG	CpG
PPE <sub>1</sub> [M]	0	3×10 <sup>-7</sup>	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	0	3×10 <sup>-7</sup>	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>
V1								
V2	nicht detektierbar				nicht detektierbar			
V3								
Aktivierung cDC	LPS	LPS	LPS	LPS	CpG	CpG	CpG	CpG
PPF <sub>1</sub> [M]	0	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	1×10 <sup>-5</sup>	0	1×10 <sup>-6</sup>	3×10 <sup>-6</sup>	1×10 <sup>-5</sup>
V1	211,85	315,46	120,19	66,75	263,08	377,08	202,06	193,45
V2	168,65	242,79	221,09	202,16	143,91	138,44	65,84	155,41
V3					67,98	61,10	51,50	64,92
MW	190,25	279,12	170,64	134,45	158,32	192,20	106,47	137,92
SEM		25,69	35,67	47,88		77,65	39,17	31,12
n	2	2	2	2	3	3	3	3

**IL-10 [%] normiert**

Aktivierung cDC	LPS	LPS	LPS	LPS	CpG	CpG	CpG	CpG
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	0	0,3	1	2,5	0	0,3	1	2,5
V1	100,00	144,62	223,97	304,88	100,00	88,33	68,09	74,14
V2	100,00	169,85	192,93	140,97	100,00	82,62	55,05	53,19
V3	100,00	144,06	192,40	120,75	100,00	91,62	37,39	11,98
V4					100,00	59,59	46,04	21,93
MW	100,00	152,84	203,10	188,87	100,00	80,54	51,64	40,31
SEM		6,94	8,52	47,60		6,26	5,68	12,38



**IL-6 [%] normiert**

Aktivierung cDC	LPS	LPS	LPS	LPS	CpG	CpG	CpG	CpG
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
V1	100,00	139,19	119,04	33,83	100,00	103,61	256,19	222,16
V2	100,00	118,98	108,68	39,50	100,00	101,83	95,98	77,72
V3	100,00	106,00	81,60	42,40	100,00	99,80	88,00	97,80
V4	100,00	125,87	139,79	62,22	100,00	71,70	71,27	83,99
MW	100,00	122,51	112,28	44,49	100,00	94,23	127,86	120,42
SEM		5,99	10,48	5,35		6,54	37,31	29,60
n	4	4	4	4	4	4	4	4
Aktivierung cDC	LPS	LPS	LPS	LPS	CpG	CpG	CpG	CpG
<b>PPE<sub>1</sub> [M]</b>	<b>0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>0</b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>
V1	100,00	138,54	100,30	92,86	100,00	95,83	88,61	83,19
V2	100,00	86,88	91,34	92,18	100,00	62,67	48,72	48,37
V3	100,00	112,21	106,11	91,41	100,00	116,98	105,91	112,49
V4	100,00	73,25	79,18	67,53	100,00	84,19	89,55	95,13
MW	100,00	102,72	94,23	86,00	100,00	89,92	83,20	84,79
SEM		12,48	5,08	5,34		9,82	10,53	11,73
n	4	4	4	4	4	4	4	4
Aktivierung cDC	LPS	LPS	LPS	LPS	CpG	CpG	CpG	CpG
<b>PPF<sub>1</sub> [M]</b>	<b>0</b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>1×10<sup>-5</sup></b>	<b>0</b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>3×10<sup>-6</sup></b>	<b>1×10<sup>-5</sup></b>
V1	100,00	78,67	72,63	77,74	100,00	78,37	84,57	81,80
V2	100,00	110,70	100,57	104,36	100,00	203,63	210,69	218,22
MW	100,00	94,69	86,60	91,05	100,00	141,00	147,63	150,01
SEM		11,32	9,88	9,41		44,28	44,59	48,23
n	2	2	2	2	2	2	2	2

**Daten zur Abbildung 3.7 Sekretion von LPS oder CpG 2216 induzierten Zytokinen aus cDC nach Stimulation mit PGE<sub>2</sub>**

**IL-12p70 [pg/ml]**

Aktivierung cDC	LPS	LPS	LPS	LPS	CpG	CpG	CpG	CpG
<b>PGE<sub>2</sub> [M]</b>	<b>0</b>	<b>1×10<sup>-7</sup></b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>	<b>0</b>	<b>1×10<sup>-7</sup></b>	<b>3×10<sup>-7</sup></b>	<b>1×10<sup>-6</sup></b>
V1	2392,91	50,94	83,05	174,84	661,63	2425,61	1404,90	1558,31
V2	816,77	233,53	67,90	49,21	3167,67	3329,13	2961,02	2827,96
V3	2198,32	130,52	0,00	0,00	12143,84	8943,31	7358,74	7620,40
V4	1124,84	0,00	0,00	26,75	1584,87	2647,91	2371,41	1365,22
V5					9342,44	4225,83	4163,71	3572,58
V6					2593,55	2470,06	2471,38	2313,63
MW	1633,21	103,75	37,74	62,70	4915,67	4006,97	3455,19	3209,68
SEM	337,41	44,10	19,06	33,52	1743,89	936,67	787,58	860,62
n	4	4	4	4	6	6	6	6
<b>IL-12p70 [%] normiert</b>								
V1	100,00	2,13	3,47	7,31	100,00	366,61	212,34	235,53



IL-10 [pg/ml]								
V1	39,48	46,43	75,11	93,15	53,88	34,68	22,11	12,67
V2		nicht detektierbar			37,93	20,52	11,43	0,00
V3		nicht detektierbar			140,93	77,90	60,30	39,12
MW	39,48	46,43	75,11	93,15	77,58	44,36	31,28	17,27
SEM						14,09	12,11	9,41
n	1	1	1	1	3	3	3	3
IL-10 [%] normiert								
V1	100,00	117,62	190,27	235,97	100,00	64,36	41,02	23,52
V2					100,00	54,09	30,13	0,00
V3					100,00	55,27	42,79	27,76
MW	100,00	117,62	190,27	235,97	100,00	57,91	37,98	17,09
SEM						2,65	3,23	7,05
n	1	1	1	1	3	3	3	3
IL-6 [pg/ml]								
V1	44125	42525	33875	21025	29900	22050	16600	8466
V2	46133	47133	39167	21267	28200	25333	24067	9448
V3	18350	15550	11451	4755	12875	14100	12425	5922
MW	36203	35069	28164	15682	23658	20494	17697	7945
SEM	7304	8042	6936	4461	4420	2723	2780	858
n	3	3	3	3	3	3	3	3
IL-6 [%] normiert								
V1	100,00	96,37	76,77	47,65	100,00	73,75	55,52	28,32
V2	100,00	102,17	84,90	46,10	100,00	89,83	85,34	33,50
V3	100,00	84,74	62,40	25,91	100,00	109,51	96,50	45,99
MW	100,00	94,43	74,69	39,89	100,00	91,03	79,12	35,94
SEM		4,18	5,37	5,72		8,44	9,99	4,28
n	3	3	3	3	3	3	3	3

### Fortsetzung Daten zu Abbildung 3.8

C57BL/6 IL-10 k.o.

IL-12p70 [pg/ml]

Aktivierung cDC	LPS	LPS	LPS	LPS	CpG	CpG	CpG	CpG
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	0,3	1	2,5	0	0,3	1	2,5
V1	6166,02	3559,28	1076,19	137,10	22000,00	9617,02	2071,24	191,30
SD V1	1023,89	1004,29	536,21	119,03	4261,39	2075,17	600,17	255,66
n	1	1	1	1	1	1	1	1
IL-12p70 [%] normiert								
V1	100,00	57,72	17,45	2,22	100,00	43,71	9,41	0,87
n	1	1	1	1	1	1	1	1
IL-10 [pg/ml]								
	nicht detektierbar				nicht detektierbar			
IL-6 [pg/ml]								
V1	90500	116000	65700	57600	56700	46700	33900	13100

<b>SD V1</b>	3328	10500	3492	7492	1909	2068	2774	1559
<b>n</b>	1	1	1	1	1	1	1	1
<b>IL-6 [%] normiert</b>								
<b>V1</b>	100,00	128,18	72,60	63,65	100,00	82,36	59,79	23,10
<b>n</b>		1	1	1	1	1	1	1

**Daten zur Abbildung 3.9 Proliferationsmessung von allogener MLR (BALB/c T Zellen mit C57BL/6 cDC)**

DC-T Zell-Ratio	DC Behandlung		Zellteilungen pro 10.000 Zellen			MW	SD
	Aktivierung DC	Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	M1	M2	M3		
1:300	unbehandelt	0,0	6263	6698	5462	6141	511,71
1:100	unbehandelt	0,0	12348	15709	11194	13084	1915,35
1:30	unbehandelt	0,0	22566	23172	27475	24404	2185,43
1:10	unbehandelt	0,0	32118	36200	33056	33792	1745,84
1:5	unbehandelt	0,0	33896	34542	34368	34269	272,63
1:300	unbehandelt	1,0	5227	6523	5642	5798	540,45
1:100	unbehandelt	1,0	13512	11505	12663	12560	822,79
1:30	unbehandelt	1,0	25664	26569	24206	25480	973,56
1:10	unbehandelt	1,0	32828	32928	33617	33124	350,85
1:5	unbehandelt	1,0	34012	35764	37181	35652	1296,24
1:300	LPS	0,0	3990	3909	6504	4801	1204,61
1:100	LPS	0,0	11711	11244	11511	11489	191,42
1:30	LPS	0,0	18141	21487	20641	20089	1420,59
1:10	LPS	0,0	23817	29667	28500	27328	2528,15
1:5	LPS	0,0	25183	28470	25443	26365	1491,84
1:300	LPS	1,0	3076	6867	6462	5468	1699,78
1:100	LPS	1,0	17725	12461	11211	13799	2822,91
1:30	LPS	1,0	26600	21055	23594	23750	2266,50
1:10	LPS	1,0	28086	21031	32478	27198	4715,33
1:5	LPS	1,0	29335	23081	27240	26552	2598,90
1:300	CpG	0,0	3850	5760	5795	5135	908,43
1:100	CpG	0,0	9818	11312	9365	10165	831,79
1:30	CpG	0,0	15860	18557	22341	18919	2657,99
1:10	CpG	0,0	18677	22122	24883	21894	2538,89
1:5	CpG	0,0	17444	21056	20031	19510	1520,04
1:300	CpG	1,0	6410	6527	4626	5855	869,78
1:100	CpG	1,0	11978	14206	11657	12614	1133,81
1:30	CpG	1,0	21042	20838	22981	21620	965,54
1:10	CpG	1,0	27023	23010	22283	24105	2084,32
1:5	CpG	1,0	25361	26352	21659	24457	2019,74

T Zell-Kontrolle	-	-	801	840	821	19,28
------------------	---	---	-----	-----	-----	-------

### Daten zur Abbildung 3.10 Intrazelluläre Zytokinbestimmung in CD4<sup>+</sup> T Zellen nach allogener MLR mit cDC

IFN- $\gamma$		Versuch 1 (V1)		BALB/c T Zellen			
Stamm DC		C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Aktivierung		unbehandelt	unbehandelt	LPS	LPS	CpG	CpG
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])		0	1,0	0	1,0	0	1,0
Messwert (M) 1		3,38	3,39	7,57	2,93	4,19	4,84
M2		2,65	2,03	3,97	2,84	4,76	7,50
M3		2,34	2,00	4,45	3,27	6,30	6,09
M4		2,19	2,75	4,34	3,92	7,91	7,65
M5		4,13	4,07	4,64	3,56	7,14	5,59
M6		2,35	4,85	5,69	3,02	6,53	4,38
M7		3,66	4,69	3,85	3,70	4,64	4,14
M8		3,44	2,58	6,50	3,82	8,59	4,24
Mittelwert (MW) V1		3,02	3,30	5,13	3,38	6,55	5,55
Standardabweichung (SD) V1		0,68	1,06	1,25	0,40	1,38	1,33
n		8	8	8	8	7	8
IFN- $\gamma$		Versuch 2		BALB/c T Zellen			
Stamm DC		C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Aktivierung		unbehandelt	unbehandelt	LPS	LPS	CpG	CpG
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])		0	1,0	0	1,0	0	1,0
M1		2,59	2,13	1,86	2,14	4,01	2,94
M2		1,76	2,58	1,49	2,07	6,51	3,42
M3		2,03	2,36	1,68	1,74	5,65	2,45
M4		3,76	1,50	1,98	2,22	5,30	2,97
M5		2,50	2,20	2,52	2,12	6,89	2,62
M6		1,78	1,38	2,66	1,90	5,58	2,94
M7		1,42	1,93	2,48	1,60	3,77	3,18
M8		1,50	1,44	1,36	1,71	3,08	2,73
MW V2		2,17	1,94	2,00	1,94	5,10	2,91
SD V2		0,72	0,43	0,46	0,22	1,27	0,29
n		8	8	8	8	8	8
IFN- $\gamma$		Versuch 3		BALB/c T Zellen			
Stamm DC		C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Aktivierung		unbehandelt	unbehandelt	LPS	LPS	CpG	CpG
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])		0	1,0	0	1,0	0	1,0
M1		1,32	1,16	2,52	1,23	3,23	1,65
M2		1,65	1,01	2,33	1,55	1,54	1,51
M3		0,37	0,90	2,17	0,86	2,06	0,46
M4		0,69	0,93	1,69	0,47	1,07	0,45
M5		1,74	1,59	1,43	0,84	0,87	0,32
M6		0,52	0,82	1,79	1,17	1,03	0,80
M7		1,01	0,64	1,38	0,89	2,65	1,20



<b>M8</b>	0,76	0,39	3,00	0,89	2,03	1,51
<b>MW V3</b>	1,01	0,93	2,04	0,99	1,81	1,17
<b>SD V3</b>	0,48	0,33	0,53	0,30	0,79	0,47
<b>n</b>	8	8	8	8	8	6

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Versuche gesamt</b>		<b>BALB/c T Zellen</b>			
<b>Stamm DC</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>
<b>MW V1</b>	3,02	3,30	5,13	3,38	6,55	5,55
<b>MW V2</b>	2,17	1,94	2,00	1,94	5,10	2,91
<b>MW V3</b>	1,01	0,93	2,04	0,99	1,81	1,17
<b>MW ges</b>	2,06	2,06	3,06	2,10	4,49	3,21
<b>SEM ges</b>	0,41	0,48	0,73	0,49	0,99	0,90

FACS-Färbung nicht optimal -> Wert nicht berücksichtigt

### Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.10

<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Versuch 1</b>		<b>C57BL/6 T Zellen</b>			
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>
<b>M1</b>	4,14	3,61	5,39	3,29	7,89	5,71
<b>M2</b>	4,50	4,86	4,73	4,13	5,62	3,83
<b>M3</b>	8,26	3,42	2,88	3,10	5,03	5,69
<b>M4</b>	3,83	3,99	4,08	4,47	4,69	7,38
<b>M5</b>	4,21	2,25	4,37	4,31	6,21	6,19
<b>M6</b>	3,68	1,10	3,42	4,01	6,61	5,70
<b>M7</b>	5,80	3,42	3,96	3,97	6,15	4,43
<b>M8</b>	4,22	1,72	3,23	3,72	5,93	6,17
<b>MW V1</b>	4,83	3,05	4,01	3,88	6,02	5,64
<b>SD V1</b>	1,43	1,17	0,77	0,45	0,92	1,02
<b>n</b>	8	8	8	8	8	8
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Versuch 2</b>		<b>C57BL/6 T Zellen</b>			
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>
<b>M1</b>	3,05	4,53	5,14	6,73	9,61	5,81
<b>M2</b>	2,91	3,54	4,28	3,57	5,96	3,00
<b>M3</b>	1,35	2,36	2,50	2,58	7,53	1,90
<b>M4</b>	0,84	1,96	3,86	2,65	5,63	3,49
<b>M5</b>	5,51	1,64	4,77	9,34	5,90	5,64
<b>M6</b>	1,67	1,98	4,08	6,25	4,66	5,56
<b>M7</b>	5,00	2,95	3,09	3,67	4,19	7,51
<b>M8</b>	2,95	2,93	4,47	3,26	3,72	6,73
<b>MW V2</b>	2,91	2,74	4,02	4,76	5,90	4,96

<b>SD V2</b>	1,56	0,90	0,81	2,27	1,79	1,82
<b>n</b>	8	8	8	8	8	8

IFN- $\gamma$	Versuche gesamt		C57BL/6 T Zellen			
	BALB/c unbehandelt	BALB/c unbehandelt	BALB/c LPS	BALB/c LPS	BALB/c CpG	BALB/c CpG
Stamm DC Aktivierung Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>
<b>MW V1</b>	4,83	3,05	4,01	3,88	6,02	5,64
<b>MW V2</b>	2,91	2,74	4,02	4,76	5,90	4,96
<b>MW ges</b>	3,87	2,89	4,02	4,32	5,96	5,30
<b>SEM ges</b>	0,55	0,09	0,00	0,25	0,03	0,20

## Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.10

IL-4	Versuch 1		BALB/c T Zellen			
Stamm DC Aktivierung Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	C57BL/6 unbehandelt	C57BL/6 unbehandelt	C57BL/6 LPS	C57BL/6 LPS	C57BL/6 CpG	C57BL/6 CpG
	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>
<b>M1</b>	7,27	6,51	8,83	8,95	5,19	6,96
<b>M2</b>	5,01	3,51	8,38	5,95	4,72	5,06
<b>M3</b>	5,06	6,69	8,26	8,42	8,62	6,87
<b>M4</b>	5,26	9,37	6,63	8,12	5,50	5,49
<b>MW V1</b>	5,65	6,52	8,03	7,86	6,01	6,10
<b>SD V1</b>	0,94	2,07	0,83	1,14	1,53	0,83
<b>n</b>	4	4	4	4	4	4
IL-4	Versuch 2		BALB/c T Zellen			
Stamm DC Aktivierung Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	C57BL/6 unbehandelt	C57BL/6 unbehandelt	C57BL/6 LPS	C57BL/6 LPS	C57BL/6 CpG	C57BL/6 CpG
	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>
<b>M1</b>	8,15	6,53	5,51	6,92	9,81	16,83
<b>M2</b>	7,08	7,16	7,62	7,54	3,24	10,80
<b>M3</b>	4,37	3,41	4,27	4,03	6,72	10,34
<b>M4</b>	5,19	5,71	5,31	4,99	5,02	9,81
<b>MW V2</b>	4,29	4,29	4,17	4,67	6,20	11,95
<b>SD V2</b>	3,19	3,19	3,46	2,99	2,42	2,84
<b>n</b>	4	4	4	4	4	4
IL-4	Versuch 3		BALB/c T Zellen			
Stamm DC Aktivierung Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	C57BL/6 unbehandelt	C57BL/6 unbehandelt	C57BL/6 LPS	C57BL/6 LPS	C57BL/6 CpG	C57BL/6 CpG
	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>
<b>M1</b>	2,73	6,91	2,7	3,02	2,58	0,21
<b>M2</b>	1,56	4,89	1,54	3,47	0,8	2,48
<b>M3</b>	2,6	5,01	2,3	2,81	2,53	3,38
<b>M4</b>	1,71	5,69	2,66	1,22	3,78	0,66
<b>MW V3</b>	2,15	5,63	2,30	2,63	2,42	1,68

