

Klinische Kooperationsgruppe Umweltdermatologie und Allergologie
HelmholtzZentrum München Deutsches Forschungszentrum für Gesundheit und
Umwelt (GmbH)/TUM

ZAUM - Zentrum Allergie und Umwelt an der
Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie
der Technischen Universität München

(Leitung: Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt)

**Einfluss von Pollen-assoziierten Lipidmediatoren (PALMs) auf Reifung und
Zytokinproduktion von unterschiedlichen dendritischen Zell-
Subpopulationen aus humanem peripherem Blut**

Dan R. Jacoby

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen
Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines
Doktors der Medizin
genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.-Prof. Dr. D. Neumeier

Prüfer der Dissertation:

1. apl. Prof. Dr. C. I. Traidl-Hoffmann
2. Univ.-Prof. Dr. H. Behrendt

Die Dissertation wurde am 5.11.2009 bei der Technischen Universität München
eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 28.04.2010 angenommen.

„Nur wer nicht sucht, ist vor Irrtum sicher.“
[Albert Einstein]

I Inhaltsverzeichnis

Kapitel	Titel	Seite
II	Verzeichnis der veröffentlichten Daten aus der Arbeit	4
III	Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	5
1	Einleitung	7
1.1	Pollen	7
1.1.1	Pollen als Allergenträger	7
1.1.2	Pollen-assoziierte Lipidmediatoren	8
1.2	Dendritische Zellen	11
1.2.1	SlanDCs	12
1.2.2	Myeloide dendritische Zellen (MDC)	13
1.2.3	Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC)	14
1.3	Toll-like Rezeptoren	17
1.3.1	TLR-4 Ligand Lipopolysaccharid	19
1.3.2	TLR-7 Ligand Resiquimod	19
1.3.3	TLR-9 Liganden CpG-Oligodesoxynukleotide	19
1.4	Zytokine	21
1.4.1	Interleukine	21
1.4.1.1	Interleukin-6	22
1.4.1.2	Interleukin-10	22
1.4.1.3	Interleukin-12	23
1.4.2	Typ-I Interferone	23
1.4.2.1	Interferon α	24
1.5	Oberflächenmarker dendritischer Zellen	24
1.5.1	Mannose Rezeptor	25
1.5.2	HLA-DR	25
1.5.3	CCR-7	25
1.5.4	CD40	26
1.5.5	Der B7 Komplex (CD80, CD86)	26
1.5.6	CD83	26
1.5.7	Fc ϵ RI	27
2	Ziel der Arbeit	28
3	Materialien und Methoden	29
3.1	Materialien	29
3.1.1	Probanden	29
3.1.2	Biologisches Material	29
3.1.3	Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte	30
3.1.4	Verwendete Medien	34
3.2	Methoden	34
3.2.1	Herstellung von wässrigen Pollenextrakten (APE)	34
3.2.1.1	LPS-Eluierung der wässrigen Pollenextrakte	35
3.2.1.2	Herstellung von proteinfreiem <i>Bet.</i> -APE	35
3.2.1.3	Herstellung von fraktioniertem <i>Bet.</i> -APE	35
3.2.2	Zellkultur	36
3.2.2.1	Isolierung von peripheren blood mononuclear cells (PBMC)	36
3.2.2.2	SlanDCs	36
3.2.2.2.1	Isolierung von slanDCs aus PBMC	36
3.2.2.2.2	Versuchsaufbau	37

3.2.2.3	Myeloide dendritische Zellen (MDC)	38
3.2.2.3.1	Isolierung von Myeloiden dendritischen Zellen (MDC)	38
3.2.2.3.2	Versuchsaufbau	39
3.2.2.4	Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC)	40
3.2.2.4.1	Isolierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC)	40
3.2.2.4.2	Versuchsaufbau	40
3.3	Prinzip des Magnetically Activated Cell Sorting (MACS)	41
3.4	Durchflusszytometrie	42
3.4.1	Prinzip der Durchflusszytometrie	42
3.4.2	Verwendete Antikörper	43
3.4.3	Toxizitätsmessung mittels Propidiumjodidfärbung	44
3.5	Enzyme linked immunosorbent Assay (ELISA)	45
3.5.1	Theoretische Grundlagen	45
3.5.2	IL-6 und IL-12 ELISA	45
3.5.3	IL-10 ELISA	46
3.5.4	IFN- α ELISA	46
3.6	Statistische Auswertung	46
4	Ergebnisse	47
4.1	SlanDCs	47
4.1.1	Phänotyp, Reinheit, Überleben	47
4.1.2	Einfluss von <i>Bet.</i> -APE und Phytoprostan E ₁ auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion	48
4.1.3	Einfluss von <i>Bet.</i> -APE, Phytoprostan E ₁ und F ₁ auf die LPS-induzierte Hochregulation von Reifungsmarkern	50
4.1.4	Dosis-abhängige Hemmung von <i>Bet.</i> -APE	52
4.1.5	Proteinase K Verdau von <i>Bet.</i> -APE	52
4.1.6	Fraktionierung von <i>Bet.</i> -APE mit 3kDa cut-off Filtern	53
4.2	Myeloide dendritische Zellen (MDC)	55
4.2.1	Phänotyp, Reinheit, Überleben	55
4.2.2	Einfluss von <i>Bet.</i> -APE und Phytoprostan E ₁ auf die TLR-Liganden-induzierte Zytokinproduktion	55
4.2.3	Einfluss von <i>Bet.</i> -APE und Phytoprostanen E ₁ auf die TLR-Liganden-induzierte Hochregulation von Reifungsmarkern	56
4.3	Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC)	59
4.3.1	Phänotyp, Reinheit, Überleben	59
4.3.2	Einfluss von <i>Bet.</i> -APE und Phytoprostan E ₁ auf die CpG-A-induzierte IFN-alpha Produktion	60
4.3.3	Einfluss von <i>Bet.</i> -APE und Phytoprostanen E ₁ auf die CpG-B-induzierte Hochregulation von Reifungsmarkern	61
5	Diskussion	63
5.1	Dendritische Zellen	63
5.2	Pollen-assoziierte Lipidmediatoren	66
6	Zusammenfassung	70
IV	Literaturverzeichnis	71
V	Dank	88
VI	Lebenslauf	89
VII	Anhang	90

II Verzeichnis der veröffentlichten Daten aus der Arbeit

Veröffentlichungen:

Stefanie Gilles, **Dan Jacoby**, Cornelia Blume, Martin J. Mueller, Thilo Jakob, Heidrun Behrendt, Knut Schaeckel and Claudia Traidl-Hoffmann

Pollen-derived low-molecular weight factors inhibit 6-sulfo LacNAc⁺ dendritic cells' capacity to induce T_H1 responses, 2010 Feb;40(2):269-78, clinical and experimental Allergy

Vorträge auf Kongressen:

Dan Jacoby, Stefanie Gilles, Cornelia Blume, Knut Schäkel, Martin J. Müller, Thilo Jakob, Heidrun Behrendt and Claudia Traidl-Hoffmann

Non-allergenic, small molecular weight substances from pollen modulate human dendritic cell function. 3. Gemeinsamer Deutscher Allergiekongress, Erfurt, 10. bis 13. September 2008

Stefanie Gilles, **Dan Jacoby**, Knut Schäkel, Martin J. Müller, Thilo Jakob, Hubertus Hochrein, Johannes Ring, Heidrun Behrend and Claudia Traidl-Hoffmann

Effects on pollen-associated lipid mediators (PALMs) on maturation and cytokine secretion on human dendritic cell subsets. 19. Mainzer Allergie-Workshop, Deutsche Gesellschaft für Allergologie und klinische Immunologie e.V. (DGAKI) , Mainz, 16-17 März 2007

Stefanie Gilles, **Dan Jacoby**, Knut Schäkel, Martin J. Müller, Hubertus Hochrein, Johannes Ring, Heidrun Behrend and Claudia Traidl-Hoffmann

Effects on pollen-associated lipid mediators (PALMs) on maturation and cytokine secretion on human dendritic cell subsets. Abstract nr. L31, 12. Leipziger Workshop, Cytomics and Translational Medicine, Leipzig, 19-21 April 2007

Posterpräsentation auf Kongressen:

Stefanie Gilles, **Dan Jacoby**, Knut Schäkel, Martin J. Müller, Johannes Ring, Heidrun Behrend and Claudia Traidl-Hoffmann

Effects on pollen-associated lipid mediators (PALMs) on maturation and cytokine secretion on human dendritic cell subsets, Poster 123, XXXV. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung (ADF), Erlangen, 28.02-1.03.2008

III

Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

%	Prozent
Abb.	Abbildung
AE	Atopisches Ekzem
AK	Antikörper
APC	Antigenpräsentierende Zelle(n)
APE	<i>Aqueous pollen extract</i>
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
APR	Akute Phase Reaktion
Bet.	<i>Betula alba</i>
BSF	B-Zellen stimulierender Faktor
bzw.	Beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	Cirka
cAMP	Zyklisches Adenosin-Monophosphat
CCR	Chemokin-Rezeptor
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cpm	<i>Counts per minute</i>
CRP	C-reaktives Protein
DAMP	<i>Damage associated molecular pattern</i>
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ELISA	<i>Enzyme linked immunosorbent assay</i>
Evtl.	Eventuell
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
FcεRI	Hochaffiner IgE-Rezeptor
g	Gravitation
gr.	Griechisch
h	Stunde
HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i>
HSF	Hepatozyten stimulierender Faktor
IDEC	Inflammatorische dendritische epidermale Zelle
IFN	interferon
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
LC	Langerhans-Zelle
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic activated cell sorting</i>
MDC	Myeloide dendritische Zelle
MDC8+	SlanDC
MG	Molekulargewicht
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter

μM	Mikromolar
min.	Minute(n)
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MTP	Mikrotiterplatte
mRNA	<i>Messenger Ribo-Nucleid-Acid</i>
MW	Mittelwert
nm	Nanometer
NF-κB	<i>Nuclear factor κB</i>
PALM	Pollen-assoziiertes Lipidmediator
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Pattern</i>
PBMC	<i>Peripher blood mononuclear cell</i>
PDC	Plasmacytoide dendritische Zelle
PGH	Prostaglandin Hydroxylase
PP	Phytosteran
R	Rezeptor
Rpm	<i>Rounds per minute</i>
REM	Raster-Elektronen-Mikroskop
RT	Raumtemperatur
SAA	Serum Amyloid A
SEM	<i>Standard mean of error</i>
SLC	<i>Secondary lymphoid Chemokine</i>
Sec.	Sekunde(n)
SlanDC	6-sulfo LacNac
Std.	Stunde
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF-β	T-Zell Wachstums Faktor
T _H 1	T-Helfertelle vom Typ 1
T _H 2	T-Helferzelle vom Typ 2
TLR	<i>Toll-like-Rezeptor</i>
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor-α
T-reg	T-regulierende Zelle
U	Unit(s)
UV	Ultra-violett
Vgl.	vergleiche
Vgl. u.	Vergleiche unten

1 Einleitung

1.1 Pollen

1.1.1 Pollen als Allergenträger

Pollen zählen neben Pilzsporen und Säugetierepithelien zu den wichtigsten Allergenquellen der Außenluft. Ihren Namen verdanken die Pollen dem schwedischen Naturforscher Linnaeus der bereits 1760 ihre mehlartige (lat. Pollos) Substanz beschrieb [1] [2].

Die Bezeichnung Pollen steht für einen Sammelbegriff aus einzelnen Pollenkörnern. Jedes Pollenkorn ist Träger des männlichen Erbgutes höher entwickelter Pflanzen und damit für die Reproduktion der Pflanzen essentiell. Der Durchmesser der Pollen variiert abhängig von der Spezies zwischen 5 und 80µm, wobei Birkenpollen einen Durchmesser von etwa 25µm haben [3]. Pollenkörner besitzen eine widerstandsfähige zweischichtige Hülle (Sporoderm), bestehend aus der äußeren Exine und einer inneren Intine. Die Intine wird von Cellulose und Pektin gebildet. Diese Schicht umschließt neben den Zellorganellen den vegetativen Nukleus sowie eine generative Zelle. Sie ist nicht besonders widerstandsfähig, wird jedoch von der Exine, der äußeren Schicht der Sporopollenin, umhüllt, die den Pollen vor physikalischen und enzymatischen Einflüssen schützt [4], so dass sie Jahrhunderte in trockener Umgebung unbeschädigt überdauern können. Eine Allergenfreisetzung wird durch hohe Luftfeuchtigkeit, Gewitter und Luftverschmutzung begünstigt. Des Weiteren ist die Freisetzung von Allergenen temperatur-, zeit- und pH-abhängig [5].

Schon geringste Luftbewegungen führen bei windbestäubten (amenophilen) Pflanzen zu einem Transport der Pollen über weite Entfernungen. Das hat für die Pflanze den Vorteil, dass weit entfernte Pflanzen bestäubt werden können, andererseits erhöht sich die Pollenlast in der Umwelt. Die amenophilen Pflanzen bilden nur 10% der 300 blütenbildenden Pflanzenfamilien, sie sind jedoch ausschließlich für die durch Pollen induzierten Allergien verantwortlich.

Die Birke setzt pro Blütenstand ungefähr 5,4 Millionen Pollenkörner in die Atmosphäre frei [6]. Im Allgemeinen werden Pollen windbestäubender Pflanzen bei Einatmung im Bereich der oberen Luftwege deponiert, aufgrund ihrer Größe dringen sie aber nicht tiefer als die Trachea ein. Bei sensibilisierten Personen können sie die Symptome einer allergischen Rhinitis bzw. Asthma auslösen [1]. Zu Erklärung des allergischen Asthmas, dessen Symptome sich in den tiefen Lungenabschnitten, den Bronchioli terminales, manifestieren, wird unter anderem eine Freisetzung der Allergene aus den Pollen angenommen [7].

Bereits im Jahre 1883 unternahm der englische Arzt Charles Blackley die ersten Versuche mit Pollen. Der an Heuschnupfen leidende Arzt erbrachte durch Selbstversuche den Beweis, dass Pollen Heuschnupfen hervorrufen können [8]. Einerseits führte er Inhalationsversuche und Applikationen von Pollen in die Nase durch und konnte durch diese Maßnahme die Symptome einer Rhinokonjunktivitis sowie asthmatische Beschwerden hervorrufen. Andererseits konnte er durch die Applikation von Pollen in Kratzwunden zeigen, dass der Körper mit Hautrötung und Schwellung auf den Reiz reagiert. Im Jahre 1965 gelang es der Arbeitsgruppe Johnson und Marsh, die biochemische Struktur des Gruppe 1-Allergens aus Gräserpollen zu identifizieren [9].

Pollenallergene sind vorwiegend auf den Pollen lokalisiert, z.B. im Zytoplasma, oft in Ribosomen-reicher Umgebung [10]. Sie wurden aber auch in Mitochondrien, P-Partikeln und Stärkegranula von Pollen [5], sowie in den Blättern und Wurzeln beschrieben [11-13]. Ihre allergene Eigenschaft erhalten Allergene dadurch, dass sie mindestens zwei Epitope für das IgE aufweisen. Allergene sind häufig Proteine mit globulärer Struktur, geringer molekularer Masse (4-60kDa) und guter Wasserlöslichkeit. Sobald Pollen in Kontakt mit dem wässrigen Milieu der Schleimhäute kommen, werden die Allergene sehr schnell freigesetzt.

1994 wurde eine einheitliche Nomenklatur für Allergene herausgearbeitet. Dabei werden Allergene mit den ersten drei Buchstaben des wissenschaftlichen Gattungsnamen, dem Anfangsbuchstaben des Artnamens und einer laufenden, chronologisch vergebenen Nummer bezeichnet [14]. Bei den Birkenpollen gibt es vier Gruppen: Bet v 1, 2, 3 und 4. Bet v 1 besitzt ein Molekulargewicht von 24 kDa, Bet v 2 wiegt 14 kDa, Bet v 3 24 kDa und Bet v 4 48 kDa. Bet v 1 ist ein PR-Protein, das auch Ribonuclease-Aktivität zeigt [15], Bet v 2 ist ein Profilin [16] und Bet v 3 [17] und Bet v 4 [18] sind Kalzium-bindende Proteine [19].

Allergene werden in Major- und Minorallergene eingeteilt: Reagieren über 50% eines untersuchten Patientenkollektivs mit spezifischen IgE, dann wird das reaktionsauslösende Allergen als Majorallergen bezeichnet. Bei weniger als 50% wird das Allergen als Minorallergen klassifiziert [14].

1.1.2 Pollen assoziierte Lipidmediatoren

Pollen als Allergenträger – dieses Konzept ist seit vielen Jahren bekannt. Pollen sind aber weit mehr als „nur“ Allergenträger. Bereits 1970 beschrieben Siegel und Shermann die Interaktion von Zellen des innate Immunsystems (Makrophagen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten) mit Beifußpollen. In einem Meerschweinchenmodell konnten bei diesen Zellen Adhärenz und morphologische Veränderungen nach Beifußexposition nachgewiesen werden [20]. Dreißig Jahre später konnten Behrendt et al. erstmals

nachweisen, dass Pollen im wässrigen Milieu neben den Allergenen auch physiologisch wirksame Konzentrationen an Lipiden freisetzen. Diese Lipide wurden Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALMs: pollen associated lipid mediators) genannt [21]. Müller et al. veröffentlichten erstmals chemische Beschreibungen dieser Moleküle [22]. Sie weisen strukturelle Ähnlichkeiten zu den Leukotrienen und Prostaglandinen aus Säugetierzellen auf und besitzen, ebenso wie ihre Homologen aus Säugetierzellen, proinflammatorische und immunmodulatorische Eigenschaften. 2002 gelang es Traidl-Hoffmann et al. zu zeigen, dass PALMs die Chemotaxie von neutrophilen Granulozyten beeinflussen [23]. Plötz et al. konnten 2004 zeigen, dass Leukotrien-ähnlichen Substanzen analog dem Leukotrien B₄ (LTB₄) eine chemotaktische Wirkung auf eosinophile Granulozyten ausüben [24]. Schließlich konnten Traidl-Hoffmann et al. 2005 zeigen, dass Phytoprostan E₁ (PPE₁) die IL-12p70 Produktion von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (moDC) inhibiert und dadurch eine T_H2 Antwort begünstigt [25] [26].

Prostaglandine und Leukotriene zählen zu den Cyclopentanverbindungen und werden durch die Enzyme Lipoxygenase (LOX) bzw. Cyclooxygenase (COX) aus dem gemeinsamen Vorläufer Arachidonäure, einem Zellmembranbestandteil, synthetisiert. Prostaglandine sind an diversen Immunabwehr- und Entzündungsprozessen beteiligt, während Leukotriene unter anderem wichtige Chemoattraktanten für neutrophile Granulozyten darstellen [27].

Cyclopentanverbindungen, welche nicht-enzymatisch hergestellt werden, stellen Isomere der Enzym-katalysierten Prostaglandine dar und werden deshalb als Isoprostane bezeichnet. Imbusch und Mueller konnten in frischen Birkenpollen Isoprostane in großen Mengen mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC: high performance liquid chromatography) nachweisen. Da jedoch bei höheren Pflanzen weder Arachidonsäure noch PGH-Synthase Aktivität festgestellt werden konnte, musste es sich bei den von Imbusch und Mueller gefunden Substanzen um Dinor-Isoprostane handeln. Diese Dinor-Isoprostane entstehen aus der Linolsäure oder der Linolensäure, dreifach ungesättigten Fettsäuren mit 18 Methylgruppen. Um Verwechslungen mit Dinor-Isoprostanen, die durch β -Oxidation von Isoprostanen im tierischen Organismus entstehen, zu vermeiden, schlugen sie im Jahre 2000 die Benennung Phytoprostane für die aus Linolsäure oder Linolensäure entstandenen Dinor-Isoprostane vor [22].

Durch die Lipooxygenase oder durch Autoxidation entsteht aus der Linolsäure 13-Hydroxyoktadekadiensäure (13-HODE) oder 9-Hydroperoxyoktadekadiensäure (9-HODE) [28]. Und wie oben bereits erwähnt, können diese Leukotrien-ähnlichen Substanzen analog dem Leukotrien B₄ (LTB₄) eine chemotaktische Wirkung auf neutrophile- und eosinophile Granulozyten ausüben [23] [24] [29].

Bei Kontakt eines Pollenkorns mit der Schleimhaut kommt es zur Freisetzung des Allergens und der PALMs. Die Bet v 1-Freisetzung verläuft allerdings langsamer als die Freisetzung von Eicosanoid-ähnlichen Substanzen aus Pollen, der frühe Anstieg der Bet v 1-Freisetzung ist in den ersten Minuten der Inkubationszeit nicht so stark wie bei den PALMs. Es kann daher die Hypothese aufgestellt werden, dass die Allergenwirkung im Vergleich zur Wirkung der PALMs erst zeitverzögert auftritt. Die Lipidmediatoren könnten somit in IgE-unabhängiger Weise proinflammatorisch wirken und dadurch die initiale Phase einer allergischen Reaktion modulieren [29].