<b>SD V3</b>	0,52	0,80	0,47	0,85	1,06	1,30
<b>n</b>	4	4	4	4	4	4

<b>IL-4</b>	<b>Versuch gesamt</b>		<b>BALB/c T Zellen</b>			
<b>Stamm DC</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>
<b>MW V1</b>	5,65	6,52	8,03	7,86	6,01	6,10
<b>MW V2</b>	4,29	4,29	4,17	4,67	6,20	11,95
<b>MW V3</b>	2,15	5,63	2,30	2,63	2,42	1,68
<b>MW ges</b>	4,03	5,48	4,83	5,05	4,88	6,57
<b>SEM ges</b>	0,72	0,46	1,19	1,08	0,87	2,10

## Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.10

<b>IL-4</b>	<b>Versuch 1</b>		<b>C57BL/6 T Zellen</b>			
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>
<b>M1</b>	2,76	1,87	2,56	2,42	0,78	2,56
<b>M2</b>	0,46	1,49	0,26	3,25	0,39	2,07
<b>M3</b>	0,52	2,43	0,29	0,73		1,87
<b>M4</b>	1,98	1,22	1,67	1,24	1,02	1,55
<b>MW V1</b>	1,43	1,75	1,20	1,91	0,73	2,01
<b>SD V1</b>	0,98	0,45	0,97	0,99	0,26	0,37
<b>n</b>	4	4	4	4	3	4
<b>IL-4</b>	<b>Versuch 2</b>		<b>C57BL/6 T Zellen</b>			
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>
<b>M1</b>	1,5	1,64	1,27	1,02	0,61	0,28
<b>M2</b>	0,64	0,63	1,19	0,17	0,04	0,47
<b>M3</b>	0,29	0,36	0,96	1,03		0,2
<b>M4</b>	0,79	0,39	0,57	0,41		0,15
<b>MW V2</b>	0,81	0,76	1,00	0,66	0,33	0,28
<b>SD V2</b>	0,44	0,52	0,27	0,38	0,29	0,12
<b>n</b>	4	4	4	4	2	4

<b>IL-4</b>	<b>Versuch gesamt</b>		<b>C57BL/6 T Zellen</b>			
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>
<b>MW V1</b>	1,43	1,75	1,20	1,91	0,73	2,01
<b>MW V2</b>	0,81	0,76	1,00	0,66	0,33	0,28
<b>MW ges</b>	1,12	1,25	1,10	1,28	0,53	1,14
<b>SEM ges</b>	0,18	0,29	0,06	0,36	0,12	0,50

nach Abzug der Isotypenkontrolle waren diese Werte negativ -> Wert nicht berücksichtigt

### Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.10

IL-10		Versuch 1		BALB/c T Zellen			
Stamm DC	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Aktivierung	unbehandelt	unbehandelt	LPS	LPS	CpG	CpG	CpG
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	1,0	0	1,0	0	1,0	1,0
M1	20,90	24,46	22,65	24,84	16,37	19,15	
M2	18,05	21,11	18,97	23,37	9,90	13,22	
M3	24,56	20,87	18,66	20,96	12,19	14,18	
M4	20,50	21,56	20,43	29,81	9,92	13,77	
MW V1	21,00	22,00	20,18	24,75	10,67	15,08	
SD V1	2,33	1,44	1,58	3,24	1,07	2,37	
n	4	4	4	4	3	4	
IL-10		Versuch 2		BALB/c T Zellen			
Stamm DC	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Aktivierung	unbehandelt	unbehandelt	LPS	LPS	CpG	CpG	CpG
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	1,0	0	1,0	0	1,0	1,0
M1	21,31	19,46	12,86	13,93	9,81	16,83	
M2	19,41	10,34	10,68	13,66	3,24	10,80	
M3	11,75	11,36	10,23	14,98	6,72	10,34	
M4	0,00	13,25	12,65	14,26	5,02	9,81	
MW V2	17,49	13,60	11,61	14,21	6,20	11,95	
SD V2	4,13	3,54	1,16	0,49	2,42	2,84	
n	3	4	4	4	4	4	
IL-10		Versuch 3		BALB/c T Zellen			
Stamm DC	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Aktivierung	unbehandelt	unbehandelt	LPS	LPS	CpG	CpG	CpG
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	1,0	0	1,0	0	1,0	1,0
M1	16,91	23,49	13,76	20,52	9,1	12,02	
M2	10,62	16,01	13,35	14,96	6,96	9,26	
M3	11,68	16,87	13,42	9,85	3,18	1,26	
M4	14,17	12,92	13,51	2,58	-0,66	0,79	
MW V3	13,35	17,32	13,51	15,11	6,41	10,64	
SD V3	2,43	3,85	0,16	4,36	2,45	1,38	
n	4	4	4	3	3	2	

IL-10		Versuche gesamt		BALB/c T Zellen			
Stamm DC	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Aktivierung	unbehandelt	unbehandelt	LPS	LPS	CpG	CpG	CpG
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	1,0	0	1,0	0	1,0	1,0
MW V1	21,00	22,00	20,18	24,75	10,67	15,08	
MW V2	17,49	13,60	11,61	14,21	6,20	11,95	
MW V3	13,35	17,32	13,51	15,11	6,41	10,64	
MW ges	17,28	17,64	15,10	18,02	7,76	12,56	



(Pollen [mg/ml])								
M1 (Versuch 1)					19,85	6,00		
M2					26,76	5,52		
M3					18,69	4,80		
M4					24,23	2,54	14,97	4,24
M5					25,31	3,96	24,98	4,15
M6					27,07	2,10	23,8	5,76
MW V1					23,65	4,15	21,25	4,72
SD V1					3,25	1,45	4,47	0,74
<b>Versuch 2</b>								
M1	16,65	6,23	23,11	2,92	8,79	2,05	13,73	1,97
M2	11,66	2,74	11,06	3,24	7,96	1,36	12,12	1,86
M3	11,45	4,71	19,45	1,84	6,88	1,33	16,85	1,58
MW V2	13,25	4,56	17,87	2,67	7,88	1,58	14,23	1,80
SD V2	2,40	1,43	5,04	0,60	0,78	0,33	1,96	0,16
<b>Versuch 3</b>								
M1	15,39	3,31	21,28	3,55	10,04	2,51	22,02	1,77
M2	18,68	2,78	22,03	2,56	9,63	1,43	16,72	1,88
M3	22,68	4,05	21,08	2,84	10,65	1,37	15,96	1,68
M4	14,51	1,77	23,43	1,83	7,37	1,44	19,18	1,77
MW V3	17,82	2,98	21,96	2,70	9,42	1,69	18,47	1,78
SD V3	3,21	0,83	0,92	0,62	1,24	0,48	2,37	0,07
<b>Versuch gesamt</b>								
<b>C57BL/6 T Zellen</b>				<b>BALB/c T Zellen</b>				
MW V1					23,65	4,15	21,25	4,72
MW V2	13,25	4,56	17,87	2,67	7,88	1,58	14,23	1,80
MW V3	17,82	2,98	21,96	2,70	9,42	1,69	18,47	1,78
MW ges	15,53	3,77	19,91	2,68	13,65	2,47	17,98	2,77
SEM ges	1,61	0,56	1,44	0,01	4,10	0,69	1,67	0,80

IL-4 Stamm DC Aktivierung Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	Th1-K. BALB/c unbehandelt	Th2-K. BALB/c unbehandelt	Th1-K. BALB/c LPS	Th2-K. BALB/c LPS	Th1-K. C57BL/6 unbehandelt	Th2-K. C57BL/6 unbehandelt	Th1-K. C57BL/6 LPS	Th2-K. C57BL/6 LPS
	0	0	0	0	0	0	0	0
M1	1,35	7,14	1,49	3,8	0,68	9,93	0,18	7,99
M2	0,72	6,4		3,85	0,65	9,95	0,29	5,69
M3	0,57	5,58		2,64		9,34		5,35
MW V1	0,88	6,37	1,49	3,43	0,67	9,74	0,24	6,34
SD V1	0,34	0,64		0,56	0,02	0,28	0,06	1,17
<b>Versuch 2</b>								
M1	0,88	2,32	0,98	3,39	1,36	4,24	1,78	1,41
M2	0,75	1,86	0,28	2,84	0,57	1,6	0,25	0,78
MW V2	0,82	2,09	0,63	3,12	0,97	2,92	1,02	1,10
SD V2	0,07	0,23	0,35	0,27	0,40	1,32	0,77	0,32
<b>Versuch 3</b>								
M1					1,19	5,74	0,5	22,95

M2				0,24	5,24	0,09	5,33	
M3				0,01	3,83	0,39	1,41	
MW V3				0,48	4,94	0,33	3,37	
SD V3				0,51	0,81	0,17	1,96	
<b>Versuch gesamt</b>	<b>C57BL/6 T Zellen</b>			<b>BALB/c T Zellen</b>				
MW V1	0,88	6,37	1,49	3,43	0,67	9,74	0,24	6,34
MW V2	0,82	2,09	0,63	3,12	0,97	2,92	1,02	1,10
MW V3					0,48	4,94	0,33	3,37
MW ges	0,85	4,23	1,06	3,27	0,70	5,87	0,53	3,60
SEM ges	0,02	1,24	0,25	0,09	0,10	1,43	1,53	0,03

IL-10	Th1-K.	Th2-K.	Th1-K.	Th2-K.	Th1-K.	Th2-K.	Th1-K.	Th2-K.
Stamm DC	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Aktivierung	unbehandelt	unbehandelt	LPS	LPS	unbehandelt	unbehandelt	LPS	LPS
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	0	0	0	0	0	0	0
M1 (Versuch 1)	0,65	5,03	0,55	10,21	0,21	14,31	0,79	13,62
M2	0,2	4,33		4,85		17,35	0,15	14,28
MW V1	0,43	4,68	0,55	7,53	0,21	15,83	0,47	13,95
SD V1	0,23	0,35		2,68		1,52	0,32	0,33
<b>Versuch 2</b>								
M1					2,89	22,58		
M2					1,86	15,18		
M3					1,35	13,77		
MW V2					2,03	17,18		
SD V2					0,64	3,86		
<b>Versuch gesamt</b>	<b>C57BL/6 T Zellen</b>			<b>BALB/c T Zellen</b>				
MW V1	0,43	4,68	0,55	7,53	0,21	15,83	0,47	13,95
MW V2					2,03	17,18		
MW V1/ ges	0,43	4,68	0,55	7,53	1,12	16,50	0,47	13,95
SD V1/ SEM ges	0,23	0,35		2,68	0,53	0,39	2,65	0,06

FACS-Färbung nicht optimal -> Wert nicht berücksichtigt

nach Abzug der Isotypenkontrolle waren diese Werte negativ -> Wert nicht berücksichtigt

### Daten zur Abbildung 3.12 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand von allogener MLR

IFN- $\gamma$ [pg/ml]						
Stamm T Zellen	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c
Stamm DC	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Aktivierung	unbehandelt	unbehandelt	LPS	LPS	CpG	CpG
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	1,0	0	1,0	0	1,0
V1	1596,57	1535,48	3542,26	2684,30	7106,05	6493,38
V2	571,24	582,66	2567,09	1799,71	1823,18	1158,86
V3	1584,86	1177,75	5157,17	4049,27	4200,09	6919,24
MW	1250,89	1098,63	3755,51	2844,43	4376,44	4857,16

SEM	277,48	226,89	616,66	534,24	1247,26	1513,16
n	3	3	3	3	3	3
<b>IFN-<math>\gamma</math> [%] normiert</b>						
V1	100,00	96,17	100,00	75,78	100,00	91,38
V2	100,00	102,00	100,00	70,11	100,00	63,56
V3	100,00	74,31	100,00	78,52	100,00	164,74
MW	100,00	90,83	100,00	74,80	100,00	106,56
SEM	0,00	6,88	0,00	2,02	0,00	24,64
n	3	3	3	3	3	3
<b>IL-4 [pg/ml]</b>						
Versuch 1 (V1)	321,66	309,40	324,13	383,12	362,94	372,76
V2	331,58	335,42	200,80	443,89	12,16	162,19
V3	193,79	339,62	168,73	198,10	122,63	195,78
MW	282,34	328,15	231,22	341,70	242,79	284,27
SEM	36,23	7,72	38,68	60,35	84,96	101,74
n	3	3	3	3	2	2
<b>IL-4 [%] normiert</b>						
V1	100	96,18852204	100	118,1994879	100	102,7056814
V2	100	101,1580916	100	221,060757	100	1333,799342
V3	100	175,251561	100	117,4065074	100	159,6509826
MW	100,00	124,20	100,00	152,22	100,00	131,18
SEM	0,00	20,87	0,00	28,10	0,00	6,26
n	3	3	3	3	2	2

Messung nicht auswertbar

<b>IL-10 [pg/ml]</b>						
V1	920,80	741,57	619,80	1054,31	318,91	462,08
V2	414,89	406,29	233,55	227,18	183,01	189,17
V3	619,07	1162,53	944,13	1085,56	228,15	433,18
MW	651,59	770,13	599,16	789,02	243,36	361,48
SEM	119,98	178,63	167,70	229,49	32,63	70,67
n	3	3	3	3	3	3
<b>IL-10 [%] normiert</b>						
V1	100,00	80,54	100,00	170,10	100,00	144,89
V2	100,00	97,93	100,00	97,27	100,00	103,37
V3	100,00	187,79	100,00	114,98	100,00	189,87
MW	100,00	122,08	100,00	127,45	100,00	146,04
SEM	0,00	27,13	0,00	17,91	0,00	20,39
n	3	3	3	3	3	3
<b>IL-13 [pg/ml]</b>						
V1	7548,23	5783,86	5271,96	6476,08	4840,46	3279,28
V2	3054,48	3668,40	4285,69	2430,90	708,44	1267,29
V3	3912,03	4139,78	4255,33	3000,40	1759,03	2375,73
MW	4838,25	4530,68	4604,33	3969,13	2435,98	2307,43
SEM	1124,66	523,53	272,65	1032,22	1012,38	475,05
n	3	3	3	3	3	3



<b>IL-13 [%] normiert</b>						
<b>V1</b>	100,00	76,63	100,00	122,84	100,00	67,75
<b>V2</b>	100,00	120,10	100,00	56,72	100,00	178,88
<b>V3</b>	100,00	105,82	100,00	70,51	100,00	135,06
<b>MW</b>	100,00	100,85	100,00	83,36	100,00	127,23
<b>SEM</b>	0,00	10,45	0,00	16,44	0,00	26,39
<b>n</b>	3	3	3	3	3	3

### Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.12

<b>IFN-<math>\gamma</math> [pg/ml]</b>						
<b>Stamm T Zellen</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>
<b>V1</b>	680,89	509,38	4297,15	3105,58	2148,62	1286,91
<b>V2</b>	2977,19	4011,85	24000,00	21300,00	9748,64	8047,35
<b>MW</b>	1829,04	2260,62	14148,58	12202,79	5948,63	4667,13
<b>SEM</b>	811,86	1238,31	6966,01	6432,70	2687,01	2390,18
<b>n</b>	2	2	2	2	2	2
<b>IFN-<math>\gamma</math> [%] normiert</b>						
<b>V1</b>	100,00	74,81	100,00	72,27	100,00	59,89
<b>V2</b>	100,00	134,75	100,00	88,75	100,00	82,55
<b>MW</b>	100,00	104,78	100,00	80,51	100,00	71,22
<b>SEM</b>	0,00	21,19	0,00	5,83	0,00	8,01
<b>n</b>	2	2	2	2	2	2

<b>IL-4 [pg/ml]</b>						
<b>Stamm T Zellen</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>	<b>0</b>	<b>1,0</b>
<b>V1</b>	49,2	76	118,89	129,38	16,09	9,24
<b>V2</b>	49,33	58,83	30,29	42,72	11,92	23,3
<b>MW</b>	49,27	67,42	74,59	86,05	14,01	16,27
<b>SEM</b>	0,05	6,07	31,32	30,64	1,47	4,97
<b>n</b>	2	2	2	2	2	2
<b>IL-4 [%] normiert</b>						
<b>V1</b>	100,00	154,47	100,00	108,82	100,00	57,43
<b>V2</b>	100,00	119,26	100,00	141,04	100,00	195,47
<b>MW</b>	100,00	136,86	100,00	124,93	100,00	126,45
<b>SEM</b>	0,00	12,45	0,00	11,39	0,00	48,81
<b>n</b>	2	2	2	2	2	2

<b>IL-10 [pg/ml]</b>						
<b>V1</b>	23,67	40,19	44,46	61,11	17,53	12,29

<b>V2</b>	366,89	385,58	483,73	568,02	337,63	483,86
<b>MW</b>	195,28	212,89	264,10	314,57	177,58	248,07
<b>SEM</b>	121,35	122,11	155,31	179,22	113,17	166,72
<b>n</b>	2	2	2	2	2	2
<b>IL-10 [%] normiert</b>						
<b>V1</b>	100,00	169,79	100,00	137,45	100,00	70,11
<b>V2</b>	100,00	105,09	100,00	117,43	100,00	143,31
<b>MW</b>	100,00	137,44	100,00	127,44	100,00	106,71
<b>SEM</b>	0,00	22,87	0,00	7,08	0,00	25,88
<b>n</b>	2	2	2	2	2	2

<b>IL-13 [pg/ml]</b>						
<b>V1</b>	795,86	724,68	1784,01	1270,94	647,98	374,21
<b>V2</b>	1555,40	1333,48	1259,75	2476,00	659,10	1049,65
<b>MW</b>	1175,63	1029,08	1521,88	1873,47	653,54	711,93
<b>SEM</b>	268,54	215,24	185,35	426,05	3,93	238,80
<b>n</b>	2	2	2	2	2	2
<b>IL-13 [%] normiert</b>						
<b>V1</b>	100,00	91,06	100,00	71,24	100,00	57,75
<b>V2</b>	100,00	85,73	100,00	196,55	100,00	159,26
<b>MW</b>	100,00	88,39	100,00	133,89	100,00	108,50
<b>SEM</b>	0,00	1,88	0,00	44,30	0,00	35,89
<b>n</b>	2	2	2	2	2	2

**Daten zur Abbildung 3.13 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand der Kontrollen zur Th1 und Th2 Polarisierung von allogener MLR**

<b>IFN-<math>\gamma</math> [pg/ml]</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>
<b>Stamm T Zellen</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>
<b>Stamm DC</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>V1</b>	10900	860,49	13300	916,91				
<b>V2</b>	29100	432,74	70300	622,82	20200	306,56	42000	227,69
<b>V3</b>	31500	1327,44	151000	1744,37	108000	3376,03	172000	3473,36
<b>MW</b>	23833	873,56	78200	1094,70	64100	1841,30	107000	1850,53
<b>SEM</b>	5310,23	210,95	32616,05	274,14	31041,99	1085,22	45961,94	1147,52
<b>n</b>	3	3	3	3	2	2	2	2
<b>IFN-<math>\gamma</math> [%] normiert</b>								
<b>V1</b>	682,71	53,90	375,47	25,88				
<b>V2</b>	5094,18	75,75	2738,51	24,26	2966,71	45,02	977,39	5,30
<b>V3</b>	1987,56	83,76	2927,96	33,82	3627,58	113,40	716,67	14,47
<b>MW</b>	2588,15	71,14	2013,98	27,99	3297,14	79,21	847,03	9,89

<b>SEM</b>	1068,31	7,29	670,41	2,41	233,66	24,17	92,18	3,24
<b>n</b>	3	3	3	3	2	2	2	2

<b>IL-4 [pg/ml]</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>
<b>V1</b>	0,00	220,37	0,00	242,39				
<b>V2</b>	228,22	898,73	195,86	1370,05	301,84	1115,04	405,31	1245,05
<b>V3</b>	0,00	1245,40	0,00	989,55	0,00	1273,93	0,89	1010,83
<b>MW</b>	76,07	788,17	65,29	867,33	150,92	1194,49	203,10	1127,94
<b>SEM</b>	62,11	245,78	53,31	270,43	106,72	56,18	142,98	82,81
<b>n</b>	3	3	3	3	2	2	2	2

<b>IL-4 [%] normiert</b>								
<b>V1</b>	0,00	68,51	0,00	74,78				
<b>V2</b>	68,83	271,04	97,54	682,30	613,50	2266,34	340,91	1047,23
<b>V3</b>	0,00	642,65	0,00	586,47	0,00	2582,47	2,94	3337,17
<b>MW</b>	22,94	327,40	32,51	447,85	306,75	2424,40	171,93	2192,20
<b>SEM</b>	18,73	137,27	26,55	153,97	216,90	111,77	119,49	809,62
<b>n</b>	3	3	3	3	2	2	2	2

<b>IL-10 [pg/ml]</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>
<b>V1</b>	323,32	509,81	387,04	1012,83				
<b>V2</b>	0,00	1600,31	0,00	1389,77	0,00	1252,27	0,00	854,64
<b>V3</b>	833,70	3383,54	904,12	5025,28	598,19	1439,00	838,93	3095,09
<b>MW</b>	385,67	1831,22	430,39	2475,96	299,10	1345,64	419,47	1974,87
<b>SEM</b>	198,15	683,87	213,84	1044,54	211,49	66,02	296,61	792,12
<b>n</b>	3	3	3	3	2	2	2	2

<b>IL-10 [%] normiert</b>								
<b>V1</b>	35,11	55,37	62,45	163,41				
<b>V2</b>	0,00	385,72	0,00	595,06	0,00	5290,54	0,00	1922,27
<b>V3</b>	134,67	546,55	95,76	532,27	163,04	392,22	173,43	639,84
<b>MW</b>	56,59	329,21	52,74	430,25	81,52	2841,38	86,71	1281,05
<b>SEM</b>	32,93	118,05	22,92	109,94	57,64	1731,82	61,32	453,41
<b>n</b>	3	3	3	3	2	2	2	2

<b>IL-13 [pg/ml]</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>
<b>V1</b>	454,69	5465,28	468,44	4744,03				
<b>V2</b>	460,06	13300,00	761,93	10900,00	2419,17	5367,45	845,14	3960,40
<b>V3</b>	388,30	14108,85	912,25	17750,20	270,20	3677,58	587,70	3925,45
<b>MW</b>	434,35	10958,04	714,21	11131,41	1344,69	4522,51	716,42	3942,93
<b>SEM</b>	18,84	2250,50	106,41	3067,04	759,78	597,46	91,02	12,36
<b>n</b>	3	3	3	3	2	2	2	2

<b>IL-13 [%] normiert</b>								
<b>V1</b>	6,52	78,38	12,11	122,68				
<b>V2</b>	15,06	435,43	17,78	254,33	303,97	674,42	47,37	221,99
<b>V3</b>	9,93	360,65	21,44	417,13	17,37	236,44	46,65	311,61

<b>MW</b>	10,50	291,49	17,11	264,71	160,67	455,43	47,01	266,80
<b>SEM</b>	2,03	88,77	2,21	69,53	101,33	154,85	0,25	31,68
<b>n</b>	3	3	3	3	2	2	2	2

extrapolierte Messwerte

### Daten zur Abbildung 3.14 Proliferationsmessung von OVA-spezifischen DO11.10 T Zellen

DC-T Zell-Ratio	DC Behandlung			Zellteilungen pro 10.000 Zellen			Versuch I	
	Aktivierung DC	1 mg/ml OVA	Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	M1	M2	M3	MW I	SD I
1:100	unbehandelt	+	0,0	23399	13097	10225	11661	1436,03
1:30	unbehandelt	+	0,0	28392	15382	30999	29695	1303,52
1:10	unbehandelt	+	0,0	57944	48274	38049	48089	8123,30
1:5	unbehandelt	+	0,0	39739	45278	52243	45754	5115,81
1:100	unbehandelt	+	0,3	17288	19939	10192	15806	4115,09
1:30	unbehandelt	+	0,3	35552	27523	28652	30576	3548,71
1:10	unbehandelt	+	0,3	49014	61917	43666	51532	7660,88
1:5	unbehandelt	+	0,3	50335	54318	49014	51222	2254,67
1:100	unbehandelt	+	1,0	17587	20408	20944	19646	1472,35
1:30	unbehandelt	+	1,0	30482	42714	30298	30390	92,20
1:10	unbehandelt	+	1,0	51939	44677	50761	49126	3181,90
1:5	unbehandelt	+	1,0	58089	58735	59121	58648	425,89
1:100	unbehandelt	+	2,5	7833	10265	12030	10043	1720,53
1:30	unbehandelt	+	2,5	32724	23383	32846	32785	61,09
1:10	unbehandelt	+	2,5	35474	37326	35738	36179	817,71
1:5	unbehandelt	+	2,5	56256	48345	49153	51251	3554,32
1:100	LPS	+	0,0	56183	47167	62626	55326	6340,06
1:30	LPS	+	0,0	62334	62317	63817	62823	703,29
1:10	LPS	+	0,0	43568	61959	71239	58922	11499,11
1:5	LPS	+	0,0	54308	66989	55748	59015	5668,70
1:100	LPS	+	0,3	44364	53716	49436	49172	3822,38
1:30	LPS	+	0,3	57868	52621	43368	51286	5994,23
1:10	LPS	+	0,3	59921	38702	70306	65114	5192,49
1:5	LPS	+	0,3	57277	66416	64935	62876	4005,25
1:100	LPS	+	1,0	32962	31327	30212	31500	1129,16
1:30	LPS	+	1,0	39493	41723	48506	43241	3832,85
1:10	LPS	+	1,0	64410	49299	57129	56946	6170,10
1:5	LPS	+	1,0	52880	57692	56114	55562	2002,85
1:100	LPS	+	2,5	33814	43079	27630	34841	6348,75
1:30	LPS	+	2,5	55687	48153	41123	48321	5946,86

1:10	LPS	+	2,5	55562	51914	56638	54704	2021,43
1:5	LPS	+	2,5	68182	51611	64419	61404	7093,15
1:100	CpG	+	0,0	14090	15338		14714	624,11
1:30	CpG	+	0,0	24830	21747		23288	1541,33
1:10	CpG	+	0,0	36990	30555		33772	3217,22
1:5	CpG	+	0,0	28274	34069		31171	2897,42
1:100	CpG	+	0,3	16191	17648		16920	728,15
1:30	CpG	+	0,3	26142	30912		28527	2384,77
1:10	CpG	+	0,3	46145	35789		40967	5177,89
1:5	CpG	+	0,3	47666	41038		44352	3313,90
1:100	CpG	+	1,0	10426	13344		11885	1459,30
1:30	CpG	+	1,0	32401	23437		27919	4482,07
1:10	CpG	+	1,0	41584	43391		42487	903,72
1:5	CpG	+	1,0	37764	37360		37562	202,14
1:100	CpG	+	2,5	33385	17837		25611	7774,08
1:30	CpG	+	2,5	33290	23403		28347	4943,50
1:10	CpG	+	2,5	55347	50163		52755	2591,64
1:5	CpG	+	2,5	58513	56809		57661	851,94
1:100	LPS	-	0,0	614	807		711	96,17
1:30	LPS	-	0,0	886	970		928	42,40
1:10	LPS	-	0,0	2219	1769		1994	224,86
1:5	LPS	-	0,0	2490	2668		2579	88,80
1:100	LPS	-	0,3	646	674		660	13,81
1:30	LPS	-	0,3	1091	1017		1054	37,25
1:10	LPS	-	0,3	2324	2220		2272	52,11
1:5	LPS	-	0,3	4301	4447		4374	73,11
1:100	LPS	-	1,0	796	1551		1174	377,76
1:30	LPS	-	1,0	1414	1804		1609	195,35
1:10	LPS	-	1,0	2250	1664		1957	292,93
1:5	LPS	-	1,0	4722	6146		5434	712,06
1:100	LPS	-	2,5	684	689		686	2,47
1:30	LPS	-	2,5	1005	1182		1093	88,96
1:10	LPS	-	2,5	1489	1423		1456	33,32
1:5	LPS	-	2,5	4993	5540		5266	273,60
ohne DC	-	-	-	273	229		251	22,19
ohne DC	-	+	-	246	193		219	26,31

Ausreißer

DC-T Zell-Ratio	DC Behandlung			Zellteilungen pro 10.000 Zellen			Versuch II	
	Aktivierung DC	1 mg/ml OVA	Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	M1	M2	M3	MW II	SD II
1:100	unbehandelt	+	0,0	33055	34664	16813	33859	804,56

1:30	unbehandelt	+	0,0	46609	37841	42694	42381	3586,38
1:10	unbehandelt	+	0,0	46363	36531	45532	42808	4452,01
1:5	unbehandelt	+	0,0	46229	41187	38065	43708	2520,62
1:100	unbehandelt	+	0,3	23789	25002	16908	24396	606,70
1:30	unbehandelt	+	0,3	43677	38430	48841	43649	4250,16
1:10	unbehandelt	+	0,3	37535	33796	32752	34694	2053,68
1:5	unbehandelt	+	0,3	31886	35388	42388	36554	4366,07
1:100	unbehandelt	+	1,0	11561	21142	14268	15657	4032,93
1:30	unbehandelt	+	1,0	35173	19127	33983	34578	594,66
1:10	unbehandelt	+	1,0	34809	37714	35374	35965	1257,60
1:5	unbehandelt	+	1,0	35812	33102	37630	35514	1860,46
1:100	unbehandelt	+	2,5	9202	11631	9128	10417	1214,20
1:30	unbehandelt	+	2,5	26728	30955	27282	28322	1875,45
1:10	unbehandelt	+	2,5	34021	38198	40334	37518	2621,73
1:5	unbehandelt	+	2,5	50640	40260	44449	45116	4263,82
1:100	LPS	+	0,0	30495	25207	27240	27647	2178,30
1:30	LPS	+	0,0	39700	37465	37942	38369	961,12
1:10	LPS	+	0,0	36652	32942	36278	35291	1668,10
1:5	LPS	+	0,0	37628	34965	35491	36028	1151,79
1:100	LPS	+	0,3	40417	40853	34628	38633	2837,10
1:30	LPS	+	0,3	42254	31421	32847	32134	713,02
1:10	LPS	+	0,3	36621	33286	37380	35763	1778,49
1:5	LPS	+	0,3	39952	39285	38312	39183	673,10
1:100	LPS	+	1,0	30899	29563	29111	29858	758,74
1:30	LPS	+	1,0	37409	34267	38442	36706	1775,70
1:10	LPS	+	1,0	34617	37349	38045	36670	1479,41
1:5	LPS	+	1,0	41660	38307	41896	40621	1639,27
1:100	LPS	+	2,5	35120	23477	34202	30933	5285,33
1:30	LPS	+	2,5	39792	43392	43660	42281	1763,77
1:10	LPS	+	2,5	44760	45583	44573	44972	438,67
1:5	LPS	+	2,5	40366	37364	39962	39231	1330,40
1:100	CpG	+	0,0	18772	19904	17706	18794	897,22
1:30	CpG	+	0,0	24937	34909	32958	30934	4315,09
1:10	CpG	+	0,0	30044	33495	34820	32786	2013,25
1:5	CpG	+	0,0	33857	38788	37239	36628	2059,09
1:100	CpG	+	0,3	21890	34350	26313	27518	5157,56
1:30	CpG	+	0,3	43691	33443	33090	36741	4916,50
1:10	CpG	+	0,3	30757	36153	33320	33410	2203,81
1:5	CpG	+	0,3	34623	36627	41677	37642	2968,28
1:100	CpG	+	1,0	18012	20504	24545	21020	2691,91

1:30	CpG	+	1,0	36992	30250	33639	33627	2752,69
1:10	CpG	+	1,0	38411	29881	35690	34661	3557,80
1:5	CpG	+	1,0	43130	42752	44933	43605	951,85
1:100	CpG	+	2,5	19128	13976	30391	21165	6854,30
1:30	CpG	+	2,5	31715	32231	38948	34298	3294,59
1:10	CpG	+	2,5	43427	32490	35705	37208	4589,59
1:5	CpG	+	2,5	41179	46360	43217	43585	2130,98
ohne DC	-	-	-	54	43		48	5,56
ohne DC	-	+	-	318	185		251	66,57

zu wenig DCs      Ausreißer

DC-T Zell-Ratio	DC Behandlung			Versuch gesamt			
	Aktivierung DC	1 mg/ml OVA	Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	MW I	MW II	MW ges	SEM ges
1:100	unbehandelt	+	0,0	11661	33859	22760	7848,28
1:30	unbehandelt	+	0,0	29695	42381	36038	4485,01
1:10	unbehandelt	+	0,0	48089	42808	45449	1867,05
1:5	unbehandelt	+	0,0	45754	43708	44731	723,20
1:100	unbehandelt	+	0,3	15806	24396	20101	3036,81
1:30	unbehandelt	+	0,3	30576	43649	37112	4622,27
1:10	unbehandelt	+	0,3	51532	34694	43113	5953,15
1:5	unbehandelt	+	0,3	51222	36554	43888	5186,02
1:100	unbehandelt	+	1,0	19646	15657	17652	1410,37
1:30	unbehandelt	+	1,0	30390	34578	32484	1480,63
1:10	unbehandelt	+	1,0	49126	35965	42546	4652,84
1:5	unbehandelt	+	1,0	58648	35514	47081	8178,97
1:100	unbehandelt	+	2,5	10043	10417	10230	132,13
1:30	unbehandelt	+	2,5	32785	28322	30554	1578,10
1:10	unbehandelt	+	2,5	36179	37518	36849	473,16
1:5	unbehandelt	+	2,5	51251	45116	48184	2169,01
1:100	LPS	+	0,0	55326	27647	41486	9785,77
1:30	LPS	+	0,0	62823	38369	50596	8645,64
1:10	LPS	+	0,0	58922	35291	47106	8354,90
1:5	LPS	+	0,0	59015	36028	47521	8127,25
1:100	LPS	+	0,3	49172	38633	43902	3726,09
1:30	LPS	+	0,3	51286	32134	41710	6770,97
1:10	LPS	+	0,3	65114	35763	50438	10377,14
1:5	LPS	+	0,3	62876	39183	51029	8376,75
1:100	LPS	+	1,0	31500	29858	30679	580,74
1:30	LPS	+	1,0	43241	36706	39973	2310,34
1:10	LPS	+	1,0	56946	36670	46808	7168,54
1:5	LPS	+	1,0	55562	40621	48091	5282,40

<b>1:100</b>	<b>LPS</b>	<b>+</b>	<b>2,5</b>	34841	30933	32887	1381,60
<b>1:30</b>	<b>LPS</b>	<b>+</b>	<b>2,5</b>	48321	42281	45301	2135,44
<b>1:10</b>	<b>LPS</b>	<b>+</b>	<b>2,5</b>	54704	44972	49838	3440,98
<b>1:5</b>	<b>LPS</b>	<b>+</b>	<b>2,5</b>	61404	39231	50317	7839,43
<b>1:100</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>0,0</b>	14714	18794	16754	1442,42
<b>1:30</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>0,0</b>	23288	30934	27111	2703,30
<b>1:10</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>0,0</b>	33772	32786	33279	348,64
<b>1:5</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>0,0</b>	31171	36628	33900	1929,33
<b>1:100</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>0,3</b>	16920	27518	22219	3746,99
<b>1:30</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>0,3</b>	28527	36741	32634	2904,32
<b>1:10</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>0,3</b>	40967	33410	37188	2671,75
<b>1:5</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>0,3</b>	44352	37642	40997	2372,08
<b>1:100</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>1,0</b>	11885	21020	16453	3229,81
<b>1:30</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>1,0</b>	27919	33627	30773	2018,08
<b>1:10</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>1,0</b>	42487	34661	38574	2767,20
<b>1:5</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>1,0</b>	37562	43605	40584	2136,38
<b>1:100</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>2,5</b>	25611	21165	23388	1571,86
<b>1:30</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>2,5</b>	28347	34298	31322	2104,12
<b>1:10</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>2,5</b>	52755	37208	44981	5496,81
<b>1:5</b>	<b>CpG</b>	<b>+</b>	<b>2,5</b>	57661	43585	50623	4976,62
<b>1:100</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>0,0</b>	711		711	96,17
<b>1:30</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>0,0</b>	928		928	42,40
<b>1:10</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>0,0</b>	1994		1994	224,86
<b>1:5</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>0,0</b>	2579		2579	88,80
<b>1:100</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>0,3</b>	660		660	13,81
<b>1:30</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>0,3</b>	1054		1054	37,25
<b>1:10</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>0,3</b>	2272		2272	52,11
<b>1:5</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>0,3</b>	4374		4374	73,11
<b>1:100</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>1,0</b>	1174		1174	377,76
<b>1:30</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>1,0</b>	1609		1609	195,35
<b>1:10</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>1,0</b>	1957		1957	292,93
<b>1:5</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>1,0</b>	5434		5434	712,06
<b>1:100</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>2,5</b>	686		686	2,47
<b>1:30</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>2,5</b>	1093		1093	88,96
<b>1:10</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>2,5</b>	1456		1456	33,32
<b>1:5</b>	<b>LPS</b>	<b>-</b>	<b>2,5</b>	5266		5266	273,60
<b>ohne DC</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	<b>-</b>	251	48	149	71,58
<b>ohne DC</b>	<b>-</b>	<b>+</b>	<b>-</b>	219	251	235	11,39