Von besonderem Interesse könnte die Tatsache sein, dass Pollen von Pflanzen mit klinisch und epidemiologisch höherer allergener Potenz (Gräser, Birke, Beifuss) signifikant höhere Mengen an proinflammatorischen PALMs produzieren und freisetzen als z. B. Kiefernpollen, die als weniger allergen gelten [5]. Die Menge der freigesetzten Lipidmediatoren ist pH- und temperaturabhängig. Weiterhin setzen Gräserpollen, die in der unmittelbaren Umgebung von Straßen mit hohem Verkehrsaufkommen gesammelt wurden, größere Mengen an PALMs frei als Gräserpollen ländlicher Herkunft [5]. Weiterhin wurde herausgefunden, dass bei Birkenpollen ein durch Autooxidation hervorgerufenener Alterungsprozess mit erhöhter Freisetzung von PALMs vorlag [19].

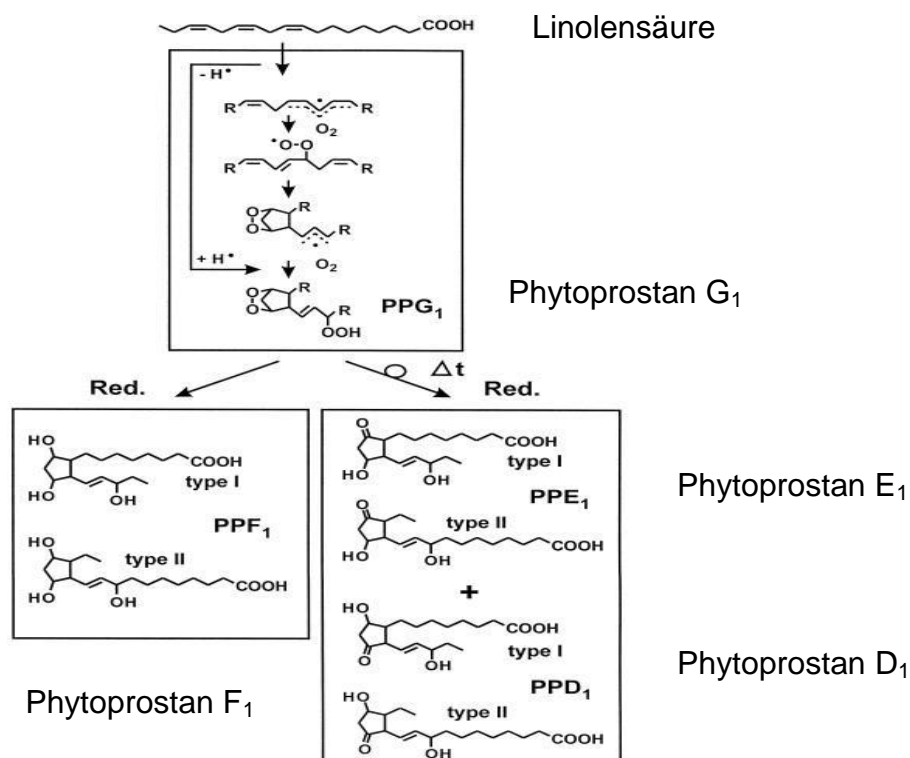


Abb. 1: Synthesemechanismen der Phytoprostane aus Linolensäure über mehrere Autooxydationsschritte. Phytoprostane G₁ (PPG₁) entstehen aus Linolensäure über den Endoperoxid- und den Dioxetanmechanismus. Durch Reduktion an unterschiedlichen Stellen der Kohlenstoffkette entstehen die D₁-, E₁- und F₁-Phytoprostane. Aus: *Analysis of Oxidative Stress and Wound-Inducible Dinor Isoprostanes F₁ (Phytoprostanes F₁) in Plants*, Ruth Imbusch and Martin J. Mueller (2000) [22]

1.2 Dendritische Zellen

Die dendritische Zelle (DC) stellt das Bindeglied zwischen innater (angeborener) und adaptiver (erworbener) Immunität dar. Bei einer Infektion nehmen im Gewebe ansässige DCs ein mikrobielles Antigen auf, prozessieren es und migrieren in die regionären Lymphknoten, wo sie das Antigen naiven T-Zellen präsentieren. Die Entscheidung, welche T-Helferzell-Antwort auf das Antigen erfolgt (z. B. T_H1 , T_H2 , T_H17 , Treg), hängt dabei von verschiedenen Faktoren ab: Der Natur des mikrobiellen Antigens (z. B. intrinsische T_H2 fördernde Aktivität mancher Antigene wie *Der p 1* der Hausstaubmilbe) (Signal 1), der Expression von Kostimulationsmarkern (Signal 2), Pathogen-assoziierten Molekülen (PAMPs, Signal 3) sowie Faktoren des lokalen Mikromilieus (z. B. Nucleoside, Prostaglandine, Leukotriene, Zytokine (Signal 4). Abbildung 2. veranschaulicht die Aktivierung der DCs, die in die Lymphknoten wandern und dort die Aktivierung naiver T-Zellen vermitteln.

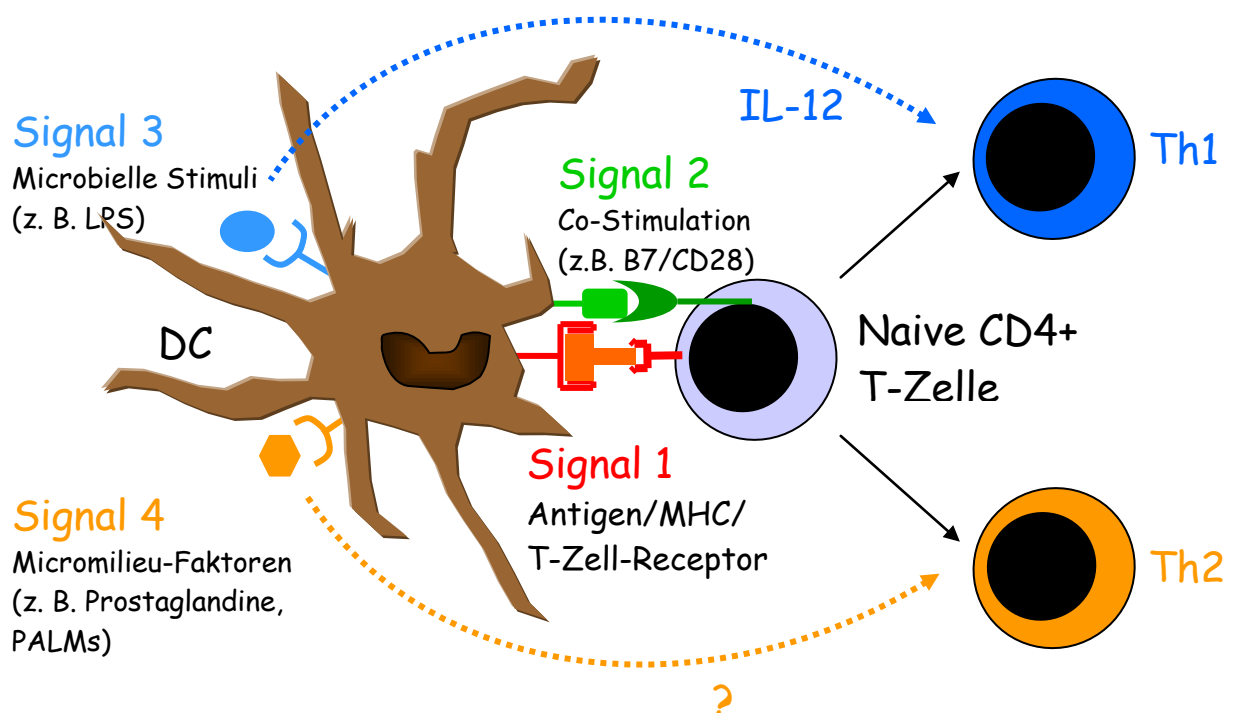


Abb. 2: Signale, die nötig sind um eine dendritische Zelle zu aktivieren, sowie deren Einfluss auf die jeweilige T-Zell Antwort. Die Natur der T-Zell-Antwort hängt von mehreren Signalen ab: Von der Natur des Stimulus (Antigen, Signal 1), von costimulatorischen Signalen (Signal 2), von Pathogen-assoziierten Molekülen, welche über Pattern Recognition Rezeptoren (PPR) von der dendritischen Zelle erkannt werden (Signal 3) und von Faktoren des lokalen Mikromilieus (Signal 4). Diese 4 Faktoren beeinflussen maßgeblich die Aktivierung der dendritischen Zellen und führen je nach Aktivierungszustand zu einer einer T_H1 - oder T_H2 gewichteten Immunantwort.

Paul Langerhans entdeckte 1868 die ersten dendritischen Zellen in der Epidermis der Haut. Er vermutete, dass die Zellen aufgrund der langen sternförmigen Zellausläufer zum

Nervensystem gehörten und nannte sie dendritische Zellen [30]. Die Funktion der Zellen blieb allerdings unbekannt. Im Jahre 1973 identifizierten Steinmann und Cohn eine bis dahin unbekannte Zellpopulation in der Milz von Mäusen, die sie aufgrund ihrer Morphologie ebenfalls dendritische Zellen nannten [31-33]. Heute weiß man, dass dendritische Zellen eine heterogene Gruppe verschiedener Subpopulationen umfassen, die in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungs- und Reifungsstatus unterschiedliche Funktionen erfüllen. Sie besitzen sowohl die Fähigkeit, T-Zellen zu aktivieren [34] als auch Toleranz oder Immunität zu induzieren [35].

Dendritische Zellen verlassen das Knochenmark als unreife Zellen und migrieren durch die Blutgefäße zu lymphoiden und nicht-lymphoiden Geweben, wo sie sesshaft werden [36]. Sie liegen in fast allen Geweben vor, werden aber gehäuft an den Grenzschichten zur Umgebung (Haut und Mukosa) gefunden [37]. Sie analysieren ständig ihre Umgebung, indem sie extrazelluläre Bestandteile endozytieren. Dies geschieht durch Makropinozytose [38], durch Rezeptor-vermittelte Endozytose über C-Typ Lektine (z. B. Mannose-Rezeptor) [39-41] oder Fc-Rezeptoren (Aufnahme von Immunkomplexen oder opsonierten Partikeln) [42], sowie durch Phagozytose von apoptotischen oder nekrotischen Zellfragmenten, Bakterien und Viren [43-46]. Nach Aufnahme eines Antigens, körpereigen oder körperfremd, werden die Antigene prozessiert und als Peptide zusammen mit einem MHCII-Molekül an der Zellmembran präsentiert. Die DCs verlassen das jeweilige Gewebe und wandern in den nächsten drainierenden Lymphknoten. Dort induzieren sie entweder eine spezifische Immunantwort oder aber Toleranz. Eine Immunantwort wird dann ausgelöst, wenn das von der DC präsentierte Antigen von der T-Zelle erkannt wird und zusätzlich eine Kostimulation durch DC-Oberflächenmoleküle stattfindet. Neben dem Reifungsgrad der DC ist die adäquate Kostimulation entscheidend an der Induktion einer T-Zell vermittelten Immunantwort beteiligt. Gleichzeitig werden die DCs im aktiven Zentrum der Lymphknoten durch die T-Helferzellen weiter aktiviert. Die T-Helferzellen stimulieren die DCs mittels CD40-Liganden und fördern dadurch die Entstehung einer Immunantwort.

DCs gehen aus einer CD34+ hämatopoetischen Stammzelle des Knochenmarks hervor und entwickeln sich zu verschiedenen Subpopulationen. Wie bereits oben erwähnt, handelt es sich bei den DCs nicht um eine homogene Population. DCs unterscheiden sich in Ursprung und Stadium der Differenzierung.

1.2.1 S1anDCs

S1anDCs wurden erstmals 1998 von Knut Schäkel und Mitarbeitern beschrieben. Ihr Name rührt von einer speziellen O-gebundenen glykosidischen Modifikation des PSGL-1 (P selectin glycoprotein ligand 1) Moleküls her, der 6-Sulfo LacNAc Modifikation. Im

peripheren Blut machen sie etwa 0,5-2% aller Leukozyten aus und stellen damit die vorherrschende DC-Population im Blut dar [47]. Die Zellen wurden außerdem gehäuft in der ileakalen Mukosa bei Morbus Crohn Patienten [48] gefunden. Auch in der Dermis von Psoriasis Vulgaris-Läsionen und in Gewebe von rheumatoider Arthritis sind vermehrt slanDCs nachgewiesen worden [49]. Weiterhin wurden die Zellen sowohl in der Nasenschleimhaut als auch in von atopischem Ekzem befallener Haut gefunden (Knut Schäkel, persönliche Mitteilung).

Im Gegensatz zu anderen DCs fehlt bei den slanDCs das kutane lymphozytäre Antigen (*cutaneous lymphocyte antigen*: CLA) und die Möglichkeit P- und E-Selektin zu binden. SlanDCs werden zu den myeloiden Zellen gezählt und exprimieren CD11c. Für slanDCs charakteristisch ist die hohe Expression von CD16, dem niedrig affinen IgG Rezeptor Fc γ RIII. Die Expression von CD16 geht im Verlauf der *in vitro* Inkubation verloren. SlanDCs haben folgenden Phänotyp: Sie sind CD1c-, CD11c+, CD14-, C5 α R+, und CD45RA+, wodurch die Zellen gut von anderen DCs abzugrenzen sind. Zusätzlich dazu exprimieren die slanDCs diverse Toll-like Rezeptoren [50].

SlanDCs produzieren bei entzündlichen Prozessen hohe Mengen an IL-12. Allerdings sind unreife slanDCs hierzu noch nicht befähigt. Sie müssen zuerst ausreifen, was mit einer verstärkten Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD83, HLA-DR, CD86 und CD40 einhergeht. Im Blut hemmen Erythrozyten die Ausreifung der slanDCs, indem diese mit ihrem CD47 Rezeptor an das Signal-regulierende Protein α (signal-regulatory protein: SIRP α) binden. Diese Bindung hemmt die Reifung der slanDC und deren IL-12 Sekretion [49]. *In vitro*, (in Abwesenheit von Erythrozyten) reifen slanDCs in etwa 6Std. spontan aus.

Unreife slanDCs zeigen eine ausgeprägte Endozytose und Makropinozytose von löslichen Antigenen [51]. Ihre Fähigkeit zur Antigenpräsentation und T-Zell-Aktivierung ist ausgeprägt [51]. *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass slanDCs zytotoxische T-Zellen weitaus effektiver aktivieren konnten als Monozyten [51].

1.2.2 Myeloide dendritische Zellen (MDC)

Myeloide dendritische Zellen sind im Gegensatz zu den plasmazytoiden dendritischen Zellen CD11c+ und CD123-. Als unreife DCs nehmen sie äußerst effizient Antigene auf und prozessieren diese. Als reife MDCs sind sie in der Lage, IL-12 zu produzieren, und stimulieren die Polarisierung von naiven CD4+ T-Zellen zu IFN- γ produzierenden T_H1-Zellen [52].

Die CD11c+ DCs sind in der dunklen und hellen Zone von Keimzentren zu finden [53]. Im Blut befinden sich die MDCs im unreifen Stadium. Dendritische Zellen myeloider Herkunft

gelangen über den Blutweg in die T-Zell-Areale der weißen Milz-Pulpa (PALS), wo sie durch Adhäsion an naive T-Zellen funktional zurückgehalten werden [54].

Die meisten Einblicke in die Natur dieser Zellen stammen nicht aus der Isolation der MDCs aus Gewebe, sondern aus *in vitro* Untersuchungen. In Studien konnte gezeigt werden, dass MDCs eine starke allogene T-Zellaktivierung in der sogenannten *mixed lymphocyte reaction* (MLR) bewirken und auf Stimulation durch TLR-Liganden mit der Produktion von Zytokinen sowie der Expression von Kostimulations-Molekülen reagieren. Im Gegensatz zu den häufig in Studien verwendeten Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (moDC) benötigen MDCs zur Produktion von großen Mengen IL-12p70 jedoch eine simultane Stimulation durch einen TLR-7 oder TLR-8-Liganden (z. B. R-848) plus einen TLR-3 (PolyI:C) oder TLR-4 Liganden (LPS) [55].

1.2.3 Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC)

Die plasmazytoiden dendritischen Zellen verdanken ihren Namen ihrer Plasmazell-ähnlichen Morphologie. Lennert und Remmele beschrieben 1958 zum ersten Mal „T-assoziierte Plasmazellen“, die den T-Zell Marker CD4 und eine prä-TCR- α -Kette (TCR = *T-cell receptor*) exprimierten, aber keine Immunglobuline im Inneren aufwiesen [56-59]. Weitere Untersuchungen dieses Zelltyps ergaben, dass dieser auch myeloide Oberflächenmoleküle wie CD31, CD36, CD68 und die Interleukin-3 (IL-3)-Rezeptor- α -Kette exprimiert, was zu einer Umbenennung dieses Zelltyps in plasmazytoider Monozyt führte [60]. Die Zellen exprimierten weder CD3 noch T-Zell-Rezeptoren, dafür fand man aber die MHC Klasse II Antigene HLA-DR und HLA-DQ an ihrer Oberfläche. Steinmann entdeckte 1994 zwei unterschiedliche dendritische Subpopulationen: CD11c-positive und CD11c-negative dendritische Zellen [61]. Weitere Untersuchungen zeigten, dass die CD11c negativen und CD4 positiven Subpopulationen der DCs identisch mit den plasmazytoiden Monozyten waren. Daraufhin wurde aus dem plasmazytoiden Monozyt die plasmazytoide dendritische Zelle [62].

Lange herrschte die Meinung vor, dass die meisten humanen Blutzelltypen die Fähigkeit zur Sekretion von Typ I Interferonen besäßen. Ende der siebziger Jahre des letzten Jahrhunderts zeigte sich aber, dass es einen Hauptzelltyp geben musste, der bei viraler Infektion das IFN Typ I produzierte [63]. Anfang der 80er Jahre des letzten Jahrhunderts wurde dann nach den zellulären Quellen der antiviralen Zytokine IFN- α und IFN- β gesucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass die Interferon-produzierenden Zellen eine äußerst kleine Zellpopulation des peripheren Blutes darstellten [64]. Weitere Untersuchungen führten zu der Entdeckung, dass es sich bei dieser Population um CD3-negative und CD4-positive dendritische Zellen handelte [65]. 1999 gelang es dann zwei Forschergruppen unabhängig voneinander zu beweisen, dass eben diese Interferon produzierende Zellen identisch war mit den plasmazytoiden dendritischen Zellen [66, 67].

Plasmazytoide dendritische Zellen wurden im Laufe ihrer Entdeckung verschiedenen Zellreihen zugeordnet. Heute wird am ehesten eine eigenständige hämatopoetische Zelllinie angenommen, in deren Entwicklung FLT3L aus hämatopoetischen Stammzellen eine kritische Rolle spielt [68]. Zu dieser Hypothese passt das Fehlen von linien-spezifischen Oberflächenproteinen wie Immunglobuline und CD19 (B-Zelle), T-Zell-Rezeptor und CD3 (T-Zelle), CD14 (Monozyten), CD16 und CD56 (NK-Zellen) und CD11c (myeloide dendritische Zellen).

Die Häufigkeit von PDCs innerhalb der mononukleären Zellfraktion des peripheren Blutes beträgt zwischen 0,1-0,7%. PDCs finden sich meist in sekundären lymphatischen Organen, wo sie in der T-Zell-Region nahe der hochendothelialen postkapillären Venolen (high endothelial venules: HEV) lokalisiert sind [60, 69]. PDCs finden sich aber auch in der gesunden Haut und in der Mukosa [70-72].

PDCs sind mit dem TLR7 und dem TLR9 als *pattern recognition receptor* ausgestattet, was auf die gezielte Erkennung mikrobieller Nukleinsäuren und auf eine besondere Rolle der PDCs in der Abwehr von Viren hinweist. Dies steht im Gegensatz zu den myeloiden dendritischen Zellen, welche durch ihre vorhandenen TLRs eher auf die Abwehr von Bakterien spezialisiert sind [73]. Als Interferon Typ I produzierende Zellen des menschlichen Körpers sind sie entscheidend an der Abwehr bei Virusinfektionen beteiligt. Bei Viruskontakt setzen sie sehr hohe Mengen an IFN- α (3-10pg/Zelle/24Std.) frei und aktivieren dadurch zytotoxische Effektorzellen wie NK-Zellen [66, 67].

Unreife PDCs exprimieren wenig CD40, CD80, CD83, CD86, CCR7 und HLA-DR auf ihrer Oberfläche. Nach Kontakt von einem als fremd erkannten Antigen reifen die PDCs und wandern in den nächsten drainierenden Lymphknoten, wo sie T-Zellen zur Antigen-abhängigen Proliferation stimulieren. Nach Ausreifung der PDCs durch ein erkanntes Antigen werden die Oberflächenmarker CD40, CD80, CD83, CD86, CCR7 und HLA-DR induziert. Zusätzlich werden je nach Stimulus große Mengen an Typ I Interferon freigesetzt. Ausgereifte PDCs verlieren ihre Fähigkeit zur Phagozytose und Pinozytose von Antigenen nahezu vollständig; ihre Hauptfunktion besteht in der Aktivierung von T-Zellen [62]. Durch die IFN- α -Sekretion besitzen die PDCs zusätzlich die Eigenschaft, naive, allogene CD4 T-Zellen zur Proliferation und zur IFN- γ - und IL-10-Produktion anzuregen [74]. Zusätzlich dazu können PDCs Monozyten und MDCs aktivieren und die damit verbundene T-Zell Antwort verstärken [73].