### Daten zur Abbildung 3.15 Intrazelluläre Zytokinbestimmung in OVA-spezifischen DO11.10 T Zellen

IFN- $\gamma$	Versuch 1			
Stamm T Zellen	DO11.10 BALB/c	DO11.10 BALB/c	DO11.10 BALB/c	DO11.10 BALB/c
Stamm DC Aktivierung <i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	BALB/c unbehandelt <b>0</b>	BALB/c unbehandelt <b>0,3</b>	BALB/c unbehandelt <b>1</b>	BALB/c unbehandelt <b>2,5</b>
M1	11,29	8,82	13,14	9,36
M2	13,61	8,57	10,08	10,77
M3	13,96	7,94	10,04	11,32
M4	10,86	9,34	12,51	12,84
M5	7,72	7,47	6,87	8,20
M6	7,02	8,75	5,40	10,17
M7	6,64	9,14	6,00	10,86
M8	6,32	9,44	6,25	8,11
MW V1	9,68	8,68	8,79	10,20
SD V1	2,94	0,64	2,86	1,50
n	8	8	8	8
Stamm DC Aktivierung <i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	BALB/c LPS <b>0</b>	BALB/c LPS <b>0,3</b>	BALB/c LPS <b>1</b>	BALB/c LPS <b>2,5</b>
M1	6,10	4,96	3,97	4,26
M2	5,67	4,41	3,60	5,03
M3	5,46	4,62	3,26	4,21
M4		5,53	3,30	5,03
M5	3,55	2,55	3,76	4,27
M6	2,54	2,60	3,21	3,89
M7	3,30	2,91	3,70	3,50
M8	2,74	2,56	3,35	3,83
MW V1	4,19	3,77	3,52	4,25
SD V1	1,39	1,16	0,26	0,51
n	7	8	8	8
Stamm DC Aktivierung <i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	BALB/c CpG <b>0</b>	BALB/c CpG <b>0,3</b>	BALB/c CpG <b>1</b>	BALB/c CpG <b>2,5</b>
M1	9,05	8,76	7,97	8,00
M2	10,13	9,64	7,79	9,57
M3	9,02	10,09	8,24	8,30
M4	9,63	10,64	8,81	9,00
M5	7,50	6,46	7,69	5,70
M6	8,30	5,55	6,01	7,53
M7	7,71	6,40	6,17	6,37
M8	7,57	7,29	7,83	6,74
MW V1	8,61	8,10	7,56	7,65
SD V1	0,93	1,80	0,91	1,24

<b>n</b>	8	8	8	8
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Versuch 2</b>			
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
<b>M1</b>	7,87	6,46	6,97	8,77
<b>M2</b>	10,92	6,53	6,30	6,06
<b>M3</b>	10,37	6,35	7,36	6,10
<b>M4</b>	13,43		7,32	6,80
<b>M5</b>	7,46	7,64	8,25	10,25
<b>M6</b>	5,73	4,60	5,95	7,34
<b>M7</b>	6,26	5,73	6,59	6,76
<b>M8</b>	5,61	5,83	7,83	10,21
<b>MW V2</b>	8,46	6,16	7,07	7,79
<b>SD V2</b>	2,65	0,86	0,72	1,62
<b>n</b>	8	7	8	8
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
<b>M1</b>	3,02			2,70
<b>M2</b>	2,48	2,28	2,61	2,63
<b>M3</b>	3,72	1,86	1,93	3,58
<b>M4</b>	2,96	2,36	2,01	2,60
<b>M5</b>	0,90	0,96	3,06	3,97
<b>M6</b>	0,93	1,22	2,65	3,65
<b>M7</b>	1,57	0,96	2,57	2,98
<b>M8</b>				
<b>MW V2</b>	2,23	1,61	2,47	3,16
<b>SD V2</b>	1,02	0,59	0,39	0,52
<b>n</b>	7	6	6	7
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
<b>M1</b>	4,87	4,34	5,34	3,14
<b>M2</b>	4,73	5,46	5,95	3,97
<b>M3</b>	8,30	5,90	6,02	
<b>M4</b>	6,99	6,98	5,39	4,78
<b>M5</b>	4,34	4,87	5,79	6,96
<b>M6</b>	6,25	4,82	5,08	5,42
<b>M7</b>	4,82	5,32	6,00	5,78
<b>M8</b>	5,47	4,71	4,72	4,20
<b>MW V2</b>	5,72	5,30	5,54	4,89
<b>SD V2</b>	1,28	0,78	0,45	1,18
<b>n</b>	8	8	8	7
<b>IFN-<math>\gamma</math></b>	<b>Versuch gesamt</b>			
<b>Stamm T Zellen</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>

<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
<b>MW V1</b>	9,68	8,68	8,79	10,20
<b>MW V2</b>	8,46	6,16	7,07	7,79
<b>MW gesamt</b>	9,07	7,42	7,93	9,00
<b>SEM gesamt</b>	0,43	0,89	0,61	0,85
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
<b>MW V1</b>	4,19	3,77	3,52	4,25
<b>MW V2</b>	2,23	1,61	2,47	3,16
<b>MW gesamt</b>	3,21	2,69	3,00	3,71
<b>SEM gesamt</b>	0,70	0,76	0,37	0,39
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
<b>MW V1</b>	8,61	8,10	7,56	7,65
<b>MW V2</b>	5,72	5,30	5,54	4,89
<b>MW gesamt</b>	7,17	6,70	6,55	6,27
<b>SEM gesamt</b>	1,02	0,99	0,72	0,98

### Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.15

<b>IL-4</b>	<b>Versuch 1</b>			
<b>Stamm T Zellen</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
<b>M1</b>	2,30	1,40		0,62
<b>M2</b>	1,97	0,51	0,94	0,23
<b>M3</b>	0,30	0,52	0,59	
<b>M4</b>	0,23	0,88	0,24	0,27
<b>MW V1</b>	1,20	0,83	0,59	0,37
<b>SD V1</b>	0,94	0,36	0,29	0,18
<b>n</b>	4	4	3	3
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
<b>M1</b>	1,52	1,02	1,63	0,93
<b>M2</b>	0,93	1,08	1,03	1,10
<b>M3</b>	0,57		0,92	0,83
<b>M4</b>	1,41	1,72	1,38	1,19
<b>MW V1</b>	1,11	1,27	1,24	1,01
<b>SD V1</b>	0,38	0,32	0,28	0,14

<b>n</b>	4	3	4	4
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
<b>M1</b>	0,04	0,66	0,75	
<b>M2</b>		0,25	0,35	0,49
<b>M3</b>		0,10	1,06	0,55
<b>M4</b>	0,17	0,56	0,75	0,48
<b>MW V1</b>	0,11	0,39	0,73	0,51
<b>SD V1</b>	0,07	0,23	0,25	0,03
<b>n</b>	2	4	4	3
nicht auswertbare Proben				
<b>IL-4</b>	<b>Versuch 2</b>			
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
<b>M1</b>	1,83	2,51	3,82	1,11
<b>M2</b>	2,05	1,60	3,09	0,89
<b>M3</b>	1,80	1,96	2,15	0,96
<b>M4</b>	1,58	1,81	2,33	1,24
<b>MW V2</b>	1,82	1,97	2,85	1,05
<b>SD V2</b>	0,17	0,34	0,66	0,14
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
<b>M1</b>	1,26	0,95	1,02	1,20
<b>M2</b>	0,45	0,49		1,08
<b>M3</b>	1,65	1,00	0,94	0,79
<b>M4</b>		0,85	1,52	1,74
<b>MW V2</b>	1,12	0,82	1,16	1,20
<b>SD V2</b>	0,50	0,20	0,26	0,34
<b>n</b>	3	4	3	4
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
<b>M1</b>	2,03	0,78	0,91	0,56
<b>M2</b>	1,15	2,14	0,40	0,52
<b>M3</b>	0,89	1,84	0,64	0,39
<b>M4</b>	1,22	0,58	0,83	0,61
<b>MW V2</b>	1,32	1,34	0,70	0,52
<b>SD V2</b>	0,43	0,67	0,20	0,08
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>IL-4</b>	<b>Versuch gesamt</b>			
<b>Stamm T Zellen</b>	<b>DO11.10</b>	<b>DO11.10</b>	<b>DO11.10</b>	<b>DO11.10</b>
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>

<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
MW V1	1,20	0,83	0,59	0,37
MW V2	1,82	1,97	2,85	1,05
<b>MW gesamt</b>	<b>1,51</b>	<b>1,40</b>	<b>1,72</b>	<b>0,71</b>
<b>SEM gesamt</b>	<b>0,22</b>	<b>0,40</b>	<b>0,80</b>	<b>0,24</b>
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
MW V1	1,11	1,27	1,24	1,01
MW V2	1,12	0,82	1,16	1,20
<b>MW gesamt</b>	<b>1,11</b>	<b>1,05</b>	<b>1,20</b>	<b>1,11</b>
<b>SEM gesamt</b>	<b>0,00</b>	<b>0,16</b>	<b>0,03</b>	<b>0,07</b>
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
MW V1	0,11	0,39	0,73	0,51
MW V2	1,32	1,34	0,70	0,52
<b>MW gesamt</b>	<b>0,71</b>	<b>0,86</b>	<b>0,71</b>	<b>0,51</b>
<b>SEM gesamt</b>	<b>0,43</b>	<b>0,33</b>	<b>0,01</b>	<b>0,00</b>

### Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.15

IL-10	Versuch 1			
<b>Stamm T Zellen</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
M1	2,61	3,35	3,64	4,18
M2	2,63	4,49	2,58	4,24
M3	3,27		3,84	2,34
M4	2,84	4,04	3,16	2,63
<b>MW V1</b>	<b>2,84</b>	<b>3,96</b>	<b>3,31</b>	<b>3,35</b>
<b>SD V1</b>	<b>0,27</b>	<b>0,47</b>	<b>0,49</b>	<b>0,87</b>
<b>n</b>	<b>4</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
M1	2,22	2,57	1,47	1,48
M2	2,17	2,00	1,30	1,54
M3	1,79	2,11	2,15	1,76
M4		2,07	1,39	1,66
<b>MW V1</b>	<b>2,06</b>	<b>2,19</b>	<b>1,58</b>	<b>1,61</b>
<b>SD V1</b>	<b>0,19</b>	<b>0,22</b>	<b>0,34</b>	<b>0,11</b>
<b>n</b>	<b>3</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>

<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
M1	1,80	1,73	1,30	1,39
M2	1,86	1,34	1,88	1,50
M3	1,85	2,44	2,22	1,91
M4	1,52	1,35	1,96	1,41
<b>MW V1</b>	<b>1,76</b>	<b>1,72</b>	<b>1,84</b>	<b>1,55</b>
<b>SD V1</b>	<b>0,14</b>	<b>0,45</b>	<b>0,34</b>	<b>0,21</b>
<b>n</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>IL-10</b>	<b>Versuch 2</b>			
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
M1	2,96	4,17	5,61	2,30
M2	2,26	5,23	4,88	2,41
M3	1,52	4,02	3,06	4,02
M4	1,80	3,18	5,20	3,57
<b>MW V2</b>	<b>2,14</b>	<b>4,15</b>	<b>4,69</b>	<b>3,08</b>
<b>SD V2</b>	<b>0,54</b>	<b>0,73</b>	<b>0,97</b>	<b>0,74</b>
<b>n</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>	<b>LPS</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
M1	2,20	1,59	2,04	1,81
M2	1,82	1,00	1,55	1,44
M3	1,29	1,53	1,60	1,68
M4	2,75	1,18	1,76	1,66
<b>MW V2</b>	<b>2,02</b>	<b>1,33</b>	<b>1,74</b>	<b>1,65</b>
<b>SD V2</b>	<b>0,53</b>	<b>0,24</b>	<b>0,19</b>	<b>0,13</b>
<b>n</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>	<b>CpG</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
M1	1,03	1,32	1,87	1,30
M2	0,81	2,56	1,45	2,57
M3	0,77	0,87	2,41	1,71
M4	1,56	1,84	2,36	
<b>MW V2</b>	<b>1,04</b>	<b>1,65</b>	<b>2,02</b>	<b>1,86</b>
<b>SD V2</b>	<b>0,31</b>	<b>0,63</b>	<b>0,39</b>	<b>0,53</b>
<b>n</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>4</b>	<b>3</b>
nicht auswertbare Proben				
<b>IL-10</b>	<b>Versuch gesamt</b>			
<b>Stamm T Zellen</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>
<b>Stamm DC</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>	<b>BALB/c</b>
<b>Aktivierung</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>	<b>unbehandelt</b>

<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
MW V1	2,84	3,96	3,31	3,35
MW V2	2,14	4,15	4,69	3,08
<b>MW gesamt</b>	<b>2,49</b>	<b>4,06</b>	<b>4,00</b>	<b>3,21</b>
<b>SEM gesamt</b>	<b>0,25</b>	<b>0,07</b>	<b>0,49</b>	<b>0,10</b>
Stamm DC	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c
Aktivierung	LPS	LPS	LPS	LPS
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
MW V1	2,06	2,19	1,58	1,61
MW V2	2,02	1,33	1,74	1,65
<b>MW gesamt</b>	<b>2,04</b>	<b>1,76</b>	<b>1,66</b>	<b>1,63</b>
<b>SEM gesamt</b>	<b>0,02</b>	<b>0,30</b>	<b>0,06</b>	<b>0,01</b>
Stamm DC	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c
Aktivierung	CpG	CpG	CpG	CpG
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	<b>0</b>	<b>0,3</b>	<b>1</b>	<b>2,5</b>
MW V1	1,76	1,72	1,84	1,55
MW V2	1,04	1,65	2,02	1,86
<b>MW gesamt</b>	<b>1,40</b>	<b>1,68</b>	<b>1,93</b>	<b>1,71</b>
<b>SEM gesamt</b>	<b>0,25</b>	<b>0,02</b>	<b>0,06</b>	<b>0,11</b>

**Daten zur Abbildung 3.16 Intrazelluläre Zytokinbestimmung der Kontrolle zur Th1 und Th2 Polarisierung im antigenspezifischen DO11.10 T Zell-Kultursystem**

Versuch 1			Versuch 2		
IFN- $\gamma$	Th1-K.	Th2-K.	IFN- $\gamma$	Th1-K.	Th2-K.
Stamm T Zellen	DO11.10 BALB/c	DO11.10 BALB/c	Stamm T Zellen	DO11.10 BALB/c	DO11.10 BALB/c
Stamm DC	BALB/c	BALB/c	Stamm DC	BALB/c	BALB/c
Aktivierung	LPS	LPS	Aktivierung	LPS	LPS
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>	<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	<b>0,3</b>	<b>0,3</b>
M1	23,28	1,30	M1	18,99	2,81
M2	24,66	1,11	M2	21,39	1,56
M3	22,80	1,12	M3	15,06	2,76
M4	22,27	1,12	M4	22,09	1,08
M5	26,98	2,11	M5	17,08	2,36
M6	26,25	1,63	M6	18,49	2,65
M7	25,04	1,80	M7	18,02	1,89
M8		1,45			
<b>MW V1</b>	<b>24,47</b>	<b>1,46</b>	<b>MW V2</b>	<b>18,73</b>	<b>2,16</b>
<b>SD V1</b>	<b>1,64</b>	<b>0,34</b>	<b>SD V2</b>	<b>2,24</b>	<b>0,62</b>
n	7	8	n	7	7
<b>Versuch gesamt</b>					
IFN- $\gamma$	Th1-K.	Th2-K.			
Stamm T Zellen	DO11.10 BALB/c	DO11.10 BALB/c			

Stamm DC Aktivierung <i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	BALB/c LPS	BALB/c LPS			
	0,3	0,3			
MW V1	24,47	1,46			
MW V2	18,73	2,16			
<b>MW gesamt</b>	<b>21,60</b>	<b>1,81</b>			
<b>SEM gesamt</b>	<b>2,03</b>	<b>0,25</b>			
<b>Versuch 1</b>					
<b>IL-4</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>IL-10</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>
<b>Stamm T Zellen</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>Stamm T Zellen</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>	<b>DO11.10 BALB/c</b>
<b>Stamm DC Aktivierung <i>Bet.</i>-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>BALB/c LPS</b>	<b>BALB/c LPS</b>	<b>Stamm DC Aktivierung <i>Bet.</i>-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>BALB/c LPS</b>	<b>BALB/c LPS</b>
	<b>0,3</b>	<b>2,5</b>		<b>0,3</b>	<b>2,5</b>
M1	1,30	1,68	M1	4,02	12,07
M2	0,55	1,33	M2	4,59	9,91
M3	0,55	2,04	M3	4,13	10,11
M4	0,65	3,21	M4		9,55
MW V1	0,76	2,07	MW V1	4,25	10,41
SD V1	0,31	0,71	SD V1	0,25	0,98
n	4	4	n	4	4
<b>Versuch 2</b>					
<b>IL-4</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>IL-10</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>
M1	0,18	2,54	M1	2,85	5,42
M2	0,06	2,99	M2	1,31	9,77
M3	0,09	2,75	M3	1,29	6,38
M4	0,73	3,26	M4		
MW V2	0,27	2,89	MW V2	1,82	7,19
SD V2	0,27	0,27	SD V2	0,73	1,87
n	4	4	n	3	3
<b>Versuch gesamt</b>					
<b>IL-4</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>	<b>IL-10</b>	<b>Th1-K.</b>	<b>Th2-K.</b>
MW V1	0,76	2,07	MW V1	4,25	10,41
MW V2	0,27	2,89	MW V2	1,82	7,19
<b>MW gesamt</b>	<b>0,51</b>	<b>2,48</b>	<b>MW gesamt</b>	<b>3,03</b>	<b>8,80</b>
<b>SEM gesamt</b>	<b>0,18</b>	<b>0,29</b>	<b>SEM gesamt</b>	<b>0,86</b>	<b>1,14</b>

Daten zur Abbildung 3.17 Toxizität von *Bet.*-APE auf MNC der Leber und Abbildung 3.19 Toxizität von *Bet.*-APE auf MNC der Milz

Lebende MNZ Zellen nach *in vitro* Kultur [%]

Stamm Quelle MNZ	BALB/c Leber	BALB/c Leber	BALB/c Leber	BALB/c Leber	BALB/c Leber	BALB/c Leber	BALB/c Leber	BALB/c Leber	BALB/c Leber
$\alpha$ -GalCer [ $\mu$ g/ml]	0	0	0	0	5	5	5	5	5
<i>Bet.</i> -APE	0	0,1	0,3	0,6	0	0,1	0,3	0,6	0,6





### Daten zur Abbildung 3.18 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand von MNC der Leber

Zytokinsekretion der MNZ nach *in vitro* Kultur:

IFN- $\gamma$ [pg/ml]									
Stamm	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c
Quelle MNZ	Leber	Leber	Leber	Leber	Leber	Leber	Leber	Leber	Leber
$\alpha$ -GalCer [ $\mu$ g/ml]	0	0	0	0	5	5	5	5	5
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	0,1	0,3	0,6	0	0,1	0,3	0,6	0,6
V1	5,65		1,89	40,00	3123,33		6451,44	2378,63	
V2	97,59	60,86	57,86	30,58	1604,52	1976,25	429,56	132,08	
V3	0,00	0,00	95,64	58,30	2091,75	2099,70	1015,45	1242,15	
V4	7,50	51,40	26,39	2,64	4124,85	4387,72	2802,64	581,75	
V5	66,82	22,76	23,35	8,23	1830,52	1071,59	512,76	520,19	
MW	35,51	33,76	41,03	27,95	2554,99	2383,82	2242,37	970,96	
SEM	17,63	12,01	14,59	9,17	420,97	611,58	1016,14	352,90	
n	5	4	5	5	5	4	5	5	
IL-4 [pg/ml]									
V1	0,71		2,29	1,74	152,70		169,40	110,24	
V2	0,00	0,00	0,04	0,77	311,80	363,36	307,18	260,99	
V3	1,31	1,14	0,25	1,42	78,60	85,01	68,66	53,63	
V4	3,66	2,81	2,26	0,31	35,47	43,30	34,87	27,34	
V5	1,71	1,17	5,36	1,38	16,57	12,85	13,08	13,72	
MW	1,48	1,28	2,04	1,12	119,03	126,13	118,64	93,18	
SEM	0,55	0,50	0,86	0,23	47,92	69,67	48,49	40,33	
n	5	4	5	5	5	4	5	5	
IL-13 [pg/ml]									
V1	1,60	0,55	0,60	0,76	504,16	564,91	417,89	219,69	
V2	15,87	11,36	10,13	7,73	194,37	217,68	194,88	66,84	
V3	10,07	11,55	12,40	1,79	123,07	76,00	139,36	36,19	
MW	9,18	7,82	7,71	3,43	273,87	286,20	250,71	107,57	
SEM	3,38	2,97	2,95	1,77	95,51	118,58	69,49	46,34	
n	3	3	3	3	3	3	3	3	

Messwert unterhalb der Detektionsgrenze: IFN- $\gamma$  < 31,3 ng/ml; IL-4 < 7,8 ng/ml; IL-13 < 7,8 ng/ml

IFN- $\gamma$ [pg/ml]									
Stamm	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
V1	0,00	0,00	0,00	0,00	3183,24	3368,82	2402,33	283,02	
V2	0,00	0,00	0,00	0,00	1601,03	1085,98	876,41	243,42	
V3	28,04	34,82	46,32	21,24	1070,68	600,91	223,51	48,49	
V4	31,12	39,11	24,66	12,41	6715,97	6974,90	2744,70	567,28	
V5	66,13	46,73	39,33	43,17	2316,13	4622,73	1611,83	199,18	
MW	25,06	24,13	22,06	15,36	2977,41	3330,67	1571,76	268,28	
SEM	10,93	8,98	8,64	7,18	894,13	1047,69	418,02	75,71	
n	5	5	5	5	5	5	5	5	
IL-4 [pg/ml]									
V1	0,38	0,42	0,93	2,93	88,42	95,59	90,31	91,63	

<b>V2</b>	3,05	6,25	7,82	8,39	39,65	41,47	27,63	15,73
<b>V3</b>	1,78	2,46	4,87	0,82	16,79	19,38	18,94	7,42
<b>V4</b>	3,38	2,92	3,49	2,37	28,50	32,41	27,04	9,46
<b>V5</b>	9,53	9,92	7,33	13,13	37,36	27,84	32,34	18,11
<b>MW</b>	3,62	4,39	4,89	5,53	42,14	43,34	39,25	28,47
<b>SEM</b>	1,40	1,49	1,13	2,05	10,95	12,11	11,58	14,23
<b>n</b>	5	5	5	5	5	5	5	5
<b>IL-13 [pg/ml]</b>								
<b>V1</b>	1,13	6,55	0,00	3,17	500,00	720,98	596,46	437,69
<b>V2</b>	3,12	1,25	16,35	0,17	57,68	57,35	42,07	52,83
<b>V3</b>	24,08	19,27	18,70	24,08	464,68	612,06	419,12	134,13
<b>V4</b>	6,56	14,33	16,40	19,33	945,05	1034,99	944,69	498,59
<b>V5</b>	2,34	5,11	13,41	5,75	545,61	703,51	553,30	270,60
<b>MW</b>	7,45	9,30	12,97	10,50	502,60	625,78	511,13	278,77
<b>SEM</b>	3,81	2,93	3,00	4,22	126,02	142,25	130,46	76,32
<b>n</b>	5	5	5	5	5	5	5	5

Messwert unterhalb der Detektionsgrenze: IFN- $\gamma$  < 31,3 ng/ml; IL-4 < 7,8 ng/ml; IL-13 < 7,8 ng/ml

### Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.18

IFN- $\gamma$ [%] normiert					IFN- $\gamma$ [%] normiert				
Stamm	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	Stamm	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Quelle MNZ	Leber	Leber	Leber	Leber	Quelle MNZ	Leber	Leber	Leber	Leber
$\alpha$ -GalCer [ $\mu$ g/ml]	5	5	5	5	$\alpha$ -GalCer [ $\mu$ g/ml]	5	5	5	5
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	0,1	0,3	0,6	Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	0,1	0,3	0,6
<b>V1</b>	100,00		206,56	76,16	<b>V1</b>	100,00	105,83	75,47	8,89
<b>V2</b>	100,00	123,17	26,77	8,23	<b>V2</b>	100,00	67,83	54,74	15,20
<b>V3</b>	100,00	100,38	48,55	59,38	<b>V3</b>	100,00	56,12	20,88	4,53
<b>V4</b>	100,00	106,37	67,95	14,10	<b>V4</b>	100,00	103,86	40,87	8,45
<b>V5</b>	100,00	58,54	28,01	28,42	<b>V5</b>	100,00	199,59	69,59	8,60
<b>MW</b>	100,00	97,12	75,57	37,26	<b>MW</b>	100,00	106,65	52,31	9,13
<b>SEM</b>		11,89	30,06	11,76	<b>SEM</b>		22,54	8,85	1,53
<b>n</b>	5	4	5	5	<b>n</b>	5	5	5	5
IL-4 [%] normiert					IL-4 [%] normiert				
<b>V1</b>	100,00		110,94	72,19	<b>V1</b>	100,00	108,11	102,14	103,63
<b>V2</b>	100,00	116,54	98,52	83,70	<b>V2</b>	100,00	104,59	69,68	39,67
<b>V3</b>	100,00	108,16	87,35	68,23	<b>V3</b>	100,00	115,43	112,81	44,19
<b>V4</b>	100,00	122,07	98,31	77,08	<b>V4</b>	100,00	113,72	94,88	33,19
<b>V5</b>	100,00	77,55	78,94	82,80	<b>V5</b>	100,00	74,52	86,56	48,47
<b>MW</b>	100,00	106,08	94,81	76,80	<b>MW</b>	100,00	103,27	93,21	53,83
<b>SEM</b>		8,60	4,87	2,67	<b>SEM</b>		6,66	6,52	11,36
<b>n</b>	5	4	5	5	<b>n</b>	5	5	5	5
IL-13 [%] normiert					IL-13 [%] normiert				
<b>V1</b>	100,00	112,05	82,89	43,58	<b>V1</b>	100,00	144,20	119,29	87,54
<b>V2</b>	100,00	111,99	100,26	34,39	<b>V2</b>	100,00	99,43	72,94	91,59

V3	100,00	61,75	113,24	29,41	V3	100,00	131,72	90,20	28,87
					V4	100,00	109,52	99,96	52,76
					V5	100,00	128,94	101,41	49,60
MW	100,00	95,27	98,80	35,79	MW	100,00	122,76	96,76	62,07
SEM		13,68	7,18	3,39	SEM		7,20	6,78	10,71
n	3	3	3	3	n	5	5	5	5

### Daten zur Abbildung 3.20 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand von MNC der Milz

Zytokinsekretion der MNZ nach *in vitro* Kultur:

IFN- $\gamma$ [pg/ml]									
Stamm	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c
Quelle MNZ	Milz	Milz	Milz	Milz	Milz	Milz	Milz	Milz	Milz
$\alpha$ -GalCer [ $\mu$ g/ml]	0	0	0	0	5	5	5	5	
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	0,1	0,3	0,6	0	0,1	0,3	0,6	
V1	0,00	0,00	17,66	75,38	2205,53	1957,34	2110,77	1061,19	
V2	21,15	84,35	94,58	96,68	1249,23	2001,52	976,98	124,13	
V3	25,32	53,79	86,86	90,98	1682,92	1983,16	560,04	186,51	
V4	192,42	63,77	78,08	48,72	3336,20	2706,30	972,53	814,19	
V5	62,91	51,09	73,02	48,07	1570,84	985,81	427,96	318,96	
V6	154,38	57,30	44,64	68,59	5522,48	2953,00	1901,03	573,82	
MW	76,03	51,72	65,81	71,40	2594,53	2097,86	1158,22	513,13	
SEM	29,45	10,44	10,85	7,65	600,07	257,14	259,14	138,48	
n	6	6	6	6	6	6	6	6	
IL-4 [pg/ml]									
V1	0,51	0,19	0,29	0,06	304,74	345,09	349,46	336,96	
V2	0,59	1,37	2,79	3,45	46,08	45,56	37,73	34,21	
V3	19,57	10,46	7,44	3,02	97,51	71,20	71,77	45,33	
V4	8,14	6,67	5,97	1,19	140,01	140,53	117,43	84,35	
V5	32,59	6,46	5,27	2,20	110,55	96,19	100,33	57,38	
MW	12,28	5,03	4,35	1,98	139,78	139,71	135,34	111,65	
SEM	5,51	1,69	1,13	0,55	39,31	48,01	49,38	50,93	
n	5	5	5	5	5	5	5	5	
IL-13 [pg/ml]									
V1	3,48	1,30	0,53	3,19	4987,80	5396,71	4444,58	2566,49	
V2	0,15	0,47	0,69	1,22	1602,02	866,28	230,34	85,48	
V3	4,78	2,79	2,71	0,00	184,44	219,52	174,31	242,60	
V4	38,15	28,05	26,97	16,20	913,62	722,87	752,41	542,65	
V5	25,39	16,52	35,71	19,84	2516,74	2793,05	2871,58	2154,49	
V6	21,02	23,90	13,64	13,75	859,68	644,94	690,10	387,20	
MW	15,50	12,17	13,37	9,03	1844,05	1773,90	1527,22	996,49	
SEM	5,62	4,57	5,59	3,19	645,14	741,29	648,32	400,74	
n	6	6	6	6	6	6	6	6	

Messwert unterhalb der Detektionsgrenze: IFN- $\gamma$  < 31,3 ng/ml; IL-4 < 7,8 ng/ml; IL-13 < 7,8 ng/ml

## Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.20

IFN- $\gamma$ [pg/ml]								
Stamm	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Quelle MNZ	Milz	Milz	Milz	Milz	Milz	Milz	Milz	Milz
$\alpha$ -GalCer [ $\mu$ g/ml]	0	0	0	0	5	5	5	5
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	0,1	0,3	0,6	0	0,1	0,3	0,6
V1	0,00	0,00	31,44	46,17	356,01	455,30	276,23	50,26
V2	0,00	0,00	0,00	0,00	504,16	292,25	107,24	70,37
V3	0,00	4,48	0,00	0,00	388,04	254,95	400,92	112,22
V4	98,33	72,59	77,16	115,55	3408,71	2557,32	1719,99	363,08
V5	49,55	35,57	37,43	16,39	5585,18	4960,85	2699,44	1447,10
V6	134,90	121,41	61,65	43,19	1607,38	1492,43	635,97	327,57
MW	47,13	39,01	34,61	36,88	1974,91	1668,85	973,30	395,10
SEM	21,73	18,38	11,73	16,21	791,04	687,68	380,59	198,37
n	6	6	6	6	6	6	6	6
IL-4 [pg/ml]								
V1	2,86	3,52	4,65	5,70	15,52	13,56	11,23	8,21
V2	0,00	0,11	0,00	0,00	5,30	7,25	3,25	4,16
V3	10,43	10,10	10,64	3,58	29,50	23,98	20,96	13,78
V4	3,54	0,87	2,03	0,00	17,47	17,95	16,54	10,12
V5	22,99	14,19	17,62	6,96	39,29	31,46	34,09	24,14
MW	7,96	5,76	6,99	3,25	21,42	18,84	17,21	12,08
SEM	3,69	2,46	2,87	1,28	5,27	3,73	4,60	3,03
n	5	5	5	5	5	5	5	5
IL-13 [pg/ml]								
V1	0,00	0,00	0,00	3,31	57,46	92,86	93,36	87,73
V2					193,18	203,72	140,34	114,12
V3	76,39	68,83	75,27	48,18	1167,29	966,69	1286,28	979,90
V4	13,46	7,90	10,10	0,00	513,55	507,06	499,50	268,57
V5	16,26	19,16	26,94	19,15	769,67	579,40	660,20	433,72
MW	26,53	23,97	28,08	17,66	540,23	469,95	535,94	376,81
SEM	14,72	13,39	14,45	9,53	178,89	137,58	193,10	145,77
n	4	4	4	4	5	5	5	5

Messwert unterhalb der Detektionsgrenze: IFN- $\gamma$  < 31,3 ng/ml; IL-4 < 7,8 ng/ml; IL-13 < 7,8 ng/ml

## Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.20

IFN- $\gamma$ [%] normiert					IFN- $\gamma$ [%] normiert				
Stamm	BALB/c	BALB/c	BALB/c	BALB/c	Stamm	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
Quelle MNZ	Milz	Milz	Milz	Milz	Quelle MNZ	Milz	Milz	Milz	Milz
$\alpha$ -GalCer [ $\mu$ g/ml]	5	5	5	5	$\alpha$ -GalCer [ $\mu$ g/ml]	5	5	5	5
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	0,1	0,3	0,6	Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	0,1	0,3	0,6

V1	100,00	88,75	95,70	48,11	V1	100,00	127,89	77,59	14,12
V2	100,00	160,22	78,21	9,94	V2	100,00	57,97	21,27	13,96
V3	100,00	117,84	33,28	11,08	V3	100,00	65,70	103,32	28,92
V4	100,00	81,12	29,15	24,40	V4	100,00	75,02	50,46	10,65
V5	100,00	62,76	27,24	20,31	V5	100,00	88,82	48,33	25,91
V6	100,00	53,47	34,42	10,39	V6	100,00	92,85	39,57	20,38
MW	100,00	94,03	49,67	20,71	MW	100,00	84,71	56,76	18,99
SEM		14,69	11,00	5,48	SEM		9,31	10,89	2,72
n	6	6	6	6	n	6	6	6	6
IL-4 [%] normiert					IL-4 [%] normiert				
V1	100,00	113,24	114,67	110,57	V1	100,00	87,37	72,36	52,90
V2	100,00	98,87	81,88	74,24	V2	100,00	136,79	61,32	78,49
V3	100,00	73,02	73,60	46,49	V3	100,00	81,29	71,05	46,71
V4	100,00	100,37	83,87	60,25	V4	100,00	102,75	94,68	57,93
V5	100,00	87,01	90,76	51,90	V5	100,00	80,07	86,77	61,44
MW	100,00	94,50	88,96	68,69	MW	100,00	97,65	77,23	59,49
SEM	0	6,07	6,25	10,26	SEM		9,47	5,33	4,79
n	5	5	5	5	n	5	5	5	5
IL-13 [%] normiert					IL-13 [%] normiert				
V1	100,00	108,20	89,11	51,46	V1	100,00	161,61	162,48	152,68
V2	100,00	54,07	14,38	5,34	V2	100,00	105,46	72,65	59,07
V3	100,00	119,02	94,51	131,53	V3	100,00	82,81	110,19	83,95
V4	100,00	79,12	82,35	59,40	V4	100,00	98,74	97,26	52,30
V5	100,00	110,98	114,10	85,61	V5	100,00	75,28	85,78	56,35
V6	100,00	75,02	80,27	45,04					
MW	100,00	91,07	79,12	63,06	MW	100,00	104,78	105,67	80,87
SEM		9,49	12,65	15,81	SEM		13,59	13,86	16,80
n	6	6	6	6	n	5	5	5	5

### Daten zur Abbildung 3.21 Zytokinbestimmung im Zellkulturüberstand von DN32.D3 Zellen nach Kokultur mit $\alpha$ -GalCer beladenen cDC

Zytokinsekretion des NKT Zell-Hybridoms DN32.D3 nach *in vitro* Kokultur mit *Bet.*-APE stimulierten cDC:

IFN- $\gamma$ [pg/ml]								
NKT Zell-Hybridom	DN32.D3	DN32.D3	DN32.D3	DN32.D3	DN32.D3	DN32.D3	DN32.D3	DN32.D3
Stamm DC	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57/BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
$\alpha$ -GalCer [ $\mu$ g/ml]	0	0	0	0	5	5	5	5
<i>Bet.</i> -APE (Pollen [mg/ml])	0	0,3	1	2,5	0	0,3	1	2,5
V1	0,00	0,00	19,60	49,62	102,30	112,44	98,52	44,54
V2	0,00	0,00	0,00	0,00	623,13	550,66	279,04	199,91
V3	0,00	0,00	0,00	0,00	1156,35	988,77	512,45	250,51
V4	0,00	0,00	0,00	0,00	277,04	363,21	108,56	201,87
V5	75,68				143,66	112,10	89,15	60,86

<b>V6</b>	176,36	70,76	8,76	9,29	551,30	295,75	234,00	399,32
<b>V7</b>	29,87	13,31	31,29	0,00	1042,55	803,21	554,67	735,06
<b>MW</b>	40,27	14,01	9,94	9,82	556,62	460,88	268,06	270,30
<b>SEM</b>	23,20	10,55	4,85	7,40	146,76	118,13	68,41	82,99
<b>n</b>	7	6	6	6	7	7	7	7
<b>IL-4 [pg/ml]</b>								
<b>V1</b>	5,92	8,25	5,04	2,34	191,83	127,55	101,11	84,59
<b>V2</b>	17,41	16,52	14,94	14,84	713,50	522,50	349,95	342,99
<b>V3</b>	10,94	10,28	9,73	6,04	724,05	695,61	631,22	534,71
<b>V4</b>	2,12	8,59	2,68	3,38	1998,76	1448,21	684,71	673,94
<b>V5</b>	53,22				1505,97	1440,60	1232,38	1275,46
<b>V6</b>	24,46	25,71	20,72	20,05	821,63	597,45	589,72	625,83
<b>V7</b>	73,78	43,79	39,10	37,88	1099,28	1026,60	850,97	889,90
<b>MW</b>	26,84	18,86	15,37	14,09	1007,86	836,93	634,29	632,49
<b>SEM</b>	9,36	5,18	4,98	5,05	207,32	172,23	125,71	133,63
<b>n</b>	7	6	6	6	7	7	7	7
<b>IL-13 [pg/ml]</b>								
<b>V1</b>	33,95	34,44	73,45	79,07	33400,00	21900,00	13400,00	12200,00
<b>V2</b>	304,19	216,62	261,91	150,22	3939,30	3573,98	3090,09	3149,76
<b>V3</b>	75,46	55,01	64,46	27,61	4066,58	3798,12	2890,77	2962,71
<b>V4</b>	509,46				3574,06	3158,37	3075,39	2969,40
<b>V5</b>	218,57	233,42	239,94	154,40	4240,14	3584,68	3376,51	3050,59
<b>V6</b>	1254,51	849,49	1211,48	746,31	9372,08	9117,96	7715,98	4300,79
<b>MW</b>	399,36	277,80	370,25	231,52	9765,36	7522,19	5591,46	4772,21
<b>SEM</b>	168,62	132,88	191,62	117,03	4390,74	2755,16	1583,54	1369,46
<b>n</b>	6	5	5	5	6	6	6	6
Messwert unterhalb der Detektionsgrenze: IFN- $\gamma$ < 31,3 ng/ml; IL-4 < 7,8 ng/ml; IL-13 < 7,8 ng/ml								

### Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.21

IFN- $\gamma$ [%] normiert				
NKT Zell-Hybridom	DN32.D3	DN32.D3	DN32.D3	DN32.D3
Stamm DC	C57/BL/6	C57BL/6	C57BL/6	C57BL/6
$\alpha$ -GalCer [ $\mu$ g/ml]	5	5	5	5
Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	0	0,3	1	2,5
<b>V1</b>	100,00	109,91	96,30	43,54
<b>V2</b>	100,00	88,37	44,78	32,08
<b>V3</b>	100,00	85,51	44,32	21,66
<b>V4</b>	100,00	131,10	39,19	72,87
<b>V5</b>	100,00	78,03	62,06	42,36
<b>V6</b>	100,00	53,65	42,45	72,43
<b>V7</b>	100,00	77,04	53,20	70,51
<b>MW</b>	100,00	89,09	54,61	50,78

<b>SEM</b>		8,73	6,98	7,38
<b>n</b>	7	7	7	7
<b>IL-4 [%] normiert</b>				
<b>V1</b>	100,00	66,49	52,71	44,10
<b>V2</b>	100,00	73,23	49,05	48,07
<b>V3</b>	100,00	96,07	87,18	73,85
<b>V4</b>	100,00	72,46	34,26	33,72
<b>V5</b>	100,00	95,66	81,83	84,69
<b>V6</b>	100,00	72,72	71,77	76,17
<b>V7</b>	100,00	93,39	77,41	80,95
<b>MW</b>	100,00	81,43	64,89	63,08
<b>SEM</b>		4,53	6,89	7,17
<b>n</b>	7	7	7	7
<b>IL-13 [%] normiert</b>				
<b>V1</b>	100,00	65,57	40,12	36,53
<b>V2</b>	100,00	90,73	78,44	79,96
<b>V3</b>	100,00	93,40	71,09	72,86
<b>V4</b>	100,00	88,37	86,05	83,08
<b>V5</b>	100,00	84,54	79,63	71,95
<b>V6</b>	100,00	97,29	82,33	45,89
<b>MW</b>	100,00	86,65	72,94	65,04
<b>SEM</b>		4,17	6,27	7,14
<b>n</b>	6	6	6	6

### Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.21

Zytokinsekretion des *Bet.*-APE stimulierten NKT Zell-Hybridoms DN32.D3 nach *in vitro* Kokultur mit cDC:

<b>IFN-<math>\gamma</math> [pg/ml]</b>								
<b>NKT Zell-Hybridom</b>	<b>DN32.D3</b>	<b>DN32.D3</b>	<b>DN32.D3</b>	<b>DN32.D3</b>	<b>DN32.D3</b>	<b>DN32.D3</b>	<b>DN32.D3</b>	<b>DN32.D3</b>
<b><i>Bet.</i>-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,6</b>	<b>0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,6</b>
<b>Stamm cDC</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>
<b><math>\alpha</math>-GalCer [<math>\mu</math>g/ml]</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>0</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>V1</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	861,27	796,58	764,57	440,94
<b>V2</b>	0,00	0,00	2,00	5,50	571,99	429,45	339,29	286,70
<b>V3</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	490,63	251,72	236,44	162,27
<b>MW</b>	0,00	0,00	0,67	1,83	641,30	492,58	446,77	296,64
<b>SEM</b>	0,00	0,00	0,54	1,50	91,83	130,99	131,99	65,81
<b>n</b>	3	3	3	3	3	3	3	3
<b>IL-4 [pg/ml]</b>								
<b>V1</b>	5,95	5,62	5,83	5,60	1374,41	1325,47	1043,33	1360,73
<b>V2</b>	5,11	1,31	5,68	2,93	827,45	712,60	739,75	905,46
<b>V3</b>	0,00	0,00	0,00	0,00	1317,82	1335,58	1430,32	1443,96
<b>V4</b>	16,85	7,64	21,00	10,15	919,21	874,68	873,66	837,03
<b>MW</b>	6,98	3,64	8,13	4,67	1109,72	1062,08	1021,77	1136,80



<b>SEM</b>	3,07	1,55	3,90	1,87	119,72	137,26	129,63	134,13
<b>n</b>	4	4	4	4	4	4	4	4
<b>IL-13 [pg/ml]</b>								
<b>V1</b>	2,08	2,09	10,56	76,64	7432,96	10700,00	11500,00	12500,00
<b>V2</b>	31,87	33,62	81,90	124,02	4011,40	4110,40	3705,75	3628,14
<b>V3</b>	113,99	100,63	110,70	139,00	10200,00	10300,00	11400,00	10100,00
<b>V4</b>	149,31	155,26	269,06	375,86	10400,00	9550,45	10600,00	10000,00
<b>MW</b>	74,31	72,90	118,06	178,88	8011,09	8665,21	9301,44	9057,04
<b>SEM</b>	29,81	29,70	47,25	58,02	1294,94	1330,95	1624,72	1645,14
<b>n</b>	4	4	4	4	4	4	4	4

Messwert unterhalb der Detektionsgrenze: IFN- $\gamma$  < 31,3 ng/ml; IL-4 < 7,8 ng/ml; IL-13 < 7,8 ng/ml

<b>IFN-<math>\gamma</math> [%] normiert</b>				
<b>NKT Zell-Hybridom</b>	<b>DN32.D3</b>	<b>DN32.D3</b>	<b>DN32.D3</b>	<b>DN32.D3</b>
<b>Bet.-APE (Pollen [mg/ml])</b>	<b>0</b>	<b>0,1</b>	<b>0,3</b>	<b>0,6</b>
<b>Stamm cDC</b>	<b>C57/BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>	<b>C57BL/6</b>
<b><math>\alpha</math>-GalCer [<math>\mu</math>g/ml]</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>	<b>5</b>
<b>V1</b>	100,00	92,49	88,77	51,20
<b>V2</b>	100,00	75,08	59,32	50,12
<b>V3</b>	100,00	51,31	48,19	33,07
<b>MW</b>	100,00	72,96	65,43	44,80
<b>SEM</b>		9,75	9,88	4,79
<b>n</b>	3	3	3	3
<b>IL-4 [%] normiert</b>				
<b>V1</b>	100,00	96,44	75,91	99,00
<b>V2</b>	100,00	86,12	89,40	109,43
<b>V3</b>	100,00	101,35	108,54	109,57
<b>V4</b>	100,00	95,16	95,04	91,06
<b>MW</b>	100,00	94,77	92,22	102,27
<b>SEM</b>		2,75	5,85	3,88
<b>n</b>	4	4	4	4
<b>IL-13 [%] normiert</b>				
<b>V1</b>	100,00	143,95	154,72	168,17
<b>V2</b>	100,00	102,47	92,38	90,45
<b>V3</b>	100,00	100,98	111,76	99,02
<b>V4</b>	100,00	91,83	101,92	96,15
<b>MW</b>	100,00	109,81	115,20	113,45
<b>SEM</b>		10,07	11,91	15,87
<b>n</b>	4	4	4	4

### Daten zur Abbildung 3.22 Analyse der Expression von CD1d auf C57BL/6 cDC nach Bet.-APE Behandlung

#### MFI CD1d

Stamm cDC	Aktivierung cDC	Bet.-APE (Pollen [mg/ml])	V1	V2	MW	SEM
C57BL/6	unbehandelt	0	35,67	31,57	33,62	1,45

C57BL/6	unbehandelt	0,3	35,65	31,66	33,655	1,41
C57BL/6	unbehandelt	1	31,56	27,85	29,705	1,31
C57BL/6	unbehandelt	2,5	28,84	25,2	27,02	1,29
C57BL/6	LPS	0	52,23	45,69	48,96	2,31
C57BL/6	LPS	0,3	49,46	42,28	45,87	2,54
C57BL/6	LPS	1	51,38	44,04	47,71	2,60
C57BL/6	LPS	2,5	50,82	45,17	47,995	2,00
C57BL/6	CpG	0	41,32	41,48	41,4	0,06
C57BL/6	CpG	0,3	42,01	39,38	40,695	0,93
C57BL/6	CpG	1	43,69	39	41,345	1,66
C57BL/6	CpG	2,5	39,82	37,52	38,67	0,81

**Daten zur Abbildung 3.23 Analyse der Atemwegsentzündung von C57BL/6 wt Mäusen nach Immuntherapie**

**BAL Zellzahl ( $\times 10^6$ )**

IT	PBS	OVA	BSA
Tier 1	5,03	0,18	7,83
Tier 2	1,92	0,18	1,39
Tier 3	3,00	0,13	6,70
Tier 4	3,92	0,98	11,37
Tier 5		0,31	2,96
MW	3,47	0,35	6,05
SD	1,15	0,32	3,55
<b>Makrophagen (%)</b>			
IT	PBS	OVA	BSA
Tier 1	10,05	63,88	17,96
Tier 2	19,39	88,83	14,74
Tier 3	17,14	74,59	13,51
Tier 4	14,69	30,29	9,85
Tier 5		56,36	16,84
MW	15,32	62,79	14,58
SD	3,47	19,58	2,83
<b>Eosinophile (%)</b>			
IT	PBS	OVA	BSA
Tier 1	76,88	26,30	73,17
Tier 2	72,66	5,71	78,85
Tier 3	71,87	9,73	82,23
Tier 4	71,49	63,46	80,08
Tier 5		28,41	72,77
MW	73,23	26,72	77,42
SD	2,15	20,41	3,79

## Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.23

IL-5 [pg/ml]				IL-13 [pg/ml]			
IT	PBS	OVA	BSA	IT	PBS	OVA	BSA
Tier 1	211,34	70,39	127,95	Tier 1	161,39	5,39	111,43
Tier 2	122,34	72,98	133,71	Tier 2	19,85	9,12	59,27
Tier 3	204,30	75,24	172,92	Tier 3	99,16	6,21	125,34
Tier 4	136,22	58,88	131,35	Tier 4	44,64	10,06	126,23
Tier 5		76,34	163,99	Tier 5		6,65	109,86
MW	168,55	70,77	145,98	MW	81,26	7,49	106,43
SD	39,65	6,28	18,65	SD	54,44	1,79	24,54

## Daten zur Abbildung 3.24 Bestimmung von OVA-spezifischen Immunglobulinen in Serum von C57BL/6 wt Mäusen

## OVA spez. IgG1 [ng/ml]

	Tag Serumnahme	Tier 1	Tier 2	Tier 3	Tier 4	Tier 5	MW	SD
IT (PBS)	d0	37,94	44,54	47,34	49,62		44,86	4,38
	d14	4988,74	8391,92	9221,48	7880,63		7620,69	1593,11
	d28	496232	574274	680276	396020		536700	104229
	d42	1336893	344002	1047323	1002674		932723	363308
	d53	2787810	1494160	1657791	1608374		1887034	523438
	d60	1011463	1413301	1384342	1126322		1233857	170197
IT (OVA)	d0	0	43,56	96,96	0	52,22	38,548	36,32
	d14	9564,75	2694,82	7583,45	8217,06	5011,25	6614,27	2455,42
	d28	431534	89504	662140	559121	347867	418033	196230
	d42	896219	219338	731356	521326	559468	585542	226579
	d53	3080215	2794663	6187032	4294092	3392837	3949768	1226741
	d60	1806627	1971936	1077417	2253180	3488361	2119504	787052
IT (BSA)	d0	47,77	43,88	48,46	0	0	28,022	22,93
	d14	15449,35	4333,27	11936,41	8300,84	9904,9	9984,95	3700,05
	d28	477561	488000	457082	308570	274280	401098	90749
	d42	411413	1723515	856098	705233	485671	836386	470785
	d53	1747512	1513349	2234804	922229	603168	1404212	582001
	d60	1398257	724246	2503305	1020788	1087717	1346863	616625

## Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.24

## OVA spez. IgE [ng/ml]

IT	IT (PBS)	IT (OVA)	IT (BSA)
Tier 1	77,98	8,33	238,86
Tier 2	340,85	67,69	215,31
Tier 3	98,05	7,71	371,38
Tier 4	25,23	18,89	63,49
Tier 5		0,00	33,92

MW	135,53	20,53	184,59
SD	121,49	24,34	123,41

### Daten zur Abbildung 3.25 Analyse der Atemwegsentzündung von C57BL/6 IL-10 k.o. Mäusen nach Immuntherapie

IL-10 k.o. IT	BAL Zellzahl (x10 <sup>6</sup> )		IL-10 k.o. IT	Makrophagen (%)		IL-10 k.o. IT	Eosinophile (%)	
	PBS	OVA		PBS	OVA		PBS	OVA
Tier 1	6,62	4,63	Tier 1	7,40	12,60	Tier 1	73,30	72,20
Tier 2	9,60	9,13	Tier 2	4,60	10,70	Tier 2	81,40	79,20
Tier 3	9,44	7,80	Tier 3	7,10	15,40	Tier 3	79,20	70,10
Tier 4	4,72	5,66	Tier 4	13,50	10,40	Tier 4	70,70	77,20
Tier 5	5,42	1,77	Tier 5	10,30	26,80	Tier 5	82,10	47,30
Tier 6	3,19	4,90	Tier 6	24,70	16,70	Tier 6	49,00	62,80
Tier 7	13,55	4,06	Tier 7	9,60	17,60	Tier 7	86,80	55,30
Tier 8	4,75		Tier 8	15,90		Tier 8	65,60	
Tier 9	13,64		Tier 9	12,40		Tier 9	80,60	
Tier 10	2,36		Tier 10	11,90		Tier 10	73,80	
Tier 11	10,76		Tier 11	5,30		Tier 11	82,10	
MW	7,64	5,42	MW	11,15	15,74	MW	74,96	66,30
SD	3,79	2,25	SD	5,43	5,22	SD	10,08	10,88

IL-10 k.o. IT	IL-5 [pg/ml]		IL-10 k.o. IT	IL-13 [pg/ml]	
	PBS	OVA		PBS	OVA
Tier 1	4,68	3,82	Tier 1	63,80	38,69
Tier 2	17,85	1,60	Tier 2	77,27	48,42
Tier 3	28,90	5,45	Tier 3	59,84	70,11
Tier 4	5,16		Tier 4	76,11	
Tier 5	3,98		Tier 5	82,97	
Tier 6	10,37		Tier 6	78,43	
MW	11,82	3,62	MW	73,07	52,41
SD	9,01	1,58	SD	8,31	13,13

### Daten zur Abbildung 3.26 Bestimmung von Immunglobulinen in Serum von C57BL/6 IL-10 k.o. Mäusen

#### OVA spez. IgG1 [ng/ml]

IL-10 k.o. IT (PBS)	Zeitpunkt der Serumnahme					
	d0	d14	d28	d42	d53	d60
Tier 1	406,67	9433,88	39489	1971236	1551408	1519182
Tier 2	52,85	15495,03	7971	975630	1066079	2301058
Tier 3	46,38	7047,14	50825	1320054	827789	1113312
Tier 4	51,66	13096,86	77684	1742247	1577170	1445332
Tier 5	45,91	32342,07	177274	2324702	3302745	1850657
Tier 6	207,96	31481,11	113584	1615979	1452720	1488884