Die PDCs sind also sowohl an der angeborenen (durch die Sekretion von IFN- α) als auch an der adaptiven (durch die Stimulation von naiven T-Zellen) Immunantwort beteiligt [74]. Die Ausprägung bestimmter Pattern-recognition-Rezeptoren wie TLR9 spricht weiterhin dafür, dass diesen Zellen auch eine Funktion bei antibakteriellen Immunantworten zugesprochen werden könnte [75, 76].

Phänotyp	Plasmazytoide denritische Zellen	Myeloide denritische Zellen	SlanDC M-DC8+
Myeloide Marker			
CD1a	-	-	-
CD11b	-	+	
CD11c	-	+	+
CD13	-	+	
CD14	-	-	
CD33	-	+	+
CD40	+	+	+/-
CD54	+	+	+
CD80	+	+	-
CD83	+	+	-
CD86	+	+	+
CD123	+	-	-
MHC Klasse II	+	+	+
PRR			
TLR4	-	+	+
TLR7	+	-	-
TLR8	-	+	-
TLR9	+	-	-
Weitere Marker			
CD4	+	+	+
CD45RA	+	-	+
CD45R0	-	+	+/-
IL-3R	+	+	+
GM-CSFR	+	+	+
BDCA-2	+	-	-
BDCA-4	+	-	-
FcεRI	+	+	+
CD16 (FcγRIII)	-	-	+
Funktion			
IFN-α/β	+	+	-
Il-6 Produktion	(-)	+	+
IL-12p70 Produktion	(-)	+	+
Phagozytose	-	+	+

Abb. 3: Charakteristika von plasmazytoider, myeloider und slan dendritischer Zelle [49, 77, 78]

1.3 Toll-like Rezeptoren

Toll-like Rezeptoren (TLRs) gehören neben den Scavenger Rezeptoren zu der Gruppe von Mustererkennungsrezeptoren, Pattern recognition receptors (PRR) genannt. Sie gehören zum angeborenen Abwehrsystem und dienen der Erkennung von pathogenen Molekülen (PAMP: *Pathogen Associated Molecular Patterns*). TLRs stellen auch die Verbindung des angeborenen mit dem adaptiven Immunsystem dar, indem die Reifung von dendritischen Zellen induziert und die T-Zell-vermittelte Antwort dirigiert wird [79].

Der *Toll*-Rezeptor wurde erstmals bei der *Drosophila melanogaster* Fliege während eines Screenings nach Polaritätsgenen in Embryonen gefunden. Im Embryonalstadium steuert dieses Protein die dorsoventrale Polarität [80]. Später erst wurde für diesen Rezeptor eine Beteiligung an der Immunantwort der ausgewachsenen Fruchtfliege auf Infektionen mit Pilzen und Gram-positiven Bakterien nachgewiesen [81]. Die *Drosophila* Fliegen zeigen trotz des Fehlens eines adaptiven Immunsystems eine effektive Abwehr gegenüber Mikroorganismen. Adulte Fruchtfliegen, deren Gene für *Toll* und *18-wheeler*, einem später entdeckten regulatorischen Rezeptor, mutiert sind, können Infektionen durch Pilze oder Bakterien nicht effektiv bekämpfen [82]. Daraus kann man schließen, dass es bei der *Drosophila* mindestens zwei Rezeptoren aus der Toll-Familie gibt, die zwischen verschiedenen Pathogenen unterscheiden und eine passende Immunantwort initiieren können.

Nach der Entdeckung von *Drosophila* Toll wurden auch in Säugetieren Homologe dieses Rezeptors beschrieben. Diese Rezeptoren wurden Toll-like Rezeptoren (TLR: Toll ähnliche Rezeptoren) genannt [83]. Bis heute sind beim Menschen elf Toll-like Rezeptoren (TLRs 1-11) näher charakterisiert worden. Die TLRs unterscheiden sich durch ihre Ligandenspezifität, ihre Expressionsmuster, sowie in den Zielgenen, die sie induzieren können [84]. Toll-like Rezeptoren sind evolutionär hoch-konservierte Transmembranproteine, die in der Ektodomäne in tandem angeordneten Leucin-reichen Sequenzen, welche für die PAMPs-Erkennung essentiell sind, und auf der zytoplasmatischen Seite die so genannte TIR Domäne besitzen. Dieser intrazytoplasmatische Bereich zeigt eine starke Ähnlichkeit mit dem Interleukin-1 Rezeptor, daher auch die Bezeichnung dieser Domäne als Toll/IL-1-Rezeptor-Domäne (TIR). Dieser Bereich ist entscheidend für die Signalübertragung [85] [86].

TLR-4 wurde als erster TLR entdeckt. Er ist essentiell für die Erkennung von Lipopolysaccharid (LPS) aus der Zellmembran gram-negativer Bakterien. Zwei weitere für unsere Arbeit interessante Toll-like Rezeptoren sind der TLR-7, welcher durch Resiquimod (R-848) stimuliert wird und einzelsträngige RNA erkennt sowie TLR-9, welcher durch CpG-reiche DNA aktiviert wird.

In der Regel führt eine Bindung des Liganden an den TLR zur Rekrutierung des Adapterproteins MyD88 (myeloid differentiation marker 88) und ultimativ zur Aktivierung

des Transkriptionsfaktors NF- κ B, der zahlreiche proinflammatorische und immunmodulatorische Gene reguliert.

TLR-4 im speziellen rekrutiert über das Adaptermolekül MyD88 die IL-1R-assoziierte Kinase-1 und -4 (IRAK-1/4). Es kommt zur Autophosphorylierung von IRAK-1 und -4 und von MyD88, was wiederum zur Phosphorylierung des TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF 6) und zu dessen Aktivierung führt. Dieser Komplex aus IRAK-1 und TRAF 6 dissoziiert wieder und führt über mehrere Zwischenschritte zur Inaktivierung des *Inhibitor of NF- κ B* ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$)-Komplexes. Letzteres führt zu einer Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B in den Nukleus und damit zur Expression von NF- κ B-abhängigen Genen wie TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α), IL-1, IL-6, IL-12 und E-Selektin.

In einem anderen Modell konnte LPS Interferon-induzierbare Gene und die Ausreifung von dendritischen Zellen in MyD88-defizienten Mäusen, bei aufgehobener TLR-vermittelter Zytokinproduktion, induzieren. Dies weist auf das Vorhandensein eines weiteren, MyD88-unabhängigen Signaltransduktionsweg hin. Bei diesem Signalweg kommt es via TRIF und TBK1 sowohl zu einer Aktivierung des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Komplexes als auch des Transkriptionsfaktors IRF3 (siehe Abb. 4) [87].

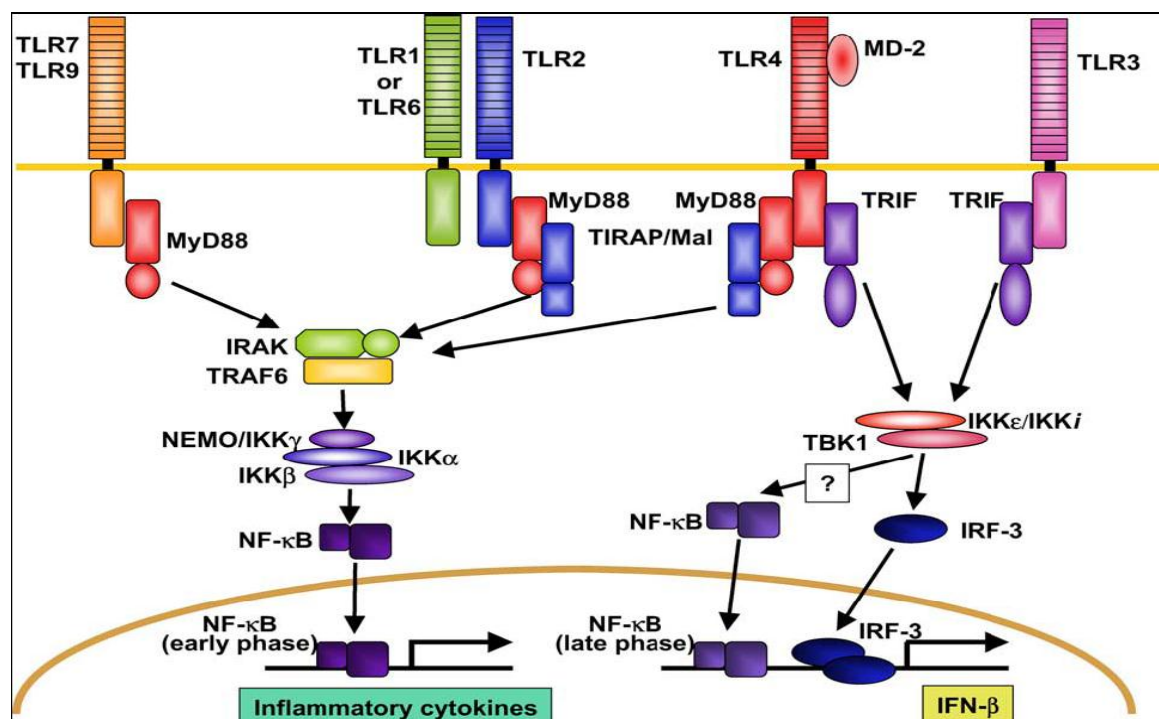


Abb. 4: Signalkaskaden der verschiedenen TLRs. TLRs rekrutieren die IL-1R-assoziierte Kinase 1 und 4 (IRAK 1/4) über das Adaptermolekül MyD88. Es kommt zur Autophosphorylierung von IRAK 1 und 4 und von MyD88, was wiederum zur Phosphorylierung des TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF 6) und zu dessen Aktivierung führt. Die Aktivierung des *Inhibitor of NF- κ B* ($\text{I}\kappa\text{B}\alpha$)-Komplexes führt zu einer Translokation von NF- κ B in den Nukleus und damit zur Expression von NF- κ B-abhängigen Genen wie TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α), IL-1, IL-6, IL-12 und E-Selektin. MyD88 unabhängig kommt es via TRIF sowohl zu einer Aktivierung des $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ -Komplexes als auch des Transkriptionsfaktors IRF3. Aus: K. Takeda, S. Akira / *Seminars in Immunology* 16 (2004) 3–9

1.3.1 TLR-4 Ligand Lipopolisaccharid (LPS)

Lipopolysaccharid (LPS) ist ein wichtiger Bestandteil der äußeren Membran von gram-negativen Bakterien. Lipopolysaccharide sind spezifisch für das jeweilige Bakterium. Das Kernpolysaccharid ist mit seinem LPS-spezifischen Zucker lebenswichtig für den Mikroorganismus. Es ist ein komplexes thermostabiles Molekül bestehend aus einem hydrophilen Polysaccharid und einem hydrophoben Teil (Lipid A). Lipid A verankert das Glykolipid in der Bakterienmembran und wird bei Bakterienverfall als Endotoxin freigesetzt. Die biologische Aktivität von Lipid A kann beim Menschen die lebensbedrohliche Situation eines Endotoxin-Schocks auslösen.

Freies LPS bindet im Serum am das Lipopolysaccharid-bindende-Protein (LBP), auch Septin genannt. Dieser Komplex bindet an CD14 auf Monozyten. Es konnte außerdem gezeigt werden, dass Monozyten von TLR-4 mutierten Mäusen nicht auf LPS reagierten [88] [89]. Dies führte zu der Erkenntnis, dass TLR-4 essentiell für die Signaltransduktion von LPS ist. Beim Menschen konnte dieser Effekt bei Mutationen im TLR-4 Gen ebenfalls gezeigt werden [90].

1.3.2 TLR-7 Ligand Resiquimod

Bei Resiquimod handelt es sich um einen Wirkstoff, der bei der Behandlung von kleinem, oberflächlichem Basalzell-Hautkrebs (Basaliom), bei aktinischer Keratose und bei Feigwarzen (*Condylomata acuminata*) eingesetzt wird. Resiquimod selber bewirkt keine aktive Zerstörung der Viren oder Krebszellen. Resiquimod, wie auch Imiquimod, ist ein Immunmodulator, der seine Wirkung durch Aktivierung des Immunsystems der Haut entfaltet. Der Wirkstoff provoziert dazu eine Entzündungsreaktion, indem er den Toll-like Rezeptor 7 (TLR-7) oder TLR-8 bindet [91]. TLR-7 und -8 befinden sich an der Plasmamembran von dendritischen Zellen oder Makrophagen. Die Bindung von Resiquimod an den TLR-7/-8 führt zu einer Aktivierung der Zellen und zu einer IFN- α , IL-6-, TNF- α und IL-12 Sekretion [92]. In unseren Versuchen haben wir uns die Eigenschaft zur Aktivierung von dendritischen Zellen zunutze gemacht, indem wir Resiquimod als Reifungsstimulus für die Zellen benutzt haben.

1.3.3 TLR-9 Liganden CpG-Oligodesoxynukleotide

Oligodesoxynukleotide (ODN) sind kurzkettige, einzelsträngige DNA-Moleküle, die aus 8-30 Basen (Nukleotiden) bestehen. Diese Nukleotide sind über 3',5'-Phosphatbrücken miteinander verbunden. Bei den Phosphatbrücken handelt es sich um Phosphodiesterbrücken, welche bei manchen synthetisch hergestellten ODN durch die sogenannte Phosphorothioat-Modifikation ersetzt werden. Diese Modifikation führt

einerseits zu einer Steigerung der Stabilität der ODN gegenüber extrazellulären Nukleasen, gleichzeitig aber auch zu einem stärkeren stimulierenden Effekt auf das Immunsystem [93].

Den ersten Hinweis auf immunstimulatorische Bestandteile bei Bakterien fand der New Yorker Chirurg William Coley. 1893 veröffentlichte er seine therapeutischen Erfolge bei Tumorpatienten in einer Serie von Studien [94] [95]. In diesen Studien injizierte er Streptokokken oder hitzeinaktivierte Bakterien, „Coley's Toxin“, in die Tumormasse von Patienten. Durch diese Maßnahme erreichten über 40% seiner etwa 900 Patienten eine anhaltende klinische Remission. Dieses Vorgehen kann als erste Immuntherapie einer Tumorerkrankung bezeichnet werden [96, 97].

Nachdem Tokunaga et al. 1984 durch eine Reihe von Versuchen feststellen konnten, dass die DNA-haltige Fraktion die höchste therapeutische Aktivität zeigte, führten weitere Untersuchungen zu der Erkenntnis, dass innerhalb der bakteriellen DNA Palindromsequenzen (spiegelbildliche Sequenzen um ein zentrales Dinukleotid) verantwortlich für die Aktivierung waren [98]. Während A. M. Krieg die Wirkung sogenannter *Antisense*-ODN auf B-Zellen studierte, bemerkte er, dass einige der Kontroll-ODN, die keine Palindrome in ihren Sequenzen enthielten, ebenfalls B-Zellen aktivierten [99]. Er fand heraus, dass unmethylierte Cytosin-Phosphat-Guanin-Motive (CpG-Motive) in bakterieller DNA zur Erkennung durch Immunzellen und zur Induktion einer Immunantwort führten [93]. Die Induktion der NK-Zellen wurde allerdings nicht durch direkte Effekte von CpG-ODN auf jene Zellen hervorgerufen, sondern waren vielmehr die Folge von CpG-induzierter Zytokin-Sekretion von Monozyten und dendritischen Zellen, die ihrerseits durch CpG-ODN aktiviert wurden [99], [100], [101], [102].

Bakterielle und Wirbeltier-DNA unterscheiden sich unter anderem durch Methylierung am Cytosin. Während Cytosin-Guanosin (CG)-Dinukleotide in bakterieller wie in synthetisch hergestellter DNA am Cytosin meist nicht methyliert sind, ist das bei der Wirbeltier-DNA in bis zu 80% der Fälle der Fall. Im Unterschied zur bakteriellen DNA, in der CpG-Dinukleotide mit der rechnerisch zu erwartenden Häufigkeit von 1:16 auftreten, findet sich bei der DNA von Wirbeltieren eine CpG-Suppression, d. h. CpG-Motive sind mindestens viermal seltener (1 von 60 Dinukleotiden) [103]. Weiterhin sind die Mehrheit der CpG-Dinukleotide eukaryontischer DNA an der 5' Stelle des Cytosins methyliert, wodurch sie ihre immunstimulatorische Wirkung verlieren [104]. Ferner zeigte sich, dass selbst unmethylierte menschliche DNA mit CpG-Motiven keine immunstimulatorische Wirkung zeigte. Dies ist dadurch zu erklären, dass es sich hier um hemmende CpG-Motive handelte. Bei hemmenden CpG-Motiven ist dem CpG-Dinukleotid entweder ein Cytosin vorangestellt oder es folgt unmittelbar ein weiteres CpG-Dinukleotid oder ein Guanosin [105].

CpG-ODN können Zellen sowohl des adaptiven als auch des angeborenen Immunsystems aktivieren. Die meisten Zellen des Immunsystems nehmen CpG-ODN endozytotisch auf, die wenigsten können jedoch darauf reagieren. TLR-9 ist der spezifische und notwendige Rezeptor, um eine Immunantwort auf bakterielle DNA bzw. synthetische CpG-ODN hervorzurufen [106] [107]. Im Gegensatz zu anderen TLRs wie z. B. TLR-4, die auf der Plasmamembran lokalisiert sind, befindet sich TLR-9 auf ruhenden Zellen in den Membranen des endoplasmatischen Retikulums. Von dort gelangt er durch Fusion mit der Plasmamembran und anschließender Endozytose oder auf direktem Weg durch Fusion von endoplasmatischem Retikulum mit Endosomen ins lysosomale Zellkompartiment [108]. Die CpG-Motive werden als molekulare Muster für intrazelluläre Bakterien oder Viren erkannt und führen letztlich zu einer T_H1-dominierten T-Zell-Antwort. Dabei ist CpG eher als eine Art Amplifikator für T_H1 Antworten zu betrachten und nicht als direkter Initiator einer T-Zell-Antwort.

Anhand von Screening-Versuchen gelang es optimale Sequenzen von CpG-ODN zu identifizieren. Im Laufe der Zeit konnten so zwei CpG-ODN-Klassen definiert werden, welche wesentliche Unterschiede sowohl in ihrer Sequenz als auch in ihrer Wirkung aufzeigten. CpG-ODN der Klasse A, CpG-ODN 2216 (CpG-A) haben ein Poly-Guanosin-Motiv (Poly-G), ein Palindrom im Zentrum und ein Rückgrat bestehend aus Phosphothioat-Bindungen an den Enden und Phosphodiester-Bindung im Zentrum. CpG-A induziert bei PDCs die Sekretion von großen Mengen IFN- α , es aktiviert B-Lymphozyten aber nur schwach [75]. Die Wirkung von CpG-A entspricht in etwa der eines Virus, das ebenfalls zu einer hohen IFN- α Produktion führt. Insofern ist es nahelegend, CpG-ODN 2216 als Prototyp für die Stimulation einer viralen Infektion anzuführen [109].

Der Prototyp der Klasse B CpG-ODN ist das CpG-ODN 2006 (CpG-B). Im Unterschied zu CpG-A weist CpG-B weder Palindrom noch Poly-G-Motive auf. Das Rückgrat von CpG-B besteht ausschließlich aus Phosphothioatbindungen. CpG-B führt bei PDCs zu verhältnismäßig geringer IFN- α Freisetzung und nur zu einer schwachen Aktivierung von NK-Zellen. Allerdings führt CpG-B zu einer Reifung von PDCs und Aktivierung von B-Lymphozyten, welche sich unter anderem durch eine Hochregulation kostimulatorischer und Antigen präsentierender Moleküle manifestiert [110]. CpG-B wird aufgrund dieser Eigenschaften als Prototyp für die bakterielle Infektion aufgeführt [110].

1.4 Zytokine

1.4.1 Interleukine

Interleukine sind zu den Zytokinen zählende Peptidhormone des Immunsystems. Sie besitzen vielfältige Aufgaben in der Regulation der Immunabwehr, der

Entzündungsreaktion, der Hämatopoese und der Apoptose [111]. Sie sind Träger der Kommunikation zwischen Leukozyten. Die Signaltransduktion der Interleukine erfolgt über Tyrosin-Kinasen der Janus-Familie, die als Effektorproteine STAT-Transkriptionsfaktoren (signal transducer and activator of transcription) aktivieren. Innerhalb der Interleukine werden proinflammatorische und anti-inflammatorische Zytokine unterschieden [111]. Nach der Reihenfolge ihrer Entdeckung werden sie in mehrere Untergruppen unterteilt, die durch Zahlen gekennzeichnet werden. Bisher wurden 35 verschiedene Interleukine entdeckt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sekretion der Interleukine 6, 10 und 12 näher untersucht.

1.4.1.1 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein Phospho-Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 23-30kD. Früher wurde es auch B-Zellen-stimulierender Faktor (BSF-2) [112], Interferon- β 2 (IFN- β 2) [113] oder auch Hepatozyten-stimulierender Faktor (HSF) genannt [114], bis eine Analyse der cDNA Aufschluss gab, dass es sich bei diesen beschriebenen Molekülen um ein und dasselbe Protein handelte [115, 116]. Allgemein wird IL-6 als Aktivator der Akute-Phase Antwort (*acute phase reaction*, APR) und als Lymphozyten stimulierender Faktor (lymphocyte stimulatory factor, LSF) betrachtet [117]. Es stimuliert im Gegensatz zu IL-1 und TNF- α die gesamte Bandbreite der Akute-Phase Proteine und übernimmt eine Schlüsselrolle in der APR, indem es zeit- und dosisabhängig die Synthese von C-reaktivem Protein (CRP) und Serum Amyloid-A (SAA) induziert [118-121].

IL-6 besitzt sowohl pro- als auch antiinflammatorische Eigenschaften [122-125], es sollte aber eher als Faktor gesehen werden, welches den pro- und antiinflammatorischen Ausgang einer immunologischen Antwort ausbalanciert. Es besitzt die Fähigkeit eine angeborene Immunantwort in eine adaptive zu dirigieren. Die Kontrolle dieses Umschaltens ist essentiell für eine erfolgreiche Immunantwort [126]. Aus diesem Grund scheint IL-6 entscheidend bei der effektiven Handhabung einer akuten Entzündungsreaktion zu sein.

1.4.1.2 Interleukin-10

Interleukin-10 (IL-10) besitzt zahlreiche Funktionen in der Regulation des Immunsystems. Es wirkt unter anderem begrenzend und hemmend auf Abwehrvorgänge, die z.B. in einem septischen Schock münden können und schützt damit den Organismus davor, sich durch übersteigerte Entzündungsprozesse selbst zu zerstören. Es ist zusammen mit TGF- β eines der bedeutendsten antientzündlichen Zytokine und wichtig bei der

Entwicklung der Immuntoleranz [127]. Es hemmt die Bildung von Zytokinen der T_H1 - [128] und der T_H2 -Antwort [129] und wirkt fördernd auf das Überleben, die Proliferation und die Antikörperproduktion von B-Lymphozyten. Die Hemmung der T_H1 - und T_H2 -Antwort erfolgt indirekt über die Hemmung der Antigen-präsentierenden Zellen (APC: antigen presenting cells) [130-132]. IL-10 scheint allerdings mehr als nur Zytokin-Synthese-Inhibitor zu sein, es entspricht eher dem eines pleiotropen Immunmodulators mit aktivierenden und hemmenden Eigenschaften [129]. Es blockt den nukleären Faktor NF κ B und ist in die Regulation des JAK-STAT-Signalweges einbezogen. Interleukin-10 ist ein wesentlicher Immunmodulator im Intestinaltrakt. Ein Mangel geht mit einer Veranlagung zu chronisch entzündlichen Darmerkrankungen wie Morbus Crohn oder Colitis ulcerosa einher. [133]. Bei allergischen Prozessen wie Asthma, Rhinitis oder Ekzem konnte gezeigt werden, dass IL-10 produzierende regulatorische T-Zellen (T-regs) in ihrer Funktion vermindert sind [134].

1.4.1.3 Interleukin-12

Interleukin-12 (IL-12) besteht aus 2 Glykoproteinen, die kovalent über Disulfid-Brücken miteinander verbunden sind. Die leichte Kette hat ein Molekulargewicht von 35kD, die schwere Kette 40kD. Beide Ketten bilden das biologisch aktive p70 Heterodimer. Produziert wird IL-12 von Monozyten, MDCs, Monozyten-abgeleiteten DCs (moDCs) und slanDCs im Rahmen der initialen Phase einer Immunantwort [49]. IL-12 bindet an einen hochaffinen Rezeptor, welcher aus zwei Typ-I-Transmembran-Glykoprotein-Untereinheiten (IL-12R β 1 und IL-12R β 2) besteht. IL-12R β 2 wird von T-Lymphozyten, NK-Zellen, dendritischen Zellen und B-Lymphozyten exprimiert und während einer T_H1 -Immunantwort verstärkt induziert [135].

Interleukin-12 (IL-12) spielt sowohl bei der Zell-vermittelten angeborenen, als auch bei der adaptiven Immunantwort [136] eine zentrale Rolle: Es verstärkt die Zytotoxizität und IFN- γ Produktion von NK-Zellen [137]. Von dendritischen Zellen produziertes IL-12 führt zu einer Differenzierung von naiven CD4+ T-Zellen in IFN- γ produzierende T-Helfer Zellen vom Typ 1. Das von den NK- und T-Zellen sekretierte IFN- γ verstärkt die bakteriozide Wirkung von Makrophagen und stimuliert die Produktion von Komplement-fixierenden Antikörpern durch B-Lymphozyten [138]. Der Hauptstimulus zur IL-12-Sekretion sind virale, bakterielle oder parasitäre Motive, die an TLRs von dendritischen Zellen binden. Die IL-12 Sekretion wird durch IL-4, IL-18, TNF- α und IFN- γ , aber auch durch IL-12 selbst verstärkt. Guenova et al. konnten 2008 zeigen, dass eine vermehrte Sekretion von IL-4 auch zu einer erhöhten Sekretion von IL-12 führt und dadurch eine T_H1 -Antwort fördert [39, 139]. Verminderte Sekretion bewirken TGF- β und IL-10 [140, 141]. Die zentrale Rolle von IL-12 bei der Immunabwehr gegen Pathogene konnte in

Studien mit Knock-out Tieren, welche kein IL-12 produzierten oder mit neutralisierenden Antikörpern gegen IL-12 gezeigt werden [136]. Die Sekretion von IL-12p70 unterliegt einer strengen Kontrolle, da andauernde Expression und systemische Wirkung des Zytokins toxisch sind und die Gefahr einer Autoimmunität gefördert wird [142-144].

1.4.2 Typ-I Interferone

Die Gruppe der Interferone (IFN) umfasst eine heterogene Gruppe von Zytokinen, die zusammen eine Vielfalt an biologischen Funktionen vermitteln. Ihren Namen haben sie aufgrund ihrer Interferenz mit der viralen Replikation erhalten [145]. Sie gehören wie IL-10 zur Familie der Klasse II α -helikaler Zytokine [146]. Während die Gruppe der Typ I Interferonen IFN- α , IFN- β , IFN- ϵ , IFN- κ und IFN- ω beinhalten, stellt IFN- γ das einzige Mitglied der Typ II Interferonen dar. Bei immunologischen Vorgängen sind IFN- α , IFN- β und IFN- γ von besonderem Interesse und wurden auch dementsprechend untersucht [147-150]. Prinzipiell besitzt jede Zelle die Fähigkeit zur Produktion von IFN- α und IFN- β . Plasmazytoide dendritische Zellen stellen, vor allem nach Stimulation durch bakterielle oder virale Pathogene über PRR, die Hauptproduzenten von Typ I Interferonen dar [75]. IFN- γ wird hauptsächlich von T-Zellen und NK-Zellen produziert [151]. Die Wirkung von IFN- α und IFN- β ist zehnfach bis hundertmal stärker als die der Typ II Interferonen [152].

1.4.2.1 Interferon α

Die Genfamilie der humanen IFN- α kodiert für etwa 12 verschiedene Proteine mit Molekulargewichten um 20 kDa, die aus monomeren Polypeptidketten mit einer Länge von 165 oder 166 Aminosäuren bestehen [153]. Typ I-Interferone zeigen viele gemeinsame Eigenschaften, wie zum Beispiel die antivirale Wirksamkeit, die hohe pH- und Temperaturstabilität und den gleichen molekularen Aufbau [154].

Interferon α gehört zur *first line* Abwehr bei viralen Infektionen und kann die Ausbreitung einer viralen Infektion im Anfangsstadium unterbinden [155]. Die antivirale Aktivität der Interferone greift in nahezu jeden Schritt der Virusreplikation ein. Beschrieben wurden unter anderen Interferenzen mit dem Eintritt von Viren in die Wirtszelle, dem *Uncoating*-Prozess (Simian-Virus 40, Retroviren), der Transkription (Influenza, Vesiculostomatitis-Virus (VSV)), der RNA-Stabilität (Picornavirus), dem Translationsprozess (Reovirus, Adenovirus, Vaccinia-Virus), der Reifung, der „Verpackung“ und der Virusfreisetzung (Retrovirus, VSV) [156].

Die infektionsbedingte Aktivierung der Expression von Typ 1 IFN variiert in Abhängigkeit vom Virustyp. Meist sind jedoch erste Virus-Zell-Kontakte, z.B. über strukturelle Viruskomponenten wie Glykoproteine, für eine IFN-Induktion verantwortlich [157], wobei auch virale Nukleinsäuren einen Stimulus für die Aktivierung der IFN-Expression sein

können. Bei RNA-Viren können z. B. einzelsträngige RNA-Moleküle über Toll-like Rezeptoren zu einer Induktion von IFN führen [158]. Bei DNA-Viren können zusätzlich Intermediate, wie doppelsträngige RNA, eine Aktivierung von IFN-Genen induzieren [157]. Alle Typ I-Interferone binden an den gleichen Rezeptor auf der Oberfläche der Zielzellen.

1.5 Oberflächenmarker dendritischer Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Subpopulationen dendritischer Zellen anhand ihrer Expression von Oberflächenmolekülen auf ihre Reifung hin untersucht. Die vermehrte Expression dieser sogenannten Reifungsmarker gibt Auskunft über den jeweiligen Aktivitätszustand der Zellen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die folgenden Oberflächenmoleküle untersucht: CD40, CD80, CD83, CD86, CD206, CCR-7, FcεRI und HLA-DR.

1.5.1 Mannose Rezeptor

Als phagozytierende Zellen sind dendritische Zellen mit Rezeptoren ausgestattet, die Pathogenoberflächen erkennen. Zu diesen Rezeptoren gehört der Mannose-Rezeptor (MR, CD206). CD206 ist ein zellgebundener Lektin-Rezeptor vom C-Typ, welcher wie Toll-like Rezeptoren bestimmte Zuckermoleküle an der Oberfläche von Bakterien bindet. Der MR besitzt eine mehrlappige Struktur mit mehreren Kohlenhydrat-erkennungsdomänen. Als Transmembranrezeptor kann CD206 direkt als Phagozytose-Rezeptor wirken [159]. Nach Erkennung eines Moleküls wird der Rezeptor-Liganden/Antigen Komplex in die Zelle aufgenommen. Phagozytierte Antigene werden in intrazellulären Phagolysosomen in Fragmente zerlegt, an MHC-II (siehe unten) gebunden und wieder an die Plasmamembran transportiert.

1.5.2 HLA-DR

Mit der Reifung wandelt sich die dendritische Zelle von einer Phagozyte in eine professionelle Antigen-präsentierende Zelle (antigen presenting cell, APC), deren Aufgabe es ist, eine primäre T-Zell-Antwort zu initiieren. Die Präsentation von Antigenen erfolgt mittels hoch polymorpher Moleküle, den MHC-Molekülen (major histocompatibility complex). Sie wurden erstmals im Rahmen der Transplantat-Abstoßung entdeckt, weshalb sie beim Menschen humane Leukozytenantigene (HLA: *human leucocyte antigen*) genannt werden. Intrazelluläre Antigene (z. B. virale Proteine, Onkogene, Selbst-Antigene) werden über Klasse I MHC präsentiert, während extrazelluläre Antigene (z. B. mikrobielle Proteine) über MHC Klasse II Moleküle präsentiert werden. Zum

humanen MHC-II Gencluster gehören die hoch polymorphen Gene HLA-DR, HLA-DQ, HLA-DM und HLA-DP.

1.5.3 CCR-7

Die Reifung dendritischer Zellen stellt eine komplexe Umprogrammierung dar, im Zuge derer die DC die Fähigkeit erlangt, vom Ort der Antigenexposition zu den drainierenden Lymphknoten zu wandern. Die Expression spezifischer Chemokin-Rezeptoren ermöglicht dabei die gerichtete Migration entlang von Chemokin-Gradienten. So kommt es im Rahmen der DC-Ausreifung u. a. zur erhöhten Expression des Chemokin-Rezeptors CCR-7 (CD197) [160]. An diesen Rezeptor binden die Chemokine CCL-19 sowie CCL-21 (auch SLC: *secondary lymphoid chemokine* genannt), welche hauptsächlich von den hochendothelialen Venolen und Endothelzellen der lymphatischen Gefäße gebildet werden [161, 162]. Die Bindung der Chemokine an CCR-7 fördert die Migration der dendritischen Zellen zu den Lymphknoten [163], wo sie ihre an die MHC-II Moleküle gebundenen Antigene T-Helfer Zellen präsentieren können.

1.5.4 CD40

Bei CD40 handelt es sich um ein integrales Membranprotein, welches bei B-Lymphozyten, bei dendritischen, hämatopoetischen aber auch bei Epithel- und Karzinomzellen gefunden wird [164]. CD40 gehört zu den Rezeptoren der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie (TNF Familie). Die Bindung des CD40-Liganden einer CD4+ T-Zelle an den CD40-Rezeptor der APC übermittlelt der T-Zelle Aktivierungssignale. Auf Seiten der APC führt diese Interaktion zur vermehrten Sekretion von Zytokinen (z. B. IL-12) sowie zur Aufregulation von Kostimulationsmolekülen, darunter CD80 (B7.1) und/oder CD86 (B7.2).

1.5.5 Der B7 Komplex (CD80, CD86)

Diese beiden Liganden gehören zu der Gruppe der Immunglobulin-Superfamilie. Sie sind Homodimere, deren Ketten jeweils eine variable und eine konstante Domäne besitzen. Sie bilden 2 kostimulatorische Moleküle bei der Bindung von T-Zell Rezeptoren (*T-cell receptor*, TCR) und seines Korezeptors CD4 an ein von den dendritischen Zellen exprimierten und mit Antigenen beladenes MHC II Molekül. Nur im Falle einer Bindung eines der B7 Moleküle der APC an CD28 kommt es zu einer Aktivierung und klonaler Vermehrung der T-Zelle [159].

Aktivierte dendritische Zellen stimulieren T-Zellen über die Bindung eines antigenspezifischen T-Zell-Rezeptors mit Molekülen der MHC Klasse II (MHC-II). Dieser

Prozess ist von der Anwesenheit kostimulatorischer Moleküle wie CD28 und CTLA-4 abhängig. Nur Signale, welche sowohl über den T-Zell Rezeptor als auch über die kostimulatorischen Moleküle übermittelt werden, führen zu einer Aktivierung der T-Zellen. Fehlende Kostimulation führt bei den T-Zellen zu Anergie oder Toleranz.

1.5.6 CD83

Das transmembrane Protein CD83 wird in der Literatur als potenter Reifungsmarker für dendritische Zellen beschrieben. Über seine Funktion ist bislang wenig bekannt. Allerdings gibt es Hinweise, dass CD83 die B-Zell Funktion, die T-Zell Reifung aber auch die periphere T-Zell Aktivierung reguliert [165, 166].

1.5.7 Fc ϵ RI

Als weiterer Marker wurde der Fc ϵ I-Rezeptor untersucht. Hierbei handelt es sich um den hochaffinen Rezeptor für IgE. Fc ϵ RI ist ein tetramerer Rezeptor, welcher aus einer α -Kette, einer β -Kette und zwei γ -Ketten besteht. Novak et al. konnten zeigen, dass in der Haut von Patientin mit atopischem Ekzem vermehrt inflammatorische dendritische Zellen (*inflammatory dendritic epidermal cell*: IDEC), welche die höchste Fc ϵ RI-Expression in der Haut aufweisen [167]. IDECs sind in normaler Haut gesunder Patienten und in nichtläsionaler Haut der AE-Patienten nicht zu finden. Sie werden in der akuten Phase der AD aus zirkulierenden oder dermalen Vorläufern rekrutiert. Die exakte Vorläuferzelle der IDECs ist bislang nicht bekannt. Aufgrund der Vermutung, dass vielleicht die slanDCs die Vorläuferzelle der IDECs stellen, wurden die slanDCs auf ihre Expressierung des Fc ϵ -Rezeptors I hin untersucht. Die Bindung des IgE-Antikörpers an Fc ϵ RI führt bei Mastzellen zu einer Degranulation mit Freisetzung von Histamin [168]. Fc ϵ RI wird auf dendritischen Zellen, auf basophilen- [169], eosinophilen- [170], neutrophilen Granulozyten [171] und auf Langerhanszellen [172] exprimiert.

2 Ziel der Arbeit

Pollen stellen den häufigsten Auslöser von Überempfindlichkeitsreaktionen bei den Menschen dar und verursachen Krankheiten wie Asthma, Rhinokonjunktivits oder das atopische Ekzem. In den letzten Jahren stellte sich heraus, dass im Pollen nicht nur Allergene vorhanden sind, sondern auch sogenannte Pollen-assoziierte Lipidmediatoren (PALMs). Es konnte gezeigt werden, dass diese PALMs einen Einfluss auf die Migration und die Aktivierung von neutrophilen und eosinophilen Granulozyten haben [23, 24]. Weiterhin konnten Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass Pollen-assoziierte E₁-Phytoprostane die LPS-induzierte Interleukin-12 Produktion von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (moDCs) hemmen und es dadurch zu einer Unterdrückung von T_H1-Antworten und einer Förderung von T_H2-Antworten kommt [25]. Da es sich bei den moDCs um *in vitro* generierte dendritische Zellen handelt, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von Pollen-assoziierten Lipidmediatoren auf native humane dendritische Zellen untersucht werden.

Unterschiedliche DC-Subtypen spielen differentielle Rollen bei der Entstehung und/oder Aufrechterhaltung von allergischen Erkrankungen. So fanden Schäkel et al. heraus, dass sich slanDCs in der Haut von Patienten mit atopischen Ekzem finden (nicht publizierte Daten). Auch beschreiben Novak und Bieber inflammatorische dendritische epidermale Zellen (IDEC: *inflammatory dendritic epidermal cells*), welche in Läsionen von Patienten mit chronischem atopischem Ekzem gefunden werden [167]. Sie vermuten, dass sich diese IDECs aus Monozyten ableiten. Die Rolle von IDECs im Atopischen Ekzem ist bisher allerdings unklar. Weiterhin konnte im murinen Asthmodell ein protektiver Einfluss von plasmazytoiden dendritischen Zellen beschrieben werden [173].

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der Einfluss von wasserlöslichen Substanzen aus Birkenpollen und speziell der Phytoprostane auf die Reifung und Zytokinproduktion von nativen Subpopulationen dendritischer Zellen aus humanem, peripherem Blut untersucht. Es wurden drei verschiedene Populationen an dendritischen Zellen isoliert: Die myeloiden, plasmazytoiden und slanDCs. Die Zellen wurden mit geeigneten Reifungsstimuli in Gegenwart oder Abwesenheit von Pollenextrakten bzw. E₁- oder F₁-Phytoprostanen inkubiert. Anschließend wurde untersucht, ob und gegebenenfalls welchen Einfluss die Lipidmediatoren auf die Zytokinsekretion und/oder Reifung der DCs haben.

3 Materialien und Methoden

3.1 Materialien

3.1.1 Probanden

Die Blutentnahmen erfolgten von freiwilligen Probanden (Frauen oder Männer, Alter 19-54 Jahre), die über keinerlei Symptome einer Allergie berichteten und einen Gesamt-IgE Spiegel <50kU/ml sowie kein spezifisches IgE gegen 12 verschiedene getestete Allergene aufwiesen (=RAST-Klasse 0).

3.1.2 Biologisches Material

Bovines Serum Albumin (BSA)	Sigma, München, Deutschland Best.-Nr. A2153-100G
Pollen von <i>Betula alba</i> L.	Sigma, München, Deutschland Best.-Nr. P6770
CpG oligonucleotide type A (ODN 2216)	Invivogen, San Diego, USA Best.-Nr. 05°28-MT
CpG oligonucleotide type B (ODN 2006)	Hycult, Uden, Niederlande Best.-Nr. HC4039
Ent-PPE ₁ /16-epi-PPE ₁	PD Bernd Spur, Department of Cell Biology, School of Osteopathic Medicine, University of Medicine and Dentistry of New Jersey
MACS BSA Stock Solution	Mytenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland Best.-Nr. 130-091-376
Phytoprostan A ₁	Prof. Martin J. Müller, Julius-von-Sachs Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
Phytoprostan B ₁	Prof. Martin J. Müller, Julius-von-Sachs Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
Phytoprostan E ₁	Prof. Martin J. Müller, Julius-von-Sachs Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
Phytoprostan F ₁	Prof. Martin J. Müller, Julius-von-Sachs Institut für Pharmazeutische Biologie, Universität Würzburg
Recombinant Human Interleukin-3	Immunotools, Friesoythe, Deutschland

R-848 (Resiquimod)	Best.-Nr. 11340032 Alexis, Grünberg, Deutschland Best.-Nr. ALX-420-038-M005
Antikörper:	
Anti-IgM Microbeads	Mytlenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland Best.-Nr. 130-093-230
Biotin mouse anti-human IL-6 monoclonal antibody	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 554546
Biotin mouse anti-human IL-12 (p40/p70)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 554660
MDC8+-AK	Knut Schäkel, Dresden, Deutschland
Purified rat anti-human IL-6	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 554543
Purified rat anti-human IL-12	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 5545065
Kits:	
CD1c (BDCA1) ⁺ Dendritic Cell Isolation Kit, human	Mytlenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland Best.-Nr- 130-090-506
Diamond Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit, human	Mytlenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland Best.-Nr- 130-092-402
Human IFN-alpha Module Set	Bender MedSystems, Wien, Österreich Best.-Nr. BMS216MST
BD OptEIA™ Set Human IL-10	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555157

3.1.3 Chemikalien, Verbrauchsmaterial und Geräte

Chemikalien:

Aqua ad injectabilia	Delta Select, Pfullingen, Deutschland
autoMACS Rinsing Solution	Mytlenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland

	Best.-Nr. 130-091-222
autoMACS Running Buffer	Myltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
	Best.-Nr. 130-091-221
autoMACS Pro Washing Solution	Myltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
	Best.-Nr. 130-092-987
DMSO (Dimethyl-Sulfoxid)	Baker, Griesheim, Deutschland
	Best.-Nr 7157
DPBS w/o Ca/MG	Invitrogen, Paisley, GB
	Best.-Nr. 14190094
10x CPBS w/o Ca/MG	Invitrogen, Paisley, GB
	Best.-Nr. 70013-016
EDTA	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
	Best.-Nr. ED4SS
FACS-Flow	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
	Best.-Nr. 342003
Gentamycin	Invitrogen, Paisley, GB
	Best.-Nr. 15710049
Heparin-Natrium 250.000U	Ratiopharm, Ulm, Deutschland
	Best.-Nr. PZN-7833909
Hydrogen Peroxide	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
	Best.-Nr. H1009-5ML
L-Glutamin	Invitrogen, Paisley, GB
	Best.-Nr. 25030024
Lymphoprep	Axis-Shield, Oslo, Norwegen
	Best.-Nr. 1114545
Lymphoprep	Axis-Shield, Oslo, Norwegen
	Best.-Nr. 1114547
2-Mercapto-Ethanol	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
	Best.-Nr. M-7522

RPMI 1640 + L-Glutamine	Invitrogen, Paisley, GB Best.-Nr. 21875-034
Streptavidin-horseradish Peroxidase	GE Healthcare, Buckinghamshire, GB Best.-Nr. RPN4401V
3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine (TMB) Liquid Substrate System for ELISA	Sigma, Taufkirchen, Deutschland Best.-Nr T0440-100ML
Trypan Blue 0,4% solution	Sigma, Taufkirchen, Deutschland Best.-Nr. T-8154
Tween 20 Detergent	Merck, Darmstadt, Deutschland Best.-Nr. 655205
Verbrauchsmaterial:	
AffinityPak Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel	Pierce, Rockford, USA Best.-Nr. 20344
autoMACS Separation Columns	Myltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland Best.-Nr. 130-021-101
Filtopur V50 0,2m 500ml Vacuum Filter	Sarstedt, Nümbrecht , Deutschland Best.-Nr.83.1823.001
HiTrap™ Phenyl FF (high sub) Columns	GE Healthcare, München, Deutschland Best.-Nr. 28-9339-64 AC
Kapillarspalt-Objektträger 100µm	Dako, Hamburg, Deutschland Best.-Nr. S2025
MACS Separation LS Columns	Myltenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland Best.-Nr- 130.042-401
Microcon Centrifugal Filter Devices YM-3	Millipore, Billerica, USA Best.-Nr. 42404
Mikro-Schraubröhre 2ml, PP	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland Best.-Nr.72.694.006
Original-Perfusor-Spritze OPS 50ml	Braun, Melsungen, Deutschland

	Best.-Nr. 8728810F
Röhre 15ml	Sarstedt, Nümbrecht , Deutschland
	Best.-Nr-62.554.502
Röhre 50ml	Sarstedt, Nümbrecht , Deutschland
	Best.-Nr-62.547.254
Serum-Monovetten	Sarstedt, Numbrecht, Deutschland
	Best.-Nr. 02.1063.500
96-well Mikrotitrierplatten T-Form steril	Nalge Nunc, Rochester, USA
	Best.-Nr. 167008
96-well Mikrotitrierplatten U-Form steril	Nalge Nunc, Rochester, USA
	Best.-Nr. 163320
96-well Mikrotitrierplatten für ELISA (flachbödig)	Nalge Nunc, Rochester, USA
	Best.-Nr. 449824
384-well Mikrotitrierplatten T-Form steril	Nalge Nunc, Rochester, USA
	Best.-Nr. 242765
Geräte:	
Auto-MACS™ Pro	Mytlenyi, Bergisch Gladbach, Deutschland
FACSCalibur	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Feinwaage	MC1 Research, Sartorius, Göttingen, Deutschland
Lichtmikroskop	Axiovert 25, Fa. Zeiss, Jena, Deutschland
Mikrowellenbad	Sonorex super RK 103H, Bandelin, Schalltec, Mörfelden-Walldorf, Deutschland
Multipette	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten	Reference, Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Schüttler	Titramax 100, Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wasserbad	Typ 1003, GFL, Burgwedel, Deutschland

Zentrifuge	Megafuge 1.0R, Heraeus, Osterode, Deutschland
Zentrifuge	Multifuge 1 L-R, Heraeus, Osterode, Deutschland
ELISA-Reader	MRX ^{TC} Revelation, Dynex, Berlin, Deutschland

3.1.4 Verwendete Medien

FACS-Puffer

500ml DPBS Dulbecco's w/o Ca/Mg, 0,02% Na-Azid, 5% FCS
Lagerung bei 4-8°C

MACS-Puffer

500ml DPBS Dulbecco's w/o Ca/Mg, 2ml EDTA (entspricht 2mM, aus Invitrogen 0,5M EDTA, pH 8,0), 2,5g BSA (entspricht 0,5%)
Sterilfiltriert, vor Gebrauch entgast, Lagerung bei 4-8°C

Humanes-DC Medium (HU-DC)

450ml RPMI 1640 Medium with L-Glutamin (GibcoTM, Lot No. 3063498), 50ml FCS inaktiviert, 5ml Glutamin, 1ml Gentamycin, 500µl 50mM 2-Mercaptoethanol
Sterilfiltriert, Lagerung bei 4-8°C

3.2 Methoden

3.2.1 Herstellung von wässrigen Pollenextrakten

Die wässrigen Pollenextrakte (APE) wurden in einer Konzentration von 20mg Pollen/ml Puffer hergestellt. *Betula alba*-Pollen wurden abgewogen und mit RPMI 1640 aufgefüllt. Die Pollenlösung wurde durch Vortexen homogenisiert und für 30 Minuten im 37°C warmen Wasserbad inkubiert, wobei die Lösung alle 10min gevortext wurde. Anschließend wurde die Lösung während 15min bei 12000g zentrifugiert. Der Überstand dieses Zentrifugats wurde sterilfiltriert.

3.2.1.1 Elution von LPS aus wässrigen Pollenextrakten über Detoxigel Säulen

Um möglicherweise in Pollenextrakten vorhandenes bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) zu entfernen, wurden die Extrakte mittels AffinityPak Detoxi-Gel Endotoxin Removing Gel Säulen (Pierce, Rockford, USA) eluiert. Dazu wurden die Säulen jeweils nachfolgend mit 5ml DPBS ohne Calcium/Magnesium, 5ml 1% Desoxycholicacid, 5ml aqua ad injectabilia und 10ml DPBS ohne Calcium/Magnesium gespült. Die Lösungen wurden stets bis auf den Filter durchlaufen gelassen bevor die nächste Lösung dazugegeben wurde. Nach der Äquilibrierung der Säulen wurden 1,5ml *Bet.*-APE auf die Säule gegeben und bis auf den Filter durchlaufen gelassen. Anschließend wurden 200µl DPBS ohne Ca/Mg aufpipettiert, um ein Austrocknen der Säulenmatrix zu verhindern, und die Säulen mit dem Pollenextrakt für 1h bei RT inkubiert. Nach der Inkubation wurde 1ml DPBS ohne Calcium/Magnesium auf den Filter pipettiert und die wässrigen Pollenextrakte eluiert. Die ersten 500µl des Eluats wurden dabei verworfen, der Rest ($\pm 750\mu\text{l}/\text{Säule}$) wurde aufgefangen. Die Säulen wurden noch einmal mit 5ml DPBS o/w Ca/Mg, 5ml 1% Desoxycholicacid und 10ml DPBS ohne Calcium/Magnesium gespült. Zur Aufbewahrung wurde auf jede Säule $\pm 3\text{ml}$ 25% Ethanol pipettiert.

3.2.1.2 Herstellung von proteinfreiem *Bet.*-APE

Das LPS-depletierte *Bet.*-APE wurde mit Proteinase K (10mg/ml) in einer 1/10 Verdünnung versetzt (finale Konzentration 1mg/mL). Nach einer 2-stündigen Inkubationszeit im 37°C heißen Wasserbad wurde die Proteinase K durch 10 minütiges Erhitzen bei 90°C deaktiviert. Das verdaute *Bet.*-APE wurde bis zum Beginn des Experiments (maximal 1Std.) auf Eis aufbewahrt.

3.2.1.3 Herstellung von fraktioniertem *Bet.*-APE

Zur Herstellung von fraktioniertem *Bet.*-APE wurden YM-3kD Cut-off Säulen von Microcon benutzt. Diese bestehen aus einem Reagenzgefäß mit einem Einsatz, der eine Filtermembran enthält. Die Poren dieser Membran lassen Proteine mit höherer molekularer Masse als 3kD nicht passieren. Die Protein-haltige Lösung wird in die Einsätze pipettiert und dann mittels Zentrifugation in das untere Reservoir filtriert.

Zunächst wurde das Glycerin aus den Membranen entfernt. Dazu wurden 500µl Aqua ad injectabilia in den Einsatz pipettiert. Es folgte eine 50minütige Zentrifugation bei 14000g bei 4°C. Nach dem Zentrifugieren wurde der Einsatz invertiert. Nach einer weiteren kurzen Zentrifugation im Quick-run Modus (30s bis 13900g) zur Entfernung von restlicher Flüssigkeit wurde das Röhrchen geleert.

Anschließend wurden 500µl 70% Ethanol in den Einsatz pipettiert, um den Filter zu desinfizieren. Die Lösung wurde für 20min bei 14 000g zentrifugiert. Der Einsatz wurde wieder invertiert. Das Röhrchen wurde wieder zentrifugiert (Quick-run) um den restlichen Alkohol zu entfernen. Das Röhrchen wurde verworfen und der Einsatz wurde in ein neues Röhrchen gestellt.

Zur Filtration von *Bet.*-APE wurden 500µl *Bet.*-APE in den Einsatz pipettiert und für 90min bei 14 000g zentrifugiert. Nach diesem Schritt wurde der Einsatz aus dem Röhrchen genommen. Es wurden 50-100µl des Konzentrats aus dem oberen Reservoir in ein Sarstedt Röhrchen überführt, das Volumen mit der Pipette abgemessen und mit PBS ohne Ca/mg auf 500µl aufgefüllt. Das Röhrchen mit dem Filtrat wurde ebenfalls auf 500µl aufgefüllt.

Das Ergebnis waren zwei Fraktionen: das Konzentrat, in dem Proteine >3kD angereichert und das Filtrat, in dem ausschließlich Substanzen <3kD enthalten waren.

3.2.2 Zellkultur

3.2.2.1 Isolierung von peripheren blood mononuclear cells (PBMC)

Gesunden, nicht-atopischen Probanden (siehe Abschnitt 3.1.1) wurden 300ml Vollblut aus einer Armvene in heparinisierten 50ml-Spritzen entnommen. Hieraus wurden PBMC mittels Dichtegradientenzentrifugation isoliert.

Das Blut wurde hierfür 1:2 in DPBS ohne Ca/Mg verdünnt. Das verdünnte Blut wurde sodann auf Lymphoprep™ (Axis-Shield, Oslo, Norwegen) als Trennmedium geschichtet. Nach 15minütiger Zentrifugation bei 900g ohne Bremse erhält man vier verschiedene Banden: Oben befindet sich das Plasma, gefolgt von einer dünnen Bande mit den PBMC (Monocyten, NK-Zellen, T- und B-Zellen). Direkt oberhalb des Trennmediums befinden sich die Thrombozyten und unten im Konus die Erythrozyten und Granulozyten. Die PBMC wurden vorsichtig aspiriert und dreimal mit DPBS ohne Ca/Mg + 5mM EDTA gewaschen. Beim ersten Waschschrift wurde die Zellen mit 589g (1600rpm) zentrifugiert, ab dem nächsten Waschschrift mit 301g (1200rpm). Nach dem 3. Waschschrift wurden die Zellen gezählt und weiter prozessiert.

3.2.2.2 slanDCs

3.2.2.2.1 Isolierung von slanDCs aus PBMC

Die PBMC wurden in 40ml HU-DC Medium aufgenommen und über Nacht auf Eis inkubiert. Dieser Schritt erwies sich als hilfreich, um eine bessere Reinheit der slanDCs zu erhalten. Am folgenden Tag wurden die Zellen mit DPBS ohne Ca/Mg + 2mM EDTA gewaschen. Zur Zählung wurde ein Aliquot von 5µl der PBMC in 95µl 0,5% Trypan-Blau

aufgenommen (Verdünnung 1/20), 10µl dieser Suspension in eine Neubauer-Zählkammer pipettiert und im Mikroskop ausgezählt. Quantifiziert wurden dabei sowohl vitale (Trypan-Blau negative) als auch tote (Trypan-Blau gefärbte) Zellen. Anschließend wurden die slanDCs mittels *Magnetically Activated Cell Sorting* (MACS™, Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland; siehe Abschnitt 3.3) durch positive Selektion isoliert. Hierfür wurden je 10⁸ Zellen in 1ml entgastes DPBS ohne Ca/Mg + 2mM EDTA aufgenommen und der MDC8+-AK (Klon 1A4, zur Verfügung gestellt von Dr. Knut Schäkel, TU Dresden) in einer Verdünnung von 1/60 in die Zellsuspension gegeben. Die Antikörperbindung erfolgte für 15min auf Eis. Es folgte ein Waschschrift (Auffüllen des Röhrchens bis zur 50ml Marke mit DPBS w/o Ca/Mg mit 2mM EDTA, 10-minütige Zentrifugation bei 301g). Das Pellet wurde in 2ml MACS-Puffer aufgenommen, *rat anti mouse IgM Microbeads* (Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Deutschland) in einer Konzentration von 15µl/10⁸ Zellen zugegeben und die Zellen für 15min im Kühlschrank inkubiert. Es folgte ein weiterer Waschschrift. Das Zellpellet wurden sodann in 500µl/10⁸ Zellen aufgenommen und entweder manuell über 2 LS-Säulen oder automatisch mit dem autoMACS™Pro (Miltenyi Biotech) isoliert. Verwendet wurde hierbei das Isolationsprogramm „Posseld2“.

Nach der Isolierung wurden die Zellen in der Positiv-Fraktion gezählt (1/2 Verdünnung in Trypan-Blau) und in HU-DC-Medium in einer Konzentration von 1,5x10⁶ Zellen pro ml gebracht. Je nach Proband wurden zwischen 2,5 - 9x10⁶ slanDCs isoliert. Direkt nach der Isolation wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie phänotypisiert (Zeitpunkt t=0Std.). Die FACS-Färbung (30min, 4-8°C) erfolgte in einer 96-well Rundboden Platte (Nunc) bei einer Zelldichte von 75.000 Zellen/well in 100µl FACS-Puffer. Die Antikörper-Verdünnungen betragen jeweils 1:100 (alle verwendete Antikörper von Becton Dickinson, siehe Abschnitt 3.4.2). Nach der Färbung wurden die Zellen zweimal mit FACS-Puffer gewaschen (Quick-run bis maximal 13.900g), in 200µl FACS-Puffer aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Die Messung erfolgte am FACSCalibur unter Verwendung von CellQuest Software (Gerät und Software von Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland). Analysiert wurde die Expression der Marker M-DC8, CD16, CD80, CD83, CD86, CD40, CCR-7, HLA-DR, CD206 sowie FcεRI. Die Reinheit der slanDCs betrug 80-<95%.

3.2.2.2 Versuchsaufbau

Nach der Phänotypisierung wurden die restlichen slanDCs in 384-well Flachboden Platten (Nunc) in einer Dichte von 75.000 Zellen/well eingesät (Zelldichte 75.000 Zellen pro well) und bei 37°C, 5%CO₂ inkubiert. Nach einer Spontanreifungszeit von 6Std. wurden die Zellen mit den jeweiligen Stimulanzen (LPS: 100ng/ml; *Bet.-APE*: 3mg/ml,

PPs: $2 \times 10^{-7} \text{M}$) versehen. Es wurden verschiedene Ansätze verfolgt: entweder wurden nach 24Std. Inkubation die Expression der Reifungsmarker auf der Zelloberfläche durchflusszytometrisch bestimmt oder die Zytokinproduktion im Überstand mittels ELISA untersucht. Jeder Stimulus wurde in Triplikaten angesetzt. Der Versuchsaufbau für beide Ansätze war nahezu identisch und ist in Abbildung 5 schematisch dargestellt. Für die Zytokinuntersuchung (IL-6, IL-10 und IL-12) wurden die Überstände nach 24Std. Stunden abpipettiert und bis zur Analyse bei -80°C eingefroren.

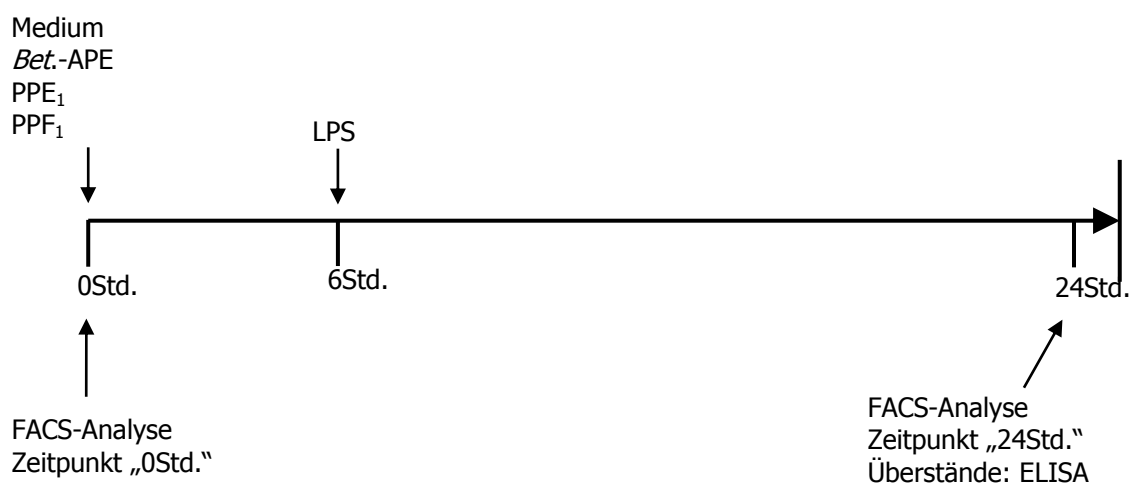


Abb. 5: Experimenteller Aufbau für die Untersuchung von Reifung und Zytokinproduktion der slanDCs. Nach der Isolierung wurden die Zellen durchflusszytometrisch phänotypisiert und mit Bet.-APE, PPE₁ und PPF₁ stimuliert. Nach 6 Stunden Vorreifung wurden die restlichen Zellen in Kultur genommen und mit wässrigen Pollenextrakten, welche über Detoxigel Säulen von LPS eluiert wurden, stimuliert. Zum Zeitpunkt 24Std. wurden die Zellen gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. In den Überständen wurde mittels ELISA die IL-6-, IL-10- und IL-12-Zytokinsekretion quantifiziert.

Für die durchflusszytometrische Bestimmung der Oberflächenmarker wurden die Zellen geerntet und mit FITC-, PE- oder APC-gekoppelten Antikörpern gegen die Reifungsmarker CD80, CD40, CD83, CCR-7, CD86 und HLA-DR sowie gegen CD206 und FcεRI gefärbt und wie oben beschrieben der FACS Analyse unterzogen. Ein Aliquot der Zellen wurde jeweils mit Propidium-Iodid gefärbt, das sich in apoptotische oder nekrotische Zellen einlagert, während vitale Zellen ungefärbt bleiben. Auf diese Weise lässt sich die Überlebensrate der Zellen unter den unterschiedlichen Stimulationsbedingungen ermitteln.

3.2.2.3 Myeloide dendritische Zellen (MDC)

3.2.2.3.1 Isolierung von myeloiden dendritischen Zellen (MDC)

Zur Isolierung der MDCs wurde das CD1c (BDCA1)⁺ Dendritic Cell Isolation Kit von Miltenyi benutzt. Die Isolierung erfolgte nach dem Protokoll von Miltenyi, wobei nur die Hälfte der angegebenen Mengen an *MircoBeads* verwendet wurde. Das Prinzip der

Isolation ist folgendermaßen: Zunächst werden aus den PBMC mittels CD19 *MicroBeads* B-Zellen depletiert, da diese z.T. ebenfalls CD1c exprimieren. Anschließend wird die Negativ-Fraktion mit CD1c *MicroBeads* markiert und die Zellen erneut über die Säulen gegeben; die Positiv-Fraktion enthält dann die CD1c⁺ MDCs. Die Isolierung erfolgte wiederum automatisch mit Hilfe des autoMACS™ pro (Programm für die Negativ-Selektion: Depletex; Programm für die anschließende Positiv-Selektion: Posseld2).

Nach der Isolation wurden die Zellen gezählt und in einer Konzentration von $0,75 \times 10^6$ Zellen pro ml in HU-DC Medium aufgenommen. Ein Aliquot der Zellen wurde direkt durchflusszytometrisch phänotypisiert (Zeitpunkt t=0Std.), wobei mit den Antikörpern CD11c-PE, CD80-FITC, CD83-PE, CD86-PE-Cy5.5, CD40-FITC, CCR-7-PE und HLA-DR-APC gefärbt wurde (Vorgehen siehe Abschnitt 3.2.2.2). Die Reinheit der Zellen betrug $85,41 \pm 10,01\%$.

3.2.2.3.2 Versuchsaufbau

Nach der Phänotypisierung wurden die restlichen Zellen in eine 96-well Flachboden Microtiterplatte (Nunc) eingesät (Zelldichte 75.000 Zellen/well). Gleich im Anschluss wurden der Zellkultur unterschiedliche Reifungsstimuli (LPS: 100ng/ml; R-848: 2,4µg/ml) zugesetzt. Die Ausreifung erfolgte jeweils in Abwesenheit oder Gegenwart von *Bet.*-APE oder PPE₁. Unstimulierte Zellen dienen als Kontrolle. Nach der Inkubation (24Std., 37°C, 5%CO₂) wurde der Zellkulturüberstand abgenommen und die Zytokinproduktion (IL-6, IL-12) mittels ELISA bestimmt; die Zellen wurden geerntet und der FACS Analyse unterzogen. Gefärbt wurde mit den Antikörpern CD80-FITC, CD83-PE, CD86-PE-Cy5.5, CD40-FITC, CCR-7-PE und HLA-DR-APC. Mittels Propidium-Iodid Färbung wurde zudem die Überlebensrate der Zellen unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen ermittelt. Eine schematische Darstellung des Versuchsaufbaus ist in Abbildung 6 gezeigt.

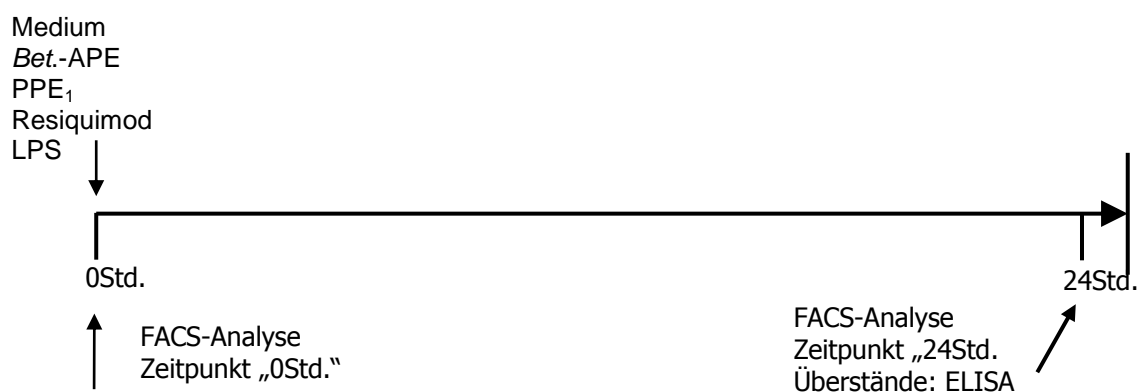


Abb. 6: Experimenteller Aufbau für die Untersuchung von Reifung und Zytokinproduktion der MDCs. Direkt nach der Isolation wurden die Zellen im FACS phänotypisiert. Die restlichen Zellen wurden in Kultur genommen und mit wässrigen Pollenextrakten welche über Detoxigel Säulen von LPS eluiert wurden, stimuliert. Nach 24Std. wurden die Zellen geerntet und durchflusszytometrisch die Expression von Reifungsmarkern bestimmt. Die Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-12 wurde im Überstand mittels ELISA nachgewiesen.

3.2.2.4 Plasmazytoide dendritischen Zellen (PDC)

3.2.2.4.1 Isolierung von plasmazytoiden dendritischen Zellen (PDC)

Die PDCs wurden mit Hilfe des Diamond Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit (Miltenyi Biotech) isoliert. Es wurde nach Protokoll des Herstellers verfahren, wobei auch hier jeweils nur die Hälfte der von Miltenyi empfohlenen Mengen an Antikörpern bzw. *MicroBeads* verwendet wurden.

Isoliert wurden die Zellen mit Hilfe des auto-MACSTM pro, wobei zuerst eine Negativ-Selektion (Programm: Depletes) und nach Zugabe des CD304-AK (BDCA-4/Neutrophilin-1) die Positiv-Selektion (Programm „Posseld2“) durchgeführt wurde.

Gleich nach der Isolierung wurden die Zellen gezählt, in einer Konzentration von $0,75 \times 10^6$ Zellen pro ml in HU-DC Medium aufgenommen und rh IL-3 in einer Konzentration von 10pg/ml zugegeben, um ein Absterben der PDCs in Kultur zu verhindern. Anschließend wurden die Zellen in eine 96-well Flachboden Platte eingesät (Zelldichte 75.000 – 100.000 Zellen/well). Ein Aliquot der frisch isolierten Zellen wurde sofort gefärbt und durchflusszytometrisch untersucht. Die Färbung erfolgte nach dem oben beschriebenen Protokoll (siehe Abschnitt 3.2.2.3.1). Bestimmt wurde die Expression der Reifungsmarker CD80, CD83, CD86, CD40, CCR-7 und HLA-DR. Zusätzlich erfolgte der Nachweis von PDCs mit einem PE-Cy5-konjugierten Antikörper gegen IL-3R α (CD123). Die so ermittelte Reinheit der PDCs betrug $94,98 \pm 4,73\%$.

3.2.2.4.2 Versuchsaufbau

Die Zellen wurden sofort im Anschluss an die Isolation stimuliert. Zwei unterschiedliche Protokolle wurden verwendet: Für die Analyse der Reifungsmarker wurden die Zellen entweder unstimuliert belassen oder mit CpG-B (10 μ M) alleine, sowie in Kombination mit *Bet*-APE (3mg/ml) oder PPE₁ (2x10⁻⁷M) ausgereift. Nach 24Std. Inkubation (37°C, 5%CO₂) wurden die Zellen geerntet und die Expression der Reifungsmarker mittels FACS-Analyse untersucht (Vorgehen siehe Abschnitt 3.2.2.3.2). Bestimmt wurden wieder die Marker CD80, CD83, CD86, CD40, CCR-7 und HLA-DR. Für die Untersuchung der IFN- α Sekretion wurden die Zellen mit CpG-A (1 μ M) entweder alleine oder in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen an *Bet*-APE oder PPE₁ stimuliert. Nach 24Std. wurden die Überstände abgenommen und im ELISA die IFN- α -Sekretion bestimmt. Die Zellen wurden jeweils mit Propidium-Iodid gefärbt, um ein Maß für die Überlebensrate unter den verschiedenen Stimulationsbedingungen zu erhalten. Abbildung 7 veranschaulicht den Versuchsaufbau.



Abb. 7: experimenteller Aufbau für die Untersuchung der Reifung und der Zytokinproduktion der PDCs. Zum Zeitpunkt 0Std. wurden die Zellen phänotypisiert und mit *Bet.-APE*, *PPE₁*, *CpG-A* oder *CpG-B* stimuliert. Nach 24Std. Reifung konnten die Zellen im FACS-Gerät im Hinblick auf ihre Reifung angeschaut werden. Aus den Überständen wurde im ELISA die *IFN-α*-Sekretion quantitativ untersucht.

3.3 Prinzip des Magnetically Activated Cell Sorting (MACS)

Das Prinzip des *Magnetically Activated Cell Sorting* (MACSTM) beruht – sowohl bei manueller, als auch bei automatischer Separation – auf der Verwendung von MACS *MicroBeads*, MACS-Separatoren (Magneten) und (Matrix-Material) MACS-Säulen. Bei den *MicroBeads* handelt es sich um superparamagnetische Partikel von 50nm Durchmesser, die aus biologisch abbaubarem Material bestehen, so dass ein Entfernen der *MicroBeads* nach der Zellseparation nicht nötig ist. Es können entweder direkt mit *MicroBeads* gekoppelte oder, falls diese nicht erhältlich sind, indirekt markierte Antikörper verwendet werden. In der Regel bewirkt die Markierung mit *MicroBeads* keine Aktivierung der Zellen.

Die markierten Zellen werden zunächst auf die Säulenmatrix geladen, welche sich in einem starken Magnetfeld befindet. Durch das Magnetfeld werden die markierten Zellen auf der Säule zurückgehalten, während unmarkierte Zellen im Durchfluss verbleiben. Es ist demnach sowohl eine Positiv-, als auch eine Negativ-Isolation von Zellen möglich.

Nach intensivem Waschen der Säule werden die markierten Zellen eluiert, indem die Säule aus dem Magnetfeld entfernt und die Zellsuspension aus der Säule in ein Gefäß transferiert wird. Bei der manuellen Separation erfolgt die Elution durch Druck mit Hilfe eines Stempels. Bei der Separation mittels AutoMACSTM erfolgen die Aufnahme der Probe, der Transport auf die Säule, sowie die Elution mittels eines hydraulischen Pumpensystems. Die Magneten werden durch einen Elektromotor in Stellung gebracht. Zur besseren Anreicherung markierter Zellen bei der Positiv-Selektion kann die Probe nach der Elution erneut über eine Säule gegeben werden. Dies ist auch bei der automatischen Selektion im AutoMACSTMPro möglich.

3.4. Durchflusszytometrie

3.4.1 Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein optisches Messsystem zur schnellen phänotypischen Charakterisierung von Zellpopulationen. Sie basiert auf dem Prinzip der Anfärbung zell-assoziiertes Moleküle mit geeigneten Fluorochromen, welche Fluoreszenz emittieren, wenn sie von monochromatischem Licht angeregt werden. Für die Analyse im Durchflusszytometer wird ein steter Fluss einer Trägerflüssigkeit erzeugt, in welcher die fluoreszenz-markierten Zellen aufgenommen und die Fluorophore durch monochromatisches Licht – im Falle des für diese Arbeit verwendeten FACSCalibur (Becton Dickinson, Heidelberg) durch Argon-Laserlicht der Wellenlänge 488nm – angeregt werden. Mit Hilfe eines Mantelstroms werden die Zellen nach dem Prinzip der hydrodynamischen Fokussierung in Einzelzellsuspension hintereinander durch das Laserlicht geführt. Dadurch kann synchron die Größe, die Granularität und die Fluoreszenz jeder einzelnen Zelle analysiert werden kann.

Um Aussagen über Größe und Granularität machen zu können, wird das Streulicht, das beim Durchtritt der Zellen durch das Laserlicht entsteht, von verschiedenen Detektoren registriert. Die Intensität des von den Zellen in Vorwärtsrichtung gestreuten Lichtes ist ein Maß für die Zellgröße und wird vom sog. FSC-Detektor (*Forward Scatter*) gemessen. Das Seitwärtsstreulicht wird dagegen vom SSC-Detektor (*Side Scatter*) aufgenommen und lässt Rückschlüsse auf Zelldichte und –Granularität zu. Graphisch in Dot Plots veranschaulicht, ergeben sich anhand dieser morphologischen Kriterien für bestimmte Zellpopulationen bestimmte Bereiche: Je größer eine Zelle ist, umso weiter rechts wird sie auf der FSC-Achse dargestellt; je stärker granuliert sie ist, umso weiter oben erscheint sie auf der SSC-Achse. Auch die Fluoreszenzen werden in unterschiedlichen Kanälen detektiert und können sowohl im Dot Plot als auch im Histogram Plot dargestellt werden. Für die selektive Auswertung einzelner Zelltypen können sog. *Gates* eingegeben werden, so dass z.B. ausschließlich die Population der FITC-markierten Zellen (FL1 positive Wolke) dargestellt und analysiert werden kann [174]. Neben der Darstellung unterschiedlicher Populationen in einer Zellmischung bietet die Methode der Durchflusszytometrie zahlreiche weitere Anwendungsmöglichkeiten. So können u.a. funktionelle Untersuchungen von Aktivierungszuständen anhand der Hochregulierung von Oberflächenmolekülen beobachtet werden. Eine weitere für diese Arbeit genutzte Funktion war die Unterscheidung zwischen vitalen und nekrotischen Zellen.

3.4.2 Verwendete Antikörper

Folgende Antikörper kamen bei der Durchflusszytometrie zum Einsatz:

APC anti-human HLA-DR	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 559866
APC mouse IgG1, κ -Isotype	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555751
FITC anti-human CD16	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555406
FITC anti-human CD40	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555588
FITC anti-human CD80	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 557226
FITC anti-human CD86	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555657
FITC Mouse IgG1, κ -Isotype	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555748
Goat F(ab') ₂ Fragment anti-mouse IgM (mu)-FITC	Beckman Coulter, Fullerton, USA Best.-Nr- IM1620
PE anti-human CCR7	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555176
PE anti-human CD11c	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555392
PE anti-human CD16	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555407
PE anti-human CD83	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555855
PE anti-human CDw123 IL-3R α	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555644

PE anti-human FcεRI	eBioscience, San Diego, USA Best.-Nr. 12-5899-73
PE anti-human HLA-DR	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555812
PE anti-human Mannose Receptor	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555954
PE mouse IgG1, κ-Isotype	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555749
PE-Cy5 anti-human CD86	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555659
PE-Cy5 mouse IgG1 κ-Isotype	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland Best.-Nr. 555750

3.4.3 Toxizitätsmessung mittels Propidiumjodidfärbung

Propidiumjodid (PI) ist ein Fluoreszenzfarbstoff mit hoher Bindungsaffinität zu DNA. Mit seiner Hilfe lässt sich die Plasmamembranintegrität der DCs durchflusszytometrisch bestimmen. Da PI ein nicht membranpermeabler Fluoreszenzfarbstoff ist, gelingt eine Kernfärbung mit PI nur bei geschädigter Plasmamembran, wie sie bei nekrotischen Zellen zu finden ist.

Die Anzahl der PI-positiven Zellen wurde mittels Durchflusszytometrie gemessen. Dazu wurde im Anschluss an die Messung der Reifungsmarker 10µl PI auf 100µl Zellsuspension gegeben. Nach einer optischen Anregung bei 488nm emittiert Propidiumjodid Licht im roten Bereich. Dabei liegt das Emissionsmaximum bei 617nm. Für die Messungen mittels Durchflusszytometrie wurde der FL-3 Filter (650 nm) für die rote Fluoreszenz verwendet. Der prozentuale Anteil der DCs mit hoher Intensität der Rotfluoreszenz wurde bestimmt. Diese Zellen wurden als nekrotisch eingestuft.

3.5 Bestimmung von Zytokinen in Überständen von stimulierten DCs mittels ELISA

3.5.1 Theoretische Grundlagen

Der Enzymimmunoassay ist eine quantitative analytische Methode, bei der ein Reaktionspartner enzymatisch markiert ist. Dieser kann entweder das Antigen oder der

Antikörper sein. Die in dieser Arbeit verwendeten ELISAs beruhen auf der sogenannten "Sandwich-Technik". Im ersten Schritt wird ein Antikörper gegen das gesuchte Antigen in einer Mikrotiterplatte (Maxi Sorp) immobilisiert. Anschließend werden Proben und geeignete Standards zugegeben. Als nächstes erfolgt die Zugabe eines Zweitantikörpers, der unter Bildung des "Sandwiches" das Antigen bindet. Dieser Zweitantikörper ist biotinyliert und wird im nächsten Inkubationsschritt von einem Konjugat aus Streptavidin und Horseradish Peroxidase (Streptavidin-HRP) erkannt. Die Detektion erfolgt durch Zugabe eines chromogenen Substrats, welches von der HRP enzymatisch umgesetzt wird, wobei die Farbentwicklung in jedem well photometrisch (Messung der Absorption im Dynex MRX TC Revelation plate reader, iLF bioserve, Langenau, Deutschland) bestimmt wird.

3.5.2 IL-6 und IL-12 ELISA

IL-12 und IL-6 wurden jeweils aus derselben Probe parallel bestimmt. Für den Enzym-Immunoassay wurden die Antikörper *human matched pair capture and human matched pair detection antibody* (Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) verwendet.

Tag 1:

Zunächst erfolgte die Beschichtung (*coating*) der 96-well Flachbodenplatten (Maxisorp, Nunc) mit dem *Capture*-Antikörper. Hierfür wurden die *Capture* Antikörper 1:250 mit D-PBS ohne Ca/Mg verdünnt und 50µL verdünnter Antikörper pro well pipettiert. Nach einer Inkubation von 1h bei 37°C wurden die Platten 3x mit Waschpuffer gewaschen (D-PBS ohne Ca/Mg + 0,1% Tween-20) und anschließend mit D-PBS ohne Ca/Mg + 1% BSA geblockt (30min bis 2h, RT). Nach dem Blocken wurden die Platten 4x mit Waschpuffer gewaschen und die Proben bzw. Standards (in Duplikaten) aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4°C. Für die Bestimmung von IL-12 wurden die Proben unverdünnt aufgetragen, für die IL-6-Bestimmung 1:50 in HU-DC Medium verdünnt.

Tag 2:

Die Proben/Standards wurden aspiriert und die Platten 4x mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde der biotinylierte *Detection*-Antikörper mit HU-DC Medium 1:500 verdünnt, 50µL pro well zugegeben und 2-3h bei RT inkubiert. Nach diesem Schritt wurden die Platten 3x mit Waschpuffer gewaschen. Streptavidin-HRP (GE Healthcare, Little Chalfont Buckinghamshire, UK) wurde in einer Verdünnung von 1:5000 in D-PBS ohne Ca/Mg + 1% BSA zugegeben (50µL/well) und die Platte 2h bei RT inkubiert. Nach 6 Waschschritten erfolgte die Detektion. Hierfür wurde pro Platte 10mL 0,1M Citronensäure, pH 4,2 mit 200µL 50-fach ABTS und 10µL 30%iger H₂O₂-Lösung versetzt und 100µL pro well pipettiert. Die Quantifizierung der Farbreaktion erfolgte photometrisch im ELISA reader (MRX^{TC} Revelation, Dynex, Berlin, Deutschland).

3.5.3 IL-10 ELISA

Für die Untersuchung der IL-10 Produktionen von slanDCs kam das OptEIA™ Set Human IL-10 von Becton Dickinson (Heidelberg) zum Einsatz. Der Versuchsaufbau erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

3.5.4 IFN- α ELISA

Die Bestimmung der IFN α -Produktion erfolgte mit dem IFN-alpha Module Set von Bender MedSystems (Wien, Österreich). Vorgegangen wurde nach dem Protokoll des Herstellers.

3.6 Statistische Auswertung

Für die statistische Auswertung wurden die Programme Microsoft Excel (Microsoft, Seattle, USA) oder SPSS (SPSS inc., Chicago, USA) verwendet. Der ungepaarte t-Test kam zur Anwendung, wobei ein p-Wert von $p < 0,05$ als signifikant eingeschätzt wurde. Unterschiede zwischen verschiedenen Stichproben wurden als statistisch signifikant eingestuft, wenn sich ein p-Wert $< 0,05$ ergab (*); p-Werte $< 0,01$ wurden mit ** und p-Werte $< 0,001$ wurde mit *** gekennzeichnet.

4 Ergebnisse

Nachdem unserer Arbeitsgruppe der Nachweis gelungen war, dass wässrige Pollenextrakte (*Bet.*-APE) die Interleukin-12-Produktion von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (moDCs) hemmen, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von *Bet.*-APE auf die Zytokinsekretion (IL-6, IL-10, IL-12 und IFN- α) sowie die Reifung von Subpopulationen nativer dendritischer Zellen aus Blut (slanDC, MDC und PDC) untersucht werden. Im folgenden Kapitel werden die erzielten Ergebnisse aufgezeigt.

4.1 slanDCs

4.1.1 Phänotyp, Reinheit, Überleben

Je nach Spender wurden zwischen 2 und 8×10^6 slanDCs aus 300ml Vollblut isoliert. Bei diesen Vorläuferzellen handelt es sich um dendritische Zellen mit typischen zytoplasmatischen Ausläufern, die zur Vergrößerung der Zelloberfläche dienen und somit möglichst vielen Lymphozyten die Möglichkeit geben eine immunologische Synapse auszubilden (siehe Abb. 8) [175].

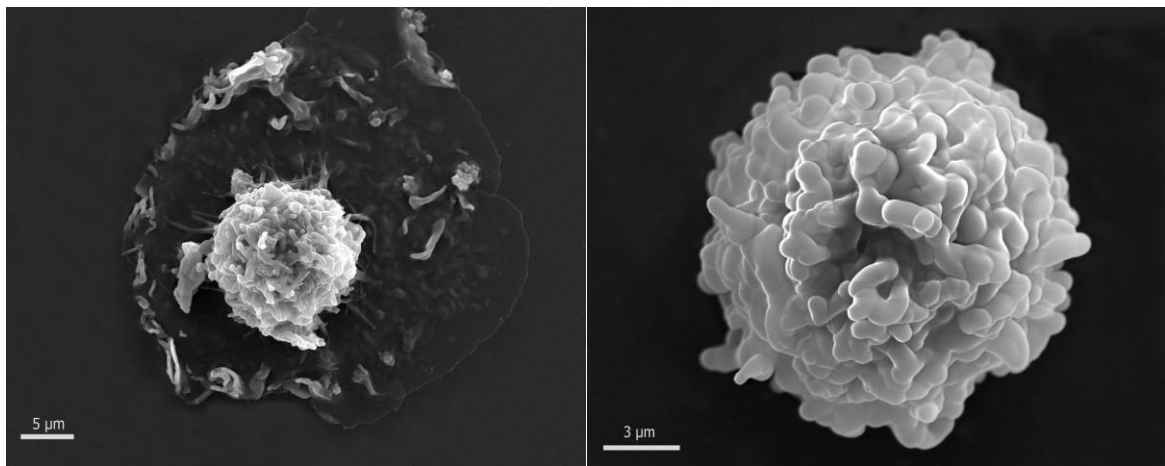


Abb. 8: slanDCs unter dem Rasterelektronenmikroskop. Links: 3000-fache Vergrößerung, rechts: 5000-fache Vergrößerung. Die REM Aufnahmen wurden unter Leitung von Dr. med. vet. Ingrid Weichenmeyer am ZAUM – Zentrum Allergie und Umwelt angefertigt.

SlanDCs sind phänotypisch charakterisiert durch die starke Expression des niedrig-affinen IgG-Rezeptors Fc γ RIII (CD16) sowie das Vorhandensein des Oberflächenmarkers M-DC8. Hierbei handelt es sich um eine spezielle Glycosylierungsvariante (6-sulfo LacNac) des P-Selectin Glycoprotein Liganden-1 (PSGL-1). Der zur Isolation der slanDCs benutzte Antikörper (Klon 1A4, bereitgestellt von PD Dr. Knut Schäkel, TU Dresden) ist ein IgM Antikörper und erkennt vermutlich den Kohlenhydratanteil des M-DC8 Moleküls. Im unreifen Stadium exprimierten slanDCs HLA-DR, CD40 sowie CD86.

Auch der Mannose-Rezeptor (CD206) sowie der hoch-affine IgE-Rezeptor (Fc ϵ RI) waren bei allen Spendern nachzuweisen. Abbildung 9 zeigt exemplarisch eine FACS-Analyse frisch isolierter slanDCs.

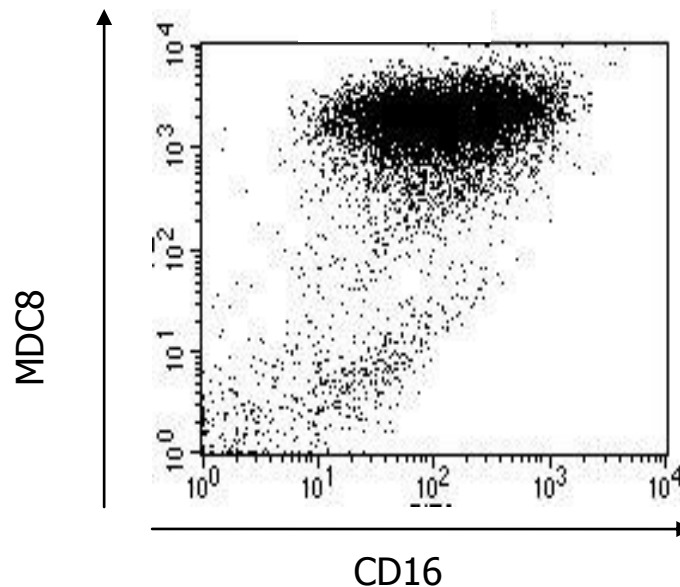


Abb. 9 : FACS-Analyse von frisch isolierten slanDCs. Die Zellen wurden mit dem anti-M-DC8 Antikörper (Knut Schäkel, Dresden) gefärbt und mittels MACS (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, Deutschland) isoliert. Direkt nach der Isolation wurden die Zellen mit anti-IgM-FITC und anti-CD16-PE Antikörpern (BD, Heidelberg, Deutschland) angefärbt. Die Reinheit bei dieser Isolation betrug 93%.

Die Reinheit der verschiedenen slanDC Isolationen betrug zwischen 80 und <95%. Die Verunreinigungen in den Isolierungen wurden durch T- und B-Lymphozyten (Färbung durch anti-CD3) verursacht. Nach 24Std. Inkubation überlebten 30-70% der Zellen.

4.1.2 Einfluss von *Bet.*-APE und Phytoprostan E₁ auf die LPS-induzierte Zytokinproduktion

Nach der Isolation wurden die Zellen mit *Bet.*-APE oder PPE₁ in verschiedenen Konzentrationen stimuliert.

LPS (100ng/ml) wurde erst nach 6Std. Inkubation auf die slanDCs gegeben. Eine Stimulation der Zellen gleich zum Zeitpunkt 0Std. wird von den Zellen nicht toleriert, die Zellen brauchen eine 6-stündige Vorreifungszeit. Nach 24Std. wurden die Überstände abgenommen und im ELISA auf ihren Gehalt an freigesetzten Zytokinen (IL-6, IL-10 und IL-12) untersucht.

IL-10 konnte in slanDC-Überständen nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Im IL-6 ELISA wurden folgende Ergebnisse festgestellt: Nicht-stimulierte slanDCs zeigten keine oder kaum IL-6 Sekretion. Die Stimulation der Zellen mit LPS führte zu einer

starken Freisetzung von IL-6. *Bet.*-APE, eingesetzt in Konzentrationen von 0,3-3mg/ml, hatte aber keinen Effekt auf die LPS induzierte IL-6 Sekretion (siehe Abb. 10A). Im Gegenteil dazu führte die Stimulation mit PPE₁ in den Konzentrationen 10⁻⁷M und 3x10⁻⁷M zu einer leichten Steigerung der IL-6 Sekretion. Bei weiter steigenden Konzentrationen kam es dagegen zu einem dosisabhängigen Rückgang der LPS-induzierten IL-6 Sekretion (siehe Abb. 10C)

Im IL-12 Immunoassay konnte eine dosisabhängige Hemmung der LPS-induzierten Freisetzung von IL-12 sowohl bei Stimulation der slanDCs mit *Bet.*-APE als auch mit PPE₁ nachgewiesen werden. Zwar führte die Stimulation mit PPE₁ 10⁻⁷M zu einem leichten Anstieg der IL-12 Sekretion, bei höheren Konzentrationen an PPE₁ kam es aber zu einem dosisabhängigen Abfall der IL-12 Sekretion. Die Säulendiagramme in 10B und 10D veranschaulichen die gefundenen Ergebnisse. Dabei wurde die LPS-induzierte Zytokinsekretion jeweils 100% gleich gesetzt.

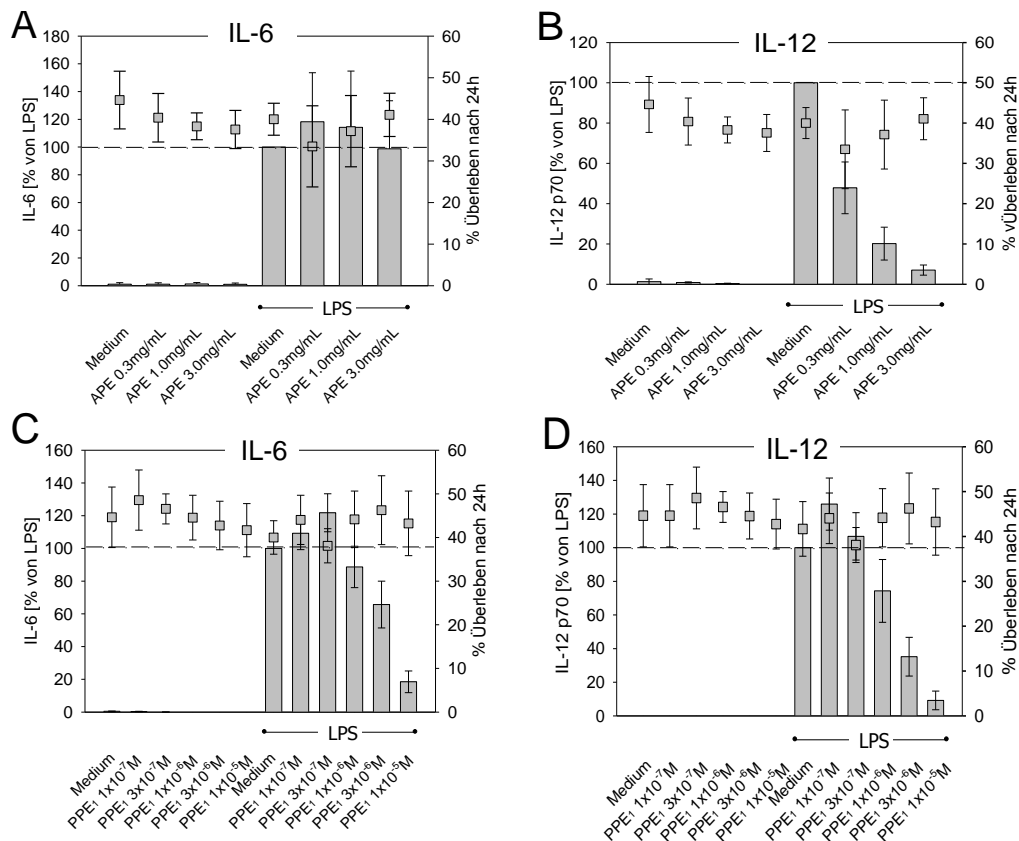


Abb. 10: Einfluss von *Bet.*-APE und PPE₁ auf die LPS-induzierte Sekretion von IL-6 und IL-12. Die Zellen wurden direkt nach der Isolation mit Mediumkontrolle, *Bet.*-APE oder PPE₁ in den angezeigten Konzentrationen stimuliert. Nach 6Std. wurde LPS (100ng/mL) in die geeigneten wells gegeben. Nach 24Std. wurden im Überstand die Zytokine IL-6 und IL-12p70 bestimmt (Balkendiagramme). Die Überlebensrate der Zellen wurde mittels Propidium-Iodid-Färbung bestimmt (box plots). Die durch LPS-induzierte Zytokinproduktion ist als 100% angegeben (IL-12: 2500 ± 1000pg/mL; IL-6: 15,000 ± 2000pg/mL). Gezeigt sind die MW und SEM von 6 unabhängigen Experimenten.

4.1.3 Einfluss von *Bet.*-APE, Phytoprostan E₁ und F₁ auf die LPS-induzierte Induktion von Reifungsmarkern

Frisch isolierte slanDCs zeigten eine geringfügige Expression der Moleküle CD80, CD83, CD40 und des Chemokinrezeptors CCR-7. Nach 24Std. Inkubation im Medium ohne Stimulus konnte eine erhöhte Expression der Reifungsmarker CD80, CD83 und CCR-7, nicht aber von CD40 gefunden werden. Die Stimulation der Zellen mit *Bet.*-APE oder PPE₁ und PPF₁ führte zu keiner Veränderung der Expression von CD40, CD80, CD83 und CCR-7. Die Stimulation mit LPS dagegen führte zu einer starken Induktion aller Reifungsmarker. *Bet.*-APE hemmte die LPS-induzierte Reifung der Oberflächenrezeptoren CD40, CD80, CD83 und CCR-7 signifikant (vgl. Abb. 11).

PPE₁ führte zu keiner signifikanten Hemmung der LPS-induzierten Induktion der untersuchten Reifungsmarker (siehe Abb. 11 und 12)

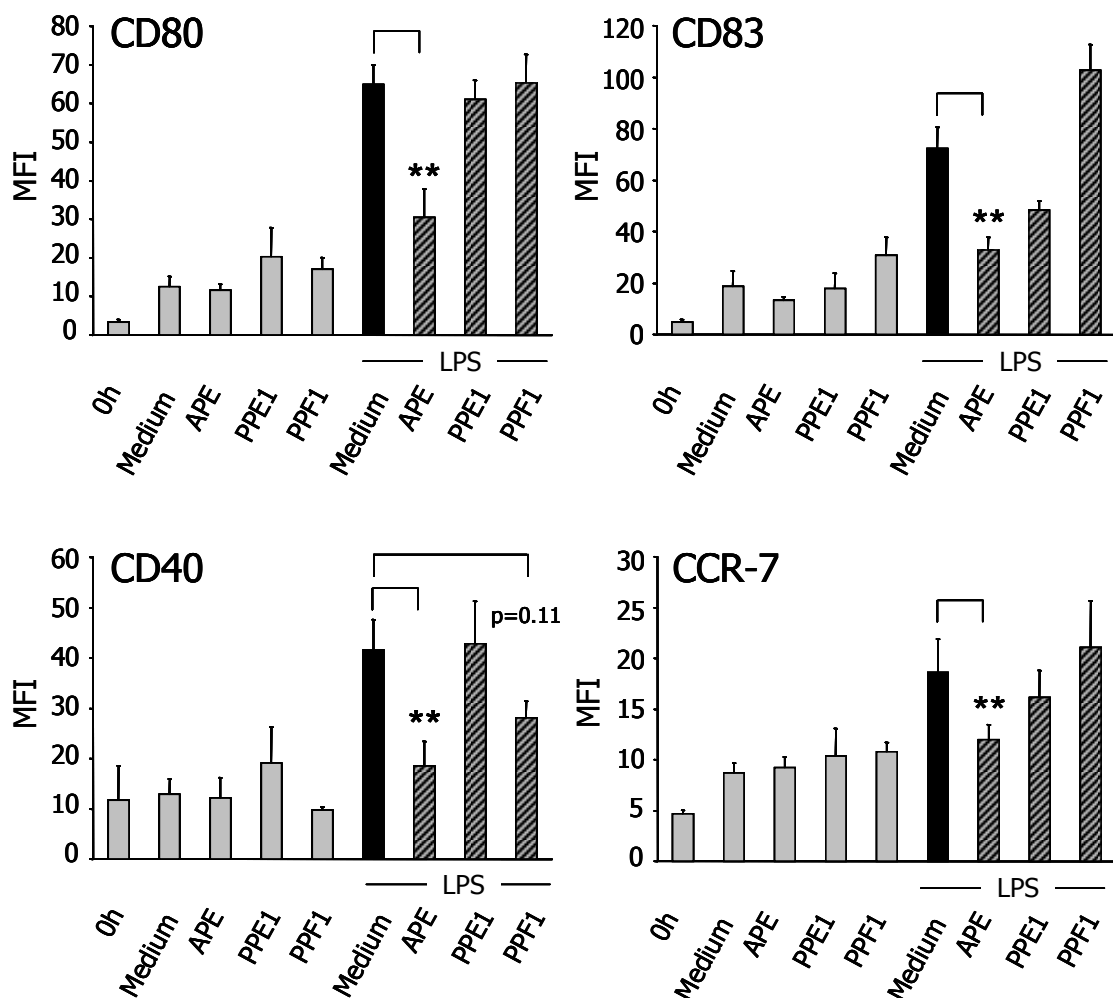


Abb. 11: Einfluss von *Bet.*-APE, PPE₁, PPF₁ und LPS auf die Reifungsmarker CD80, CD83, CD40 und CCR-7 bei den slanDCs. Die Zellen wurden nach der Isolation und nach einer 6 stündigen Reifungszeit mit LPS und/oder *Bet.*-APE oder PPE₁ oder PPF₁ stimuliert und während insgesamt 24Std. inkubiert. Nach 24Std. wurden die Zellen im FACS-Gerät auf ihre Reifung hin untersucht. LPS führt zu einer verstärkten Expression dieser Reifungsmarker. Gemessen wurde die mean fluorescent intensity (MFI) (**= $p < 0,01$), gepaarter t-Test. Gezeigt sind die MW \pm SEM von zwölf unabhängigen Experimenten.

Frisch isolierte slanDCs zeigen eine hohe Expression von CD86 und HLA-DR. Beide Moleküle zeigten eine Induktion nach 24Std. Inkubation ohne Stimulus (Spontanreifung). Obwohl nicht signifikant, zeigte sich eine Abnahme der Spontanreifung von CD86 und HLA-DR durch *Bet.*-APE oder PPE₁. Im Gegensatz dazu hatte PPF₁ keinen Einfluss auf die Spontanreifung der slanDCs (siehe Abbildung 12).

Die Stimulation mit LPS führte zu einer starken Induktion der Reifungsmarker CD86 und HLA-DR. *Bet.*-APE und PPE₁ hemmen die LPS-induzierte Reifung von CD86 und HLA-DR leicht, eine Signifikanz konnte allerdings nicht festgestellt werden. Auch hier zeigte PPF₁ keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Reifung von CD86 und HLA-DR (vgl. Abb. 12).

Weiterhin exprimieren frisch isolierte slanDCs den Mannose-Rezeptor (CD206) und FcεRI. Nach 24Std. Spontanreifung findet sich eine erhöhte Expression dieser Marker, welche weder durch *Bet.*-APE, noch durch PPE₁ beeinflusst wird. Auch bei LPS-gereiften Zellen haben weder *Bet.*-APE noch PPE₁, noch PPF₁ einen Effekt auf die Expression der Marker CD86, CD206, HLA-DR und FcεRI (vgl. Abb. 12).

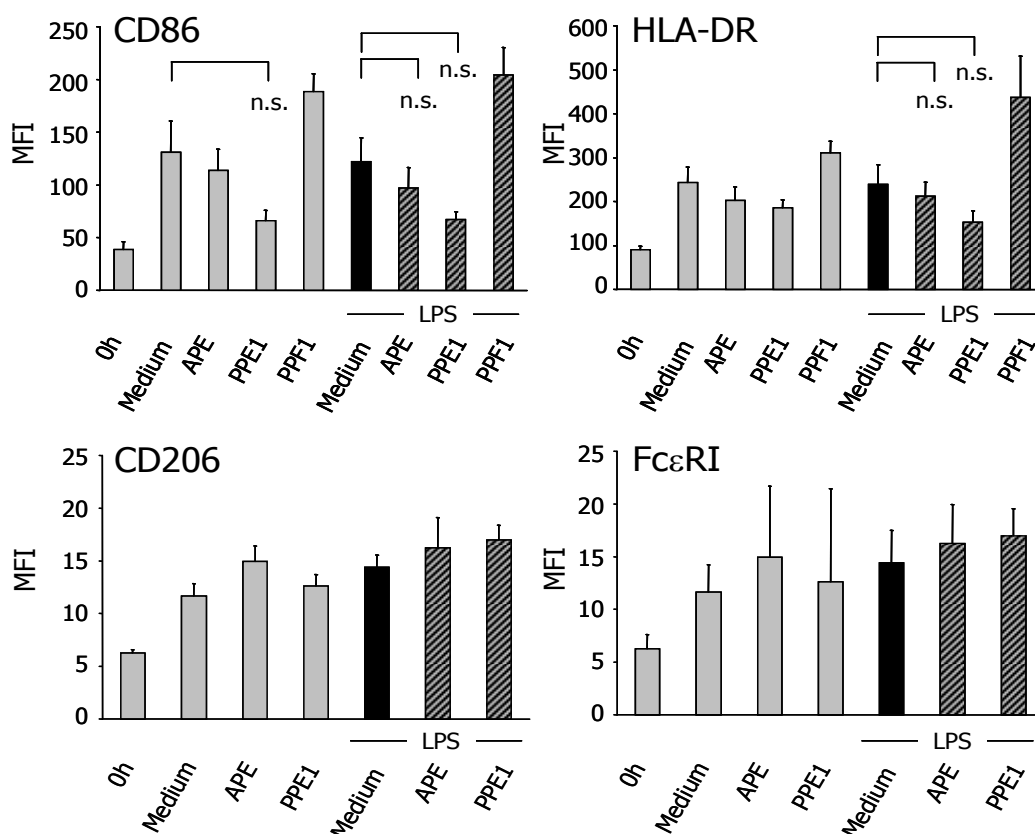


Abb. 12: Einfluss von *Bet.*-APE, PPE₁, PPF₁ und LPS auf die Reifungsmarker CD83, HLA-DR, CD206 und FcεRI bei den slanDCs. SlanDCs wurden entweder direkt nach der Isolation („0Std.“) oder nach 24Std. auf die Expression der Marker CD83, HLA-DR, CD206 und FcεRI hin untersucht. MFI: Mittlere Fluoreszenz-Intensität; Gezeigt sind Mittelwerte + SEM von 15 unabhängigen Experimenten; gepaarter t-Test. Gezeigt sind die MW ± SEM von zwölf unabhängigen Experimenten.

4.1.4 Dosis-abhängige Hemmung der LPS induzierten Reifung durch *Bet.*-APE

Als nächstes wurde untersucht, ob die Hemmung der LPS-induzierten Hochregulation der Marker CD80, CD83, CD40 und CCR-7 durch *Bet.*-APE ein dosisabhängiger Effekt ist. Hierfür wurden die Zellen entweder mit LPS alleine oder in Kombination mit unterschiedlichen Konzentrationen an *Bet.*-APE inkubiert. Nach 24Std. wurde die Expression der Reifungsmarker untersucht. *Bet.*-APE hemmte dabei die LPS-induzierte Induktion der Marker CD80, CD40, CD83 und CCR-7 dosis-abhängig (siehe Abbildung 13).

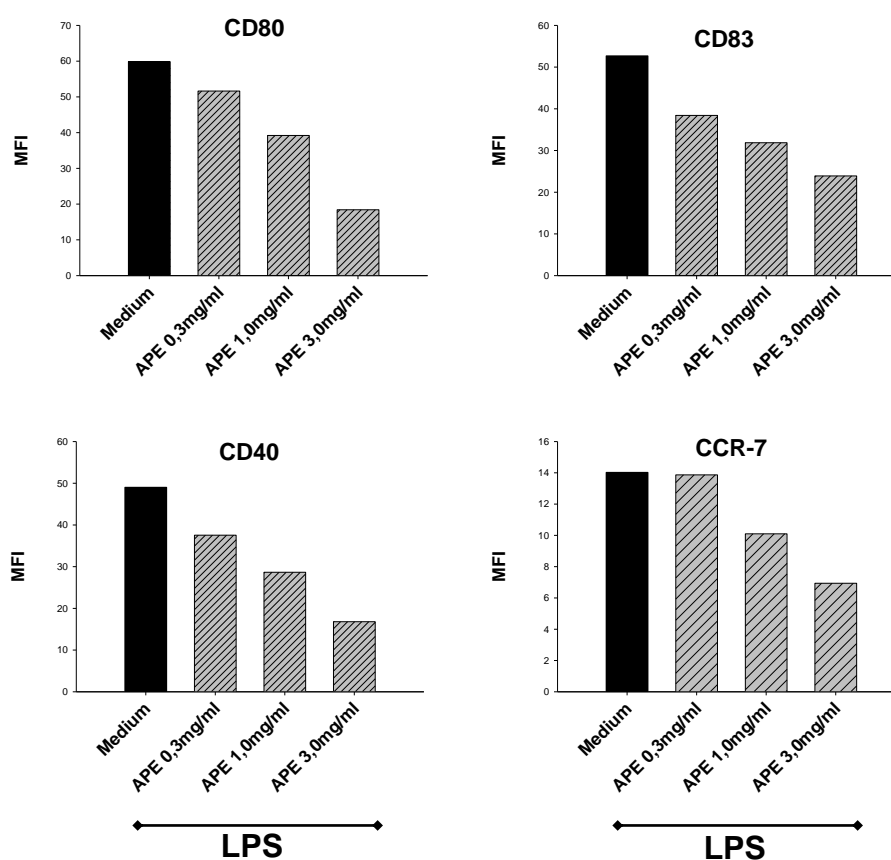


Abb. 13: Dosis-abhängige Hemmung der LPS induzierten Reifung durch *Bet.*-APE. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt 6Std. nach der Isolation mit LPS bzw. mit LPS + *Bet.*-APE stimuliert. Nach 24Std. wurde die Expression der Reifungsmarker CD80, CD83, CD40 und CCR-7 durchflusszytometrisch bestimmt. (MFI) = mittlere Fluoreszenz-Intensität. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment.

4.1.5 Proteinase K Verdau von *Bet.*-APE

Um zu untersuchen, ob die *Bet.*-APE bedingte Hemmung der TLR-4-induzierten Reifung durch LPS eher durch Proteine oder andere in den wässrigen Pollenextrakten vorhandenen Substanzen verursacht wurde, wurde *Bet.*-APE mit Proteinase K versetzt.

Die Proteinase K, die zur Familie der Subtilisin-ähnlichen Serinproteasen gehört, führt zu einem Abbau der vorhandenen Proteine [176].

Nach 24Std. Stunden Inkubation mit Proteinase K-verdautem *Bet.*-APE wurden die Reifungsmarker der slanDCs durchflusszytometrisch untersucht und mit den Ergebnissen des unverdauten *Bet.*-APE verglichen.

Dabei wurde festgestellt, dass Proteinase K-verdautes *Bet.*-APE den gleichen hemmenden Effekt auf die LPS-induzierte Hochregulation der Reifungsmarker CD80, CD83, CD40 und CCR-7 der slanDCs hatte als unverdautes *Bet.*-APE (vgl. Abb. 14). Verdautes *Bet.*-APE führte wie unverdautes *Bet.*-APE, bei den Reifungsmarkern CD86, CD206, FcεRI und HLA-DR zu keiner Verringerung der TLR-4 induzierten Hochregulation der Reifungsmarker (Daten nicht gezeigt).

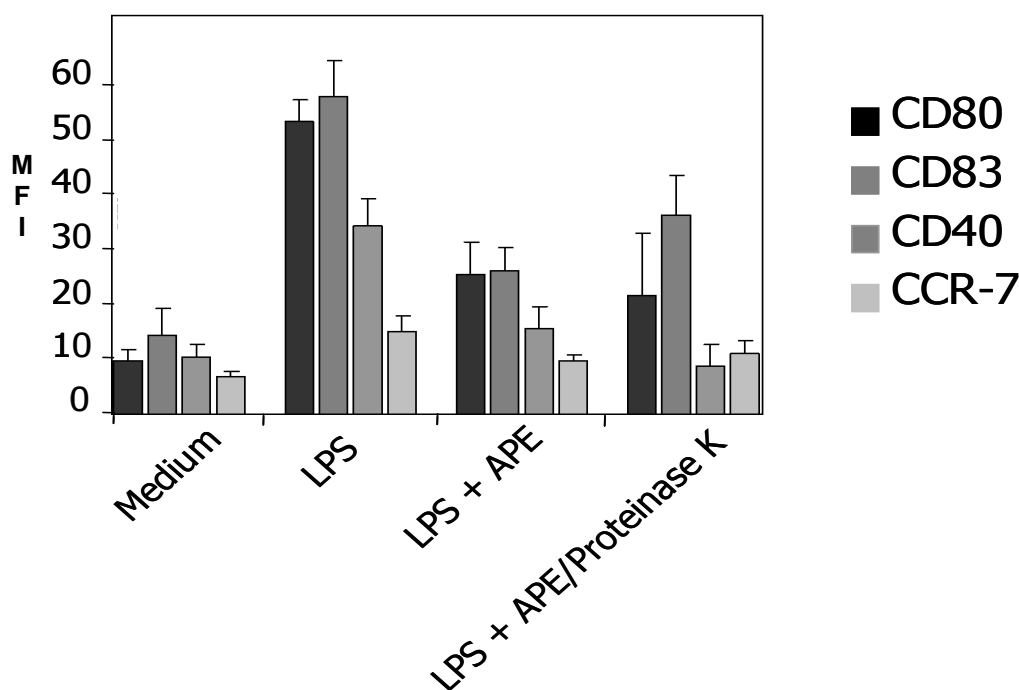


Abb. 14: Einfluss von Proteinase K Verdau auf die *Bet.*-APE-vermittelte Hemmung der slanDC-Reifung. Die Zellen wurden 6Std. nach der Isolation mit LPS, LPS + *Bet.*-APE oder LPS + Proteinase K-verdautem *Bet.*-APE stimuliert. Nach 24Std. wurde die Expression der Reifungsmarker durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt ist die Mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI). Gezeigt sind die Mittelwerte aus 6 repräsentativen Experimenten.

4.1.6 Fraktionierung von *Bet.*-APE mit 3kDa cut-off Filtern

Um herauszufinden, ob es sich bei den hemmenden Substanzen auf die LPS-induzierte Hochregulation der Reifungsmarker um ein Molekül mit einem Gewicht >3kD oder <3kD handelt, wurde das *Bet.*-APE über einen cut-off mit einer Membran von 3kD zentrifugiert. Durch die Filtration erhielt man zwei unterschiedliche Fraktionen: Beim Filtrat handelt es

sich um die Substanzen <3kD, welche den Filter passieren konnten. Im nicht filtrierten Konzentrat befanden sich die Moleküle >3kD.

Anschließend wurde der gleiche Versuch mit den beiden Fraktionen von *Bet.*-APE durchgeführt. Dabei konnten die oben erwähnten Versuche mit dem durch Proteinase K-verdautem *Bet.*-APE bestätigt werden. Auch in diesen Versuchen zeigte sich, dass die *Bet.*-APE Fraktion <3kD die LPS-induzierte Reifung bei den slanDCs stärker hemmt als die *Bet.*-APE Fraktion >3kD (siehe Abb. 15).

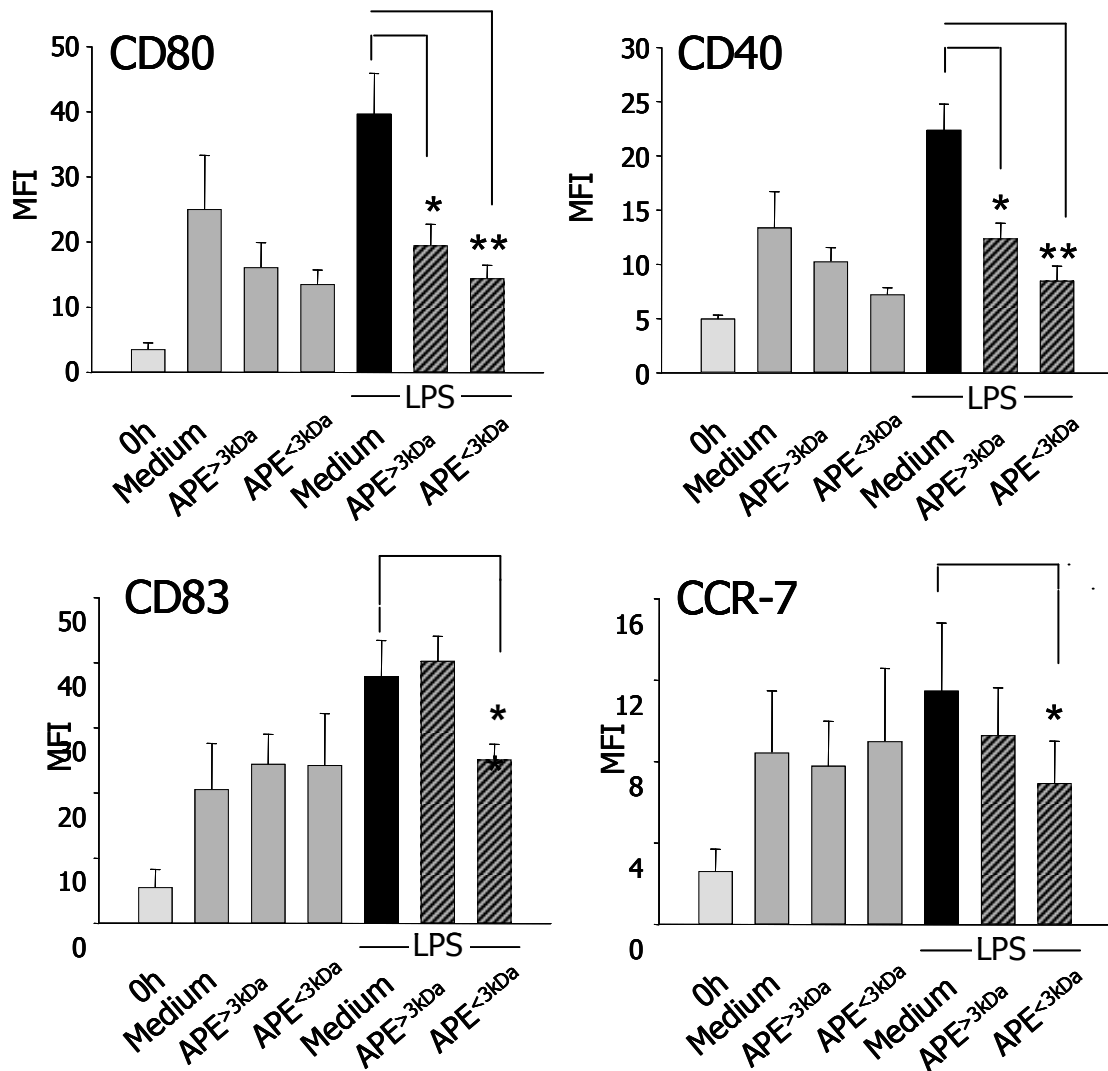


Abb. 15: Einfluss verschiedener Fraktionen von *Bet.*-APE auf die LPS-induzierte Expression der Reifungsmarker CD80, CD83, CD40 und CCR-7. *Bet.*-APE wurde über eine Cut-off Membran von 3kD in zwei Fraktionen zentrifugiert. 6Std. nach der Isolation wurden die Zellen mit LPS und *Bet.*-APE in den unterschiedlichen Fraktionen (Konzentrat >3kD, Filtrat <3kD) stimuliert. Nach insgesamt 24Std. wurden die Zellen durchflusszytometrisch auf ihre Reifung hin untersucht. MFI: Mittlere Fluoreszenz-Intensität. Gezeigt sind die MW \pm SEM von 5 unabhängigen Experimenten. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$; gepaarter t-Test

4.2 Myeloide dendritische Zellen (MDC)

Myeloide dendritischen Zellen wurden mit dem *BDCA-1(CD1c)+ Dendritic Cell Isolation Kit* von Myltenyi isoliert und für 24Std. in DC-Medium inkubiert. Stimuliert wurde mit LPS, entweder alleine oder in Kombination mit *Bet.*-APE oder PPE₁.

4.2.1 Phänotyp, Reinheit, Überleben

Je nach Spender wurden zwischen 2 und 4 Mio MDCs aus 300ml venösem Blut isoliert. Die Reinheit der Isolationen betrug im Durchschnitt 85,41% ($\pm 10,01\%$), die Verunreinigungen bestanden hauptsächlich aus B- und T-Lymphozyten, was die Färbung der Zellen mit anti-CD11c und Gegenfärbung mit anti-CD19 Antikörpern zeigte (Daten nicht gezeigt). Nach 24Std. Inkubation überlebten rund 75% der Zellen.

4.2.2 Einfluss von *Bet.*-APE und Phytoprostan E₁ auf die TLR-Liganden-induzierte Zytokinproduktion

Die MDCs wurden für 24Std. im Medium (Kontrolle), mit LPS und R-848 (Resiquimod) oder in Kombination mit verschiedenen Konzentrationen an *Bet.*-APE oder PPE₁ inkubiert. Die kombinierte Stimulation mit einem TLR-4- und einem TLR-8-Liganden ist notwendig, um eine Sekretion von IL-12p70 zu induzieren. Nach 24Std. wurden im Zellkulturüberstand mittels ELISA die Zytokine IL-6 und IL-12p70 bestimmt. Ausserdem wurde die Überlebensrate unter der jeweiligen Stimulation durchflusszytometrisch bestimmt (PI-Färbung).

Nach 24Std. Inkubation im Medium ohne Stimulus war keine IL-12p70 Sekretion und nur eine sehr geringe IL-6 Sekretion im ELISA nachweisbar. Nach Stimulation mit LPS und R-848 produzierten die MDCs große Mengen an IL-6 (48ng/ml) und IL-12p70 (55ng/ml) (siehe Abbildung 16A-D).

Bet.-APE führte in unseren Versuchen zu keiner Änderung der LPS/R-848-induzierten IL-6 Produktion (siehe Abb. 16A).

Bet.-APE führte ab einer Konzentration von 1mg/ml zu einer signifikanten Hemmung der LPS-/R-848-induzierten IL-12p70 Produktion. Diese Hemmung war dosisabhängig. Dieser Effekt ist nicht auf ein vermehrtes Absterben der Zellen durch *Bet.*-APE zurückzuführen (siehe Darstellung der Zellvitalität in Abb 16B).

PPE₁ führte aber weder bei IL-6, noch bei IL-12 zu einer Modulation der jeweiligen Zytokinproduktion (siehe Abb. 16C+D).

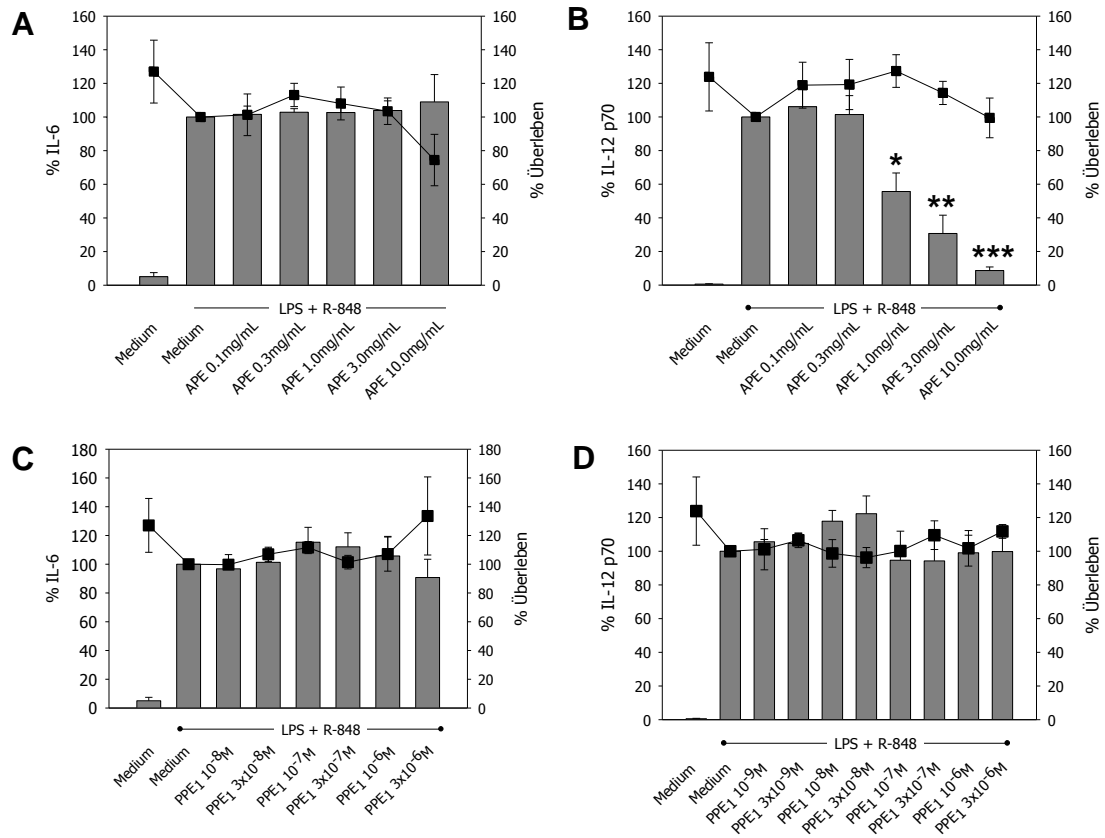


Abb. 16: Einfluss von *Bet.*-APE und PPE₁ auf die R-848 und LPS induzierte IL-6 und IL-12 Sekretion. Die Zellen wurden für 24Std. mit Medium (Kontrolle), mit LPS + Resiquimod oder mit LPS + Resiquimod und *Bet.*-APE/PPE₁ in verschiedenen Konzentrationen stimuliert. IL-6 und IL-12 wurden im Überstand mittels ELISA bestimmt (Balken). Die durch LPS + R-848-induzierte Zytokinproduktion ist als 100% angegeben (IL-12: 48.000 ± 5.000pg/mL; IL-6: 55.000 ± 8.000pg/mL). Die Überlebensraten wurden durchflusszytomtrisch mittels PI-Färbung ermittelt (Dot Plots). **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001, gepaarter t-Test. Gezeigt sind die Mittelwerte ± SEM von 6 unabhängigen Experimenten.

4.2.3 Einfluss von *Bet.*-APE und Phytosteran E₁ auf die TLR-Liganden-induzierte Hochregulation von Reifungsmarkern

Die MDCs zeigen nach 24Std. im Medium eine Spontanreifung: die Reifungsmarker CD83, CD86, CCR-7 und HLA-DR nahmen gegenüber dem 0Std. Wert stark zu. Bei den Reifungsmarkern CD80 und CD40 blieb diese Spontanreifung weitgehend aus (vgl. Abb 17A-F).

Wurden die MDCs mit LPS stimuliert, so kam es bei sämtlichen Reifungsmarkern zu einer Hochregulation. Diese Hochregulation der Reifungsmarker wurde durch *Bet.*-APE, mit Ausnahme von HLA-DR und CCR-7, signifikant gehemmt.

Bet.-APE hemmt sowohl die LPS-induzierte, die R-848-induzierte als auch die LPS + R-848-induzierte Hochregulation der Marker CD80, CD83 und CD40 (vgl. Abb. 17A-C).

Die Stimulation mit R-848 führt zu einer Hochregulation sämtlicher untersuchter Reifungsmarker (siehe Abb. 17A-F). Eine Kostimulation von R-848 und *Bet.*-APE führte zu einer signifikanten Hemmung der R-848-induzierten Hochregulation der Marker CD80,

CD83, CD40, CD86 und HLA-DR (vgl. Abb. 17A-C und E-F). CCR-7 wird nicht signifikant gehemmt (siehe Abb. 17D).

Die simultane Stimulation mit R-848 und LPS führt ebenfalls zu einer Hochregulation aller untersuchter Reifungsmarker, wobei sich CD83 und CD86 weniger erhöhen als bei alleiniger Stimulierung mit LPS oder R-848 (vgl. Abb. 17A-F). *Bet.*-APE hemmt die Hochregulierung der Marker CD80, CD83 und CD40 signifikant (siehe Abb. 17A-C). Die Rezeptoren CD86 und HLA-DR wurden ebenfalls gehemmt, eine Signifikanz konnte aber nicht festgestellt werden (siehe Abb. 17E-F).

PPE₁ führte zu einer signifikanten Abnahme der LPS-induzierten Hochregulation der Reifungsmarker CD40 und HLA-DR (siehe Abb. 17C und F). Bei CCR-7 führte PPE₁ zu einer signifikanten Steigerung der LPS-induzierten Hochregulation (vgl. Abb. 17D). Einen Einfluss auf die Marker CD80, CD83 und CD86 wurde nicht beobachtet (siehe Abb. 17A, B und E).

PPE₁ führte zu einer signifikanten Hemmung der R-848-induzierten Hochregulation der Marker CD40, CD86 und HLA-DR (vgl. Abb. 17C, E-F). Die R-848-induzierte Hochregulation der Marker CD80, CD83 und CCR-7 wurde durch PPE₁ nicht gehemmt.

PPE₁ hemmt die LPS + R-848-induzierte Hochregulation der Marker CD83 und CD40 signifikant (vgl. Abb. 17B-C). Die LPS + R-848-induzierte Hochregulation von CD86 und HLA-DR wurde nicht signifikant gehemmt. Einen Effekt von PPE₁ auf die LPS + R-848-induzierte Hochregulation von CD80 wurde nicht beobachtet (siehe