<b>Tier 7</b>	431,83	24044,49	151005	3623458	3200039	3137515
<b>Tier 8</b>	43,64	6562,23	173687	5261762	4458601	3035696
<b>Tier 9</b>	44,77	37725,7	250009	4150646	6509892	4882251
<b>Tier 10</b>	41,74	50,17	24050	2201497	2314908	1768000
<b>Tier 11</b>	48,01	55142,37	889843	4561404	3998840	3885821
<b>MW</b>	129,22	21129,18636	177766	2704420	2750926	2402519
<b>SD</b>	144,32	15844,70	236419	1377578	1660740	1136227
<b>IL-10 k.o.</b>	<b>Zeitpunkt der Serumnahme</b>					
<b>IT (OVA)</b>	<b>d0</b>	<b>d14</b>	<b>d28</b>	<b>d42</b>	<b>d53</b>	<b>d60</b>
<b>Tier 1</b>	50,01	18622,8	94125	5095525	17623694	11992322
<b>Tier 2</b>	85,6	17514,21	56121	3047194	1672804	8762201
<b>Tier 3</b>	80,37	10867,58	20566	1814133	7184920	5587713
<b>Tier 4</b>	69,06	15261,22	76009	962325	2431235	7814986
<b>Tier 5</b>	43,45	12553,67	60801	1316502	11125663	9715891
<b>Tier 6</b>	47,9	46,34	171542	1412734	1182332	6429098
<b>Tier 7</b>	50,55	34976,34	186080	2851494	12737130	9329158
<b>MW</b>	60,99142857	15691,73714	95034,68571	2357129,6	7708254	8518767
<b>SD</b>	15,83	9723,99	56992,64	1332800,91	5884839,49	1988099,80

### Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.26

#### OVA spez. IgE [ng/ml]

<b>IL-10 k.o.</b>	<b>IT</b>	
	<b>IT (PBS)</b>	<b>IT (OVA)</b>
<b>Tier 1</b>	235,11	27,40
<b>Tier 2</b>	39,68	19,22
<b>Tier 3</b>	257,87	213,80
<b>Tier 4</b>	200,62	21,09
<b>Tier 5</b>	72,41	11,47
<b>Tier 6</b>	34,59	23,02
<b>Tier 7</b>	162,88	20,83
<b>Tier 8</b>	47,423	
<b>Tier 9</b>	138,79	
<b>Tier 10</b>	42,50	
<b>Tier 11</b>	67,25	
<b>MW</b>	118,10	48,12
<b>SD</b>	80,33	67,78

**Daten zur Abbildung 3.27 Analyse der Atemwegsentzündung von C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> Cre<sup>-</sup> und C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäusen nach Immuntherapie und**

**Daten zur Abbildung 3.29 Einfluss der Blockierung des IL-10R auf die Atemwegsentzündung von C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäusen nach Immuntherapie**

IL-10 <sup>FL/FL</sup> Cre <sup>-</sup>		BAL Zellzahl (×10 <sup>6</sup> )		IL-10 <sup>FL/FL</sup> CD4-Cre <sup>+</sup>		BAL Zellzahl (×10 <sup>6</sup> )	
IT	PBS I	OVA I	IT	PBS II	OVA II	OVA II +α-IL-10R AK	
Tier 1	5,70	0,20	Tier 1	3,38	0,15	0,88	
Tier 2	3,58	0,16	Tier 2	6,06	0,35	3,19	
Tier 3	4,68	3,42	Tier 3	3,78	0,71	0,19	
Tier 4	8,53	1,34	Tier 4	5,64	0,12	0,62	
Tier 5	6,97	0,33	Tier 5	1,64	0,60	0,25	
Tier 6	6,13	0,19	Tier 6		0,34	1,23	
Tier 7			Tier 7		0,28		
MW	5,93	0,94	MW	4,10	0,36	1,06	
SD	1,58	1,18	SD	1,60	0,21	1,02	

IL-10 <sup>FL/FL</sup> Cre <sup>-</sup>		Makrophagen (%)		IL-10 <sup>FL/FL</sup> CD4-Cre <sup>+</sup>		Makrophagen (%)	
IT	PBS I	OVA I	IT	PBS II	OVA II	OVA II +α-IL-10R AK	
Tier 1	2,14	83,81	Tier 1	16,37	69,80	40,73	
Tier 2	7,08	70,82	Tier 2	4,69	45,42	6,82	
Tier 3	6,39	83,56	Tier 3	8,65	37,86	8,20	
Tier 4	10,80	78,90	Tier 4	4,26	80,88	76,91	
Tier 5	4,25	88,25	Tier 5	11,59	71,55	68,50	
Tier 6	9,47	84,14	Tier 6		78,30	65,76	
Tier 7			Tier 7		66,50	20,20	
MW	6,69	81,58	MW	9,11	64,33	41,02	
SD	2,93	5,52	SD	4,52	15,18	27,61	

IL-10 <sup>FL/FL</sup> Cre <sup>-</sup>		Eosinophile (%)		IL-10 <sup>FL/FL</sup> CD4-Cre <sup>+</sup>		Eosinophile (%)	
IT	PBS I	OVA I	IT	PBS II	OVA II	OVA II +α-IL-10R AK	
Tier 1	55,89	15,29	Tier 1	65,20	5,40	26,83	
Tier 2	72,25	14,41	Tier 2	69,72	19,85	67,53	
Tier 3	11,30	67,70	Tier 3	69,72	28,88	67,60	
Tier 4	24,41	60,33	Tier 4	85,21	4,62	4,82	
Tier 5	62,62	24,07	Tier 5	66,14	11,73	9,60	
Tier 6	89,59	3,17	Tier 6		9,00	4,68	
Tier 7			Tier 7		12,09	39,80	
MW	52,68	30,83	MW	71,20	13,08	31,55	
SD	26,97	24,33	SD	7,24	7,98	25,64	

## Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.27 und Abbildung 3.29

IL-10 <sup>FL/FL</sup> Cre <sup>-</sup>	IL-5 [pg/ml]		IL-10 <sup>FL/FL</sup> CD4-Cre <sup>+</sup>	IL-5 [pg/ml]		
	PBS I	OVA I		PBS II	OVA II	OVA II + $\alpha$ -IL-10R AK
IT			IT			
Tier 1	219,36	43,47	Tier 1	8,62	11,18	1,83
Tier 2	343,92	48,17	Tier 2	10,03	7,73	8,36
Tier 3	172,20	11,94	Tier 3	16,58	3,93	2,83
Tier 4	101,62	4,92	Tier 4	116,57	8,27	3,67
Tier 5		7,46	Tier 5	8,04	16,70	10,33
Tier 6			Tier 6			6,31
MW	209,28	23,19	MW	31,97	9,56	5,56
SD	88,31	18,67	SD	42,41	4,25	3,06

IL-10 <sup>FL/FL</sup> Cre <sup>-</sup>	IL-13 [pg/ml]		IL-10 <sup>FL/FL</sup> CD4-Cre <sup>+</sup>	IL-13 [pg/ml]		
	PBS I	OVA I		PBS II	OVA II	OVA II + $\alpha$ -IL-10R AK
IT			IT			
Tier 1	206,19	59,84	Tier 1	33,24	58,49	24,99
Tier 2	348,31	57,12	Tier 2	49,93	22,67	31,31
Tier 3	157,83	14,54	Tier 3	36,93	14,54	31,31
Tier 4	127,10	33,24	Tier 4	94,78	20,18	17,50
Tier 5			Tier 5	62,50	43,72	65,09
Tier 6			Tier 6			46,89
MW	209,86	41,19	MW	55,48	31,92	36,18
SD	84,76	18,54	SD	22,20	16,56	15,66

Daten zur Abbildung 3.28 Bestimmung von Ova-spezifischen Immunglobulinen in Serum von C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> Cre<sup>-</sup> und C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäusen undDaten zur Abbildung 3.30 Einfluss der Blockierung des IL-10R auf Ova-spezifischen Immunglobulinen im Serum von C57BL/6 IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup> Mäusen

## OVA spez. IgG1 [ng/ml]

IL-10 <sup>FL/FL</sup> Cre <sup>-</sup>	Zeitpunkt der Serumnahme					
	d0	d14	d28	d42	d53	d60
IT (PBS) I						
Tier 1	0,00	42,89	3386,60	3065,74	735312	612641
Tier 2	0,00	479,61	10253,51	11605,11	606864	1884584
Tier 3	0,00	102,89	12604,78	13187,40	104253	884264
Tier 4	0,00	0,00	7339,00	8029,04	25525	344186
Tier 5	0,00	36,39	7959,00	5697,00	62485	118071
Tier 6	0,00	371,35	15867,11	11479,44	334799	1399315
MW	0,00	172,19	9568,33	8843,96	311540	873844
SD	0,00	184,29	3982,00	3591,44	275118	607972

IT (OVA) I	d0	d14	d28	d42	d53	d60
Tier 1	78,26	177,05	5050,93	3073,75	1508575	504966

<b>Tier 2</b>	0,00	165,15	6247,10	8167,79	355890	354435
<b>Tier 3</b>	0,00	70,68	9517,04	9282,57	507391	430777
<b>Tier 4</b>	0,00	0,00	9661,65	9737,07	939197	418775
<b>Tier 5</b>	0,00	0,00	4841,30	4507,54	415614	335672
<b>Tier 6</b>	0,00	1721,48	0,00	199398,50	7095	91295
<b>MW</b>	13,04	82,58	5886,34	39027,87	622294	355987
<b>SD</b>	29,17	76,84	3266,09	71761,37	481540	130517

fehlerhafter Messwert

**OVA spez. IgG1 [ng/ml]**

<b>IL-10<sup>FL/FL</sup> CD4-Cre<sup>+</sup></b>	<b>Zeitpunkt der Serumnahme</b>					
<b>IT (PBS) II</b>	<b>d0</b>	<b>d14</b>	<b>d28</b>	<b>d42</b>	<b>d53</b>	<b>d60</b>
Tier 1	0,00	49,37	39713,31	30523,15	259223	480300
Tier 2	0,00	71,94	12850,49	16244,61	337909	173243
Tier 3	0,00	74,33	3731,70	3738,25	50806	87354
Tier 4	0,00	187,73	27844,20	32899,90	612084	775312
Tier 5	0,00	42,52	5976,96	5457,65	268864	408404
<b>MW</b>	0,00	85,18	18023,33	17772,71	305777	384923
<b>SD</b>	0,00	52,75	13733,38	12184,97	180774	243067
<b>IT (OVA) II</b>	<b>d0</b>	<b>d14</b>	<b>d28</b>	<b>d42</b>	<b>d53</b>	<b>d60</b>
<b>Tier 1</b>	0,00	173,59	0,00	3350,22	64818	78804
<b>Tier 2</b>	0,00	320,98	12552,92	18490,62	1317459	755254
<b>Tier 3</b>	0,00	228,16	15943,84	10216,84	218292	240384
<b>Tier 4</b>	55,66	179,04	7369,96	5766,62	126652	77960
<b>Tier 5</b>	0,00	177,84	6661,37	8027,47	165437	70815
<b>Tier 6</b>	63,49	146,45	14612,74	53792,73	1052184	357410
<b>Tier 7</b>	0,00	174,15	18820,10	10800,85	828272	486241
<b>MW</b>	17,02	200,03	10851,56	15777,91	539016	295267
<b>SD</b>	26,99	54,24	6022,64	16137,47	476643	238863
<b>IT (OVA) II + <math>\alpha</math>-IL-10R AK</b>	<b>d0</b>	<b>d14</b>	<b>d28</b>	<b>d42</b>	<b>d53</b>	<b>d60</b>
<b>Tier 1</b>	0,00	0,00	6918,32	3851,30	442912	271604
<b>Tier 2</b>	0,00	46,23	6003,05	7162,05	550527	134888
<b>Tier 3</b>	0,00	180,98	11440,90	10750,56	617264	139518
<b>Tier 4</b>	0,00	155,39	4155,83	3771,76	105954	131534
<b>Tier 5</b>	0,00	154,42	14716,02	12177,05	1021316	682561
<b>Tier 6</b>	0,00	72,89	5573,30	8625,25	1092454	222995
<b>Tier 7</b>	0,00	64,49	4281,46	11505,54	116668	189572
<b>MW</b>	0,00	96,34	7584,13	8263,36	563871	253239
<b>SD</b>	0,00	62,54	3691,42	3229,32	361741	181806



**Fortsetzung Daten zur Abbildung 3.28 und Abbildung 3.30:**
**OVA spez. IgE [ng/ml]**

IL-10 <sup>FL/FL</sup> Cre <sup>-</sup>	IT		IL-10 <sup>FL/FL</sup> CD4-Cre <sup>+</sup>	IT		
	PBS I	OVA I		PBS II	OVA II	OVA II + $\alpha$ -IL-10R AK
Tier 1	26,56	14,10	Tier 1	24,32	12,00	11,91
Tier 2	47,85	12,92	Tier 2	41,18	49,56	0,00
Tier 3	129,01	13,84	Tier 3	47,31	11,04	21,58
Tier 4	16,83	16,01	Tier 4	127,11	0,00	38,44
Tier 5	26,05	36,14	Tier 5	63,73	0,00	19,19
Tier 6	22,75	0,00	Tier 6		0,00	13,41
Tier 7			Tier 7		13,34	17,24
MW	44,84	15,50	MW	60,73	12,28	17,40
SD	38,85	10,63	SD	35,51	16,23	10,77

**Daten zur Abbildung 3.31 Analyse der Atemwegsentzündung von C57BL/6 NKT Zell defizienten Mäusen nach Immuntherapie**

CD1d k.o.		BAL Zellzahl ( $\times 10^5$ )	CD1d k.o.		Makrophagen (%)	CD1d k.o.		Eosinophile (%)
IT	PBS	OVA	IT	PBS	OVA	IT	PBS	OVA
Tier 1	10,63	0,8750	Tier 1	26,20	66,18	Tier 1	62,47	24,43
Tier 2	20,25	0,3750	Tier 2	12,53	84,25	Tier 2	82,02	9,12
Tier 3	3,23	0,4250	Tier 3	18,48	86,15	Tier 3	71,21	1,88
Tier 4		0,5375	Tier 4		68,19	Tier 4		15,10
Tier 5		0,7750	Tier 5		59,69	Tier 5		26,96
MW	11,37	0,60	MW	19,07	72,89	MW	71,90	15,50
SD	6,97	0,20	SD	5,59	10,45	SD	8,00	9,35

CD1d k.o.		IL-5 [pg/ml]	CD1d k.o.		IL-13 [pg/ml]
IT	PBS	OVA	IT	PBS	OVA
Tier 1	44,15	17,83	Tier 1	9,82	9,05
Tier 2	60,66	10,12	Tier 2	59,77	0,00
Tier 3	63,72	40,63	Tier 3	13,48	19,45
Tier 4		25,38	Tier 4		5,22
Tier 5		29,11	Tier 5		8,55
MW	56,18	24,61	MW	27,69	8,45
SD	8,60	10,33	SD	22,73	6,38

### Daten zur Abbildung 3.32 Bestimmung von OVA-spezifischen Immunglobulinen in Serum von C57BL/6 NKT Zell defizienten Mäusen

#### OVA spez. IgG1 [ng/ml]

CD1d k.o.	Zeitpunkt der Serumnahme					
	d0	d14	d28	d42	d53	d60
IT (PBS)						
Tier 1	0	3668,62	128000	312000	474000	624000
Tier 2	0	3024,35	188000	226000	211000	226000
Tier 3	0	4365,36	176000	959000	1130000	1190000
MW	0	3686,11	164000	499000	605000	680000
SD	0	547,60	25923	327158	386446	395538
IT (OVA)						
Tier 1	0	2779,51	138000	361000	1540000	1220000
Tier 2	3,77	555,26	18600	119000	1150000	1070000
Tier 3	0	999,18	109000	287000	1020000	1210000
Tier 4	0	5693,55	359000	347000	1100000	771000
Tier 5	0	3528,22	193000	713000	2560000	1410000
MW	0,754	2711,144	163520	365400	1474000	1136200
SD	1,51	1851,79	112878	193930	571790	212221

#### OVA spez. IgE [ng/ml]

CD1d k.o.	IT	
	IT (PBS)	IT (OVA)
Tier 1	625,57	16,95
Tier 2	43,91	19,33
Tier 3	129,85	26,34
Tier 4		17,45
Tier 5		21,81
MW	266,44	20,376
SD	256,35	3,44

## 10.2. Exemplarische FACS-Analysen

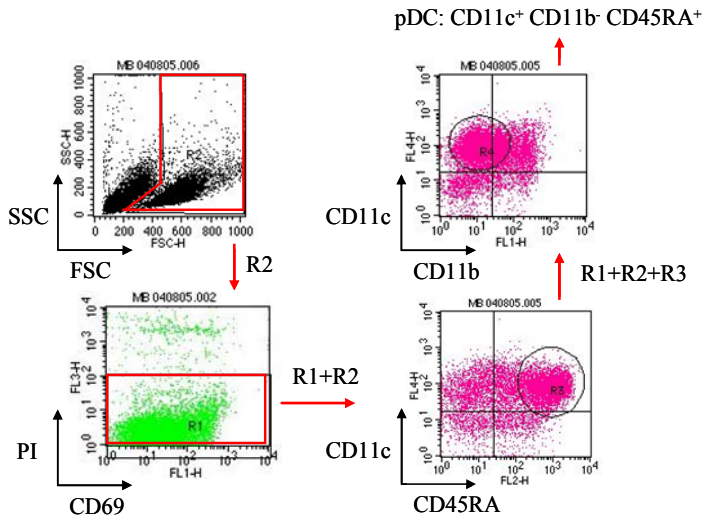


Abbildung 10.1 Bestimmung des prozentualen Anteils an pDC an d8 der Generierung

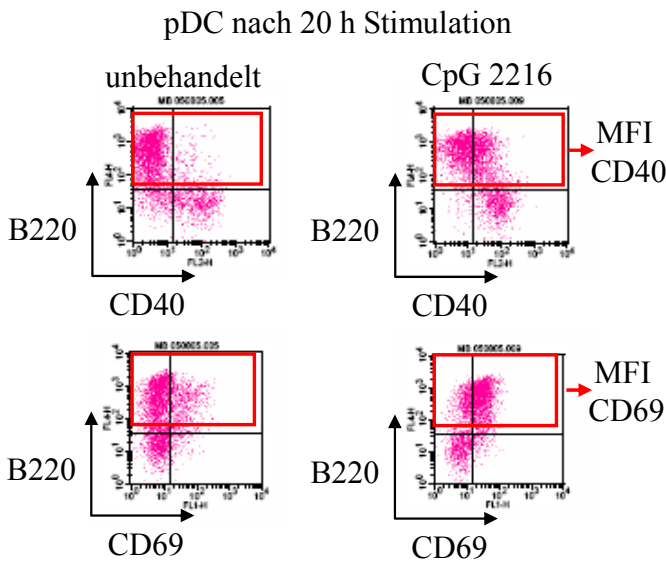


Abbildung 10.2 Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) der Aktivierungsmarker von pDC

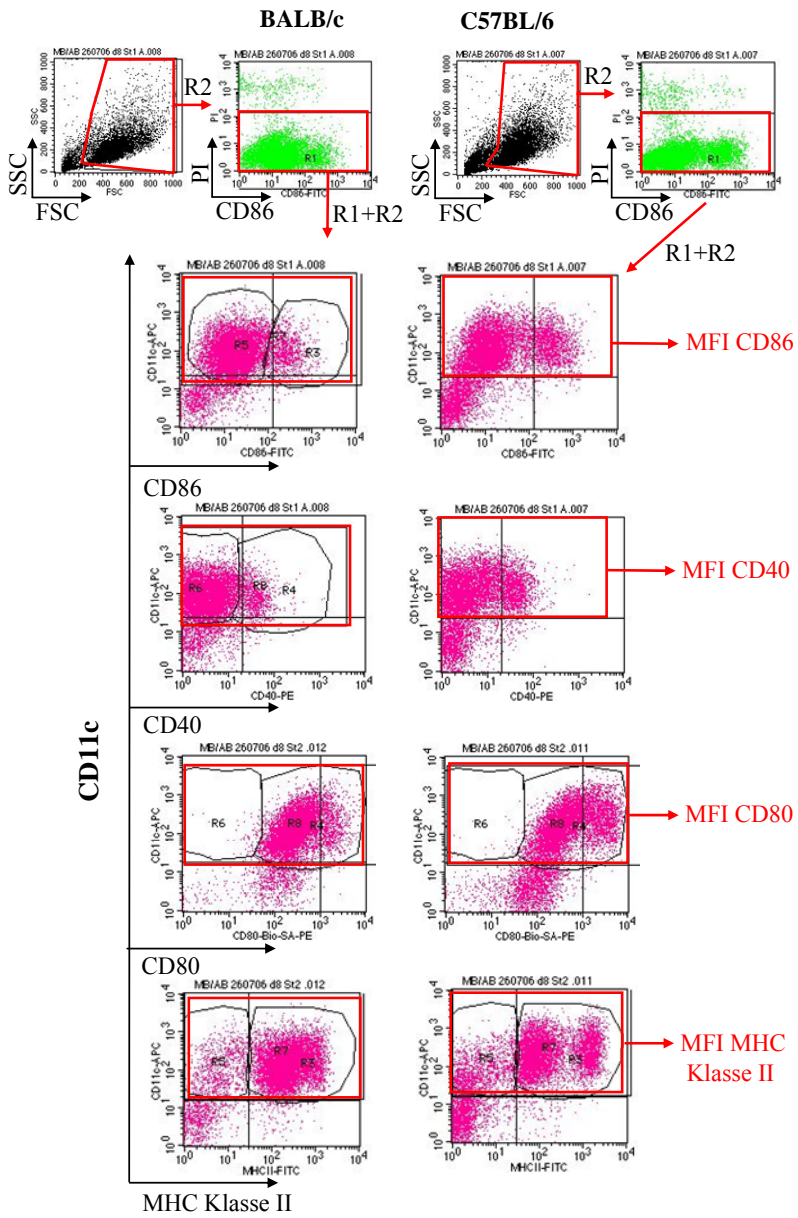


Abbildung 10.3 Bestimmung der mittleren Fluoreszenzintensitäten (MFI) der Aktivierungsmarker von cDC

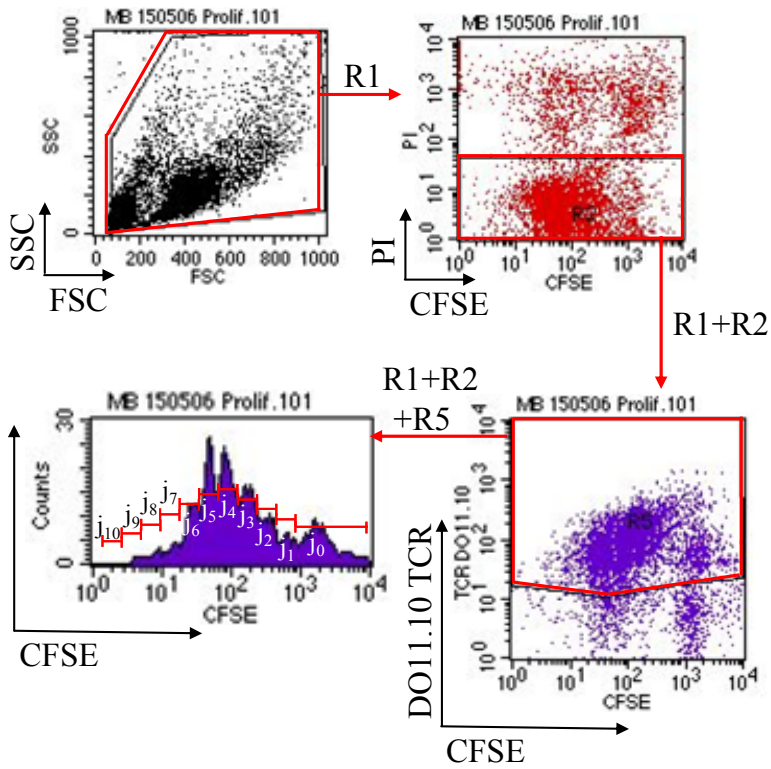


Abbildung 10.4 Bestimmung der Zellteilungsintervalle  $j$  zur Berechnung der Zellteilungen

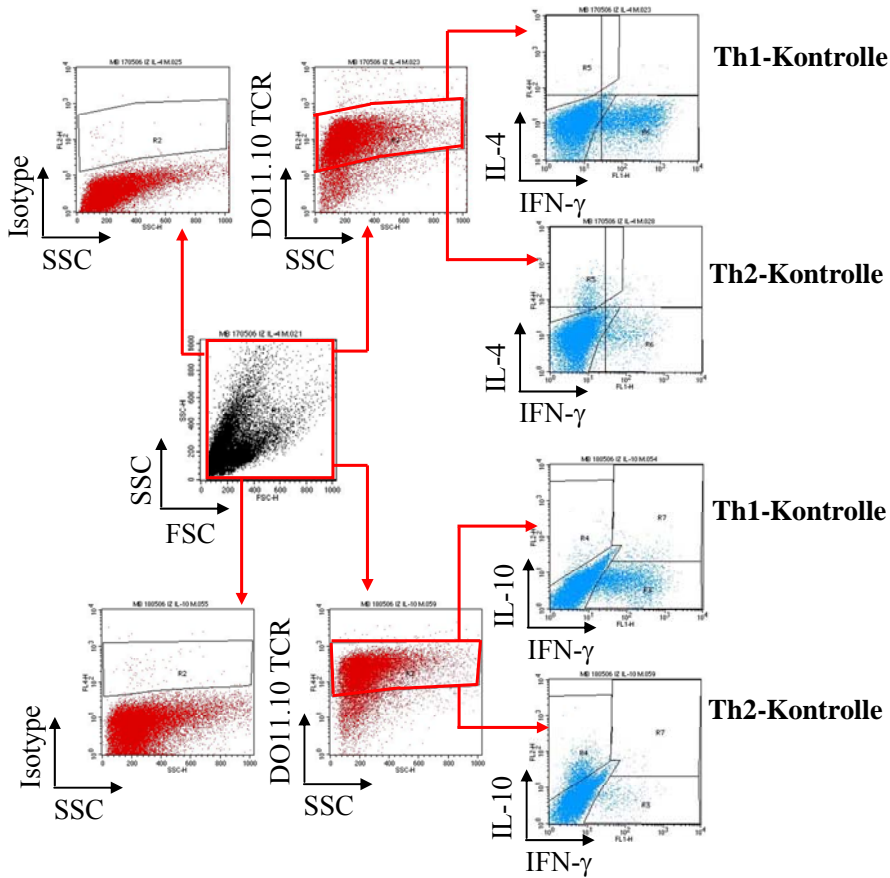


Abbildung 10.5 Bestimmung des Anteils an zytokinproduzierender Zellen nach intrazellulären Zytokinakkumulation

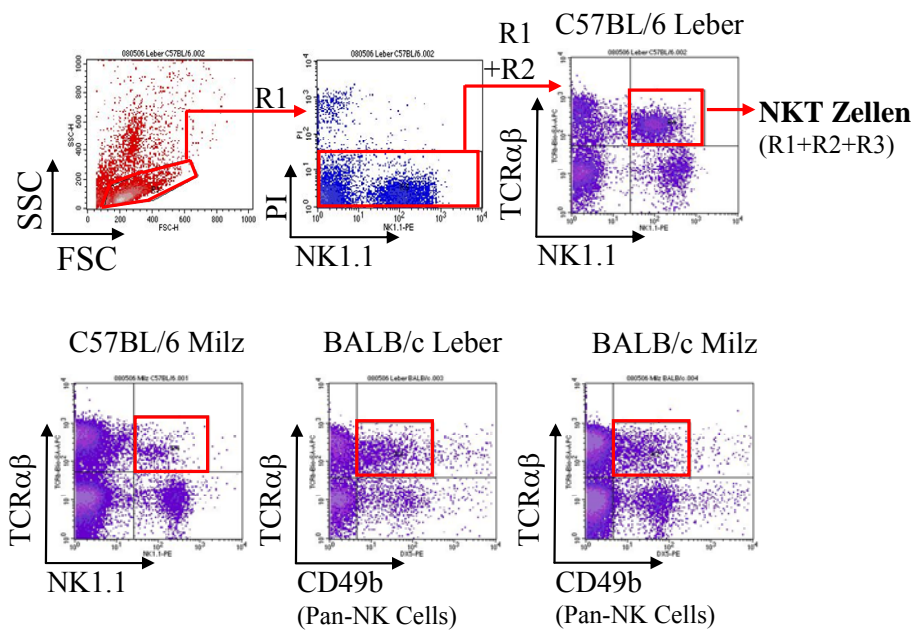


Abbildung 10.6 Bestimmung des prozentualen Anteils an NKT Zellen von Milz und Leber

### 10.3. Endotoxinbestimmung und Mykoplasmen-Test

Tabelle 10.1 Zusammenstellung der Endotoxinkonzentrationen in *Bet.-APE* und OVA

getestete Substanz (Konz.)	Endotoxinkonzentration	SD	Endotox.-spanne
<i>Bet.-APE</i> (10 mg Pollen/ ml)	91 pg/ml (MW)	63 pg/ml	22 - 277 pg/ml
OVA Klasse V (10 µg/ ml)	456 pg/ml		
OVA Klasse VI nach Endotoxinentfernung, 2-fach eluiert	nicht detektierbar		

Von *Bet.-APE* wurden 30 Proben getestet und der Mittelwert (MW) daraus bestimmt (siehe Tabelle 10.1). Die Endotoxinkonzentrationsspanne (Endotox.-spanne) zeigt den niedrigsten und höchsten Wert der 30 getesteten Proben.

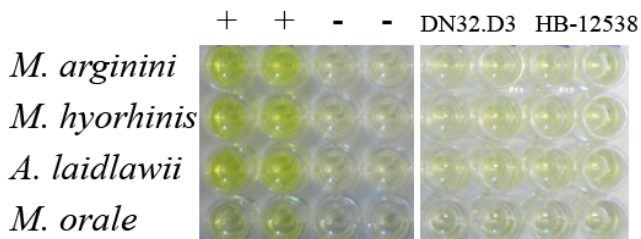


Abbildung 10.7 Test auf Mykoplasmenkontamination in den verwendeten Hybridomen

## DANKSAGUNG

Einen besonderen Dank möchte ich an dieser Stelle an Frau Prof. Heidrun Behrendt richten, die mir die Möglichkeit gab, unter hervorragenden Arbeitsbedingungen auf einem hochinteressanten Themengebiet in der Klinischen Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie am Helmholtz Zentrum München zu promovieren.

Ein weiterer Dank geht an Prof. Dr. Dr. Harun Parlar, der mich vonseiten der Technischen Universität München betreut und meine Promotion durch sein interdisziplinäres Interesse ermöglicht hat.

Auch Prof. Thilo Jakob möchte ich in besonderem Maße für die konstruktiven Ideen und Ratschläge, sowie für die sehr gute fachliche Betreuung und lehrreiche Zeit danken.

Ein besonders großes Dankschön richte ich an Prof. Martin Mempel. Ich danke ihm für seine exzellente Weiterführung der Betreuung meiner Promotion und für die stets aufmunternden Worte gepaart mit unglaublich viel Optimismus sowie seiner fachlichen Expertise.

Weiterhin gilt mein Dank den helfenden Händen im Labor. Martin Skerhut möchte ich für seine umfangreiche und flexible Unterstützung bei den tierexperimentellen Versuchen danken. Bettina Maar und Britta Dorn danke ich für die praktischen Tipps und die intensive Hilfe bei zahlreichen Analysen. Auch bei Johanna Grosch und Ulrike Rothenhäusler bedanke ich mich für die Hilfestellung im Labor.

Ich danke Andrea Braun für die gute Teamarbeit und Hilfsbereitschaft sowie für die persönliche Kommunikation und die gemeinsamen Aktivitäten.

Auch Jan Gutermuth, Francesca Alessandrini und Antonio Aguilar möchte ich für interessante thematische Anregungen sowie für Hilfestellungen beim tierexperimentellen Teil danken.

Ein liebes Dankeschön geht an meine Freundin Cosima Schmidt, die immer ein offenes Ohr für mich hatte und mich in der letzten Phase meiner Arbeit sehr unterstützt hat.

Meinen Schwiegereltern möchte ich auf diesem Wege ebenfalls meinen Dank für ihre Hilfsbereitschaft und ihre Unterstützung aussprechen.

Herzlich danke ich meinen Eltern, die mir insbesondere in der letzten Phase der Arbeit zur Seite standen. Ich danke ihnen, dass sie mir diesen Lebensweg ermöglicht haben.

Abschließend möchte ich meinem Mann Sebastian Bewersdorff meinen besonderen Dank und Anerkennung für sein Verständnis mir und meiner Arbeit gegenüber, wenn es mal wieder länger gedauert hat...aussprechen. Ohne seine 100% Unterstützung, seine aufmunternden Worte in schwierigen Phasen und seine unglaubliche Geduld hätte ich diese Arbeit nicht in dieser Form fertig stellen können. DANKE





## PUBLIKATIONEN & KONFERENZEN

### PUBLIKATIONEN

- 10/ 2009 "Differential impact of diesel particle composition on pro-allergic dendritic cell function", Braun A, Bewersdorff M, Lintelmann J, Matuschek G, Jakob T, Göttlicher M, Schober W, Buters JT, Behrendt H, and Mempel M. 2009. *Toxicological Sciences* [Epub ahead of print]
- 01/ 2008 "Novel mouse mutants with primary cellular immunodeficiencies generated by genome-wide mutagenesis", Jakob T, Köllisch GV, Howaldt M, Bewersdorff M, Rathkolb B, Müller ML, Sandholzer N, Nitschke L, Schiemann M, Mempel M, Ollert M, Neubauer A, Soewarto DA, Kremmer E, Ring J, Behrendt H, and Flaswinkel H. 2008. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*
- 08/ 2007 "Immunomodulatory effects of aqueous birch pollen extracts and phytoprostanes on primary immune responses *in vivo*", Gutermuth J, Bewersdorff M, Traidl-Hoffmann C, Ring J, Mueller MJ, Behrendt H and Jakob T. 2007. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*
- 09/ 2008 DGAKI-NACHWUCHSFÖRDERPREIS 2008
- 10/ 2006 "Immunology highlights at high altitude: review of the fourth EAACI-GA<sup>2</sup>LEN Davos Meeting" Gutermuth J, Köllisch G, Bewersdorff M, Braun A, Alessandrini F, and Jakob T. 2006. *Allergy*
- 05/ 2005 "Characterization of the major secreted zinc metalloprotease- dependent glycerophospholipid:cholesterol acyltransferase, PlaC, of *Legionella pneumophila*", Banerji S, Bewersdorff M, Hermes B, Cianciotto NP, and Flieger A. 2005. *Infection and Immunity*

### KONFERENZTEILNAHMEN

- 06/ 2008 "Impact of aqueous birch pollen extract on NKT cells *in vitro* and *in vivo*", Bewersdorff M, Braun A, Jakob T, Behrendt H, and Mempel M. XXVII. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Barcelona, Spanien  
*Poster Präsentation in einer Poster Diskussions-Runde*
- "Contribution of T cell independent interleukin 10 to allergen immunotherapy", Bewersdorff M, Alessandrini F, Aguilar A, Braun A, Kremmer E, Ring J, Mempel M, Müller W, Roers A, Behrendt H, and Jakob T. XXVII. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Barcelona, Spanien  
*Vortrag & Poster Präsentation bei der Junior Member Poster Session*
- JUNIOR MEMBER POSTER PREIS*
- 03/ 2008 "Allergen immunotherapy involving T cell independent interleukin 10", Bewersdorff M, Alessandrini F, Aguilar A, Braun A, Kremmer E, Ring J, Mempel M, Müller W, Roers A, Behrendt H, and Jakob T. 20. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz, Deutschland  
*Vortrag*
- 01/ 2008 "A role for T cell independent interleukin 10 in allergen immunotherapy", Bewersdorff M, Alessandrini F, Aguilar A, Braun A, Kremmer E, Ring J, Mempel M, Müller W, Roers A, Behrendt H, and Jakob T. 6<sup>th</sup>EAACI-GA<sup>2</sup>LEN Davos Meeting, Pichl, Österreich  
*Vortrag*
- 03/ 2007 "Differential effects of aqueous birch pollen extract and pollen associated lipid mediators on different subsets of murine dendritic cells *in vitro*", Bewersdorff M, Gutermuth J, Traidl-Hoffmann C, Ring J, Mueller MJ, Mempel M, Behrendt H, and Jakob T. 19. Mainzer Allergie-Workshop, Mainz, Deutschland  
*Vortrag*
- 06/ 2006 "Impact of aqueous birch pollen extract and pollen associated lipid mediators on different subsets of murine dendritic cells *in vitro*", Bewersdorff M, Gutermuth J, Traidl-Hoffmann C, Hochrein H, Ring J, Mueller MJ, Behrendt H, and Jakob J. XXV. Congress of the European Academy of Allergology and Clinical Immunology, Wien, Österreich  
*Poster Präsentation*

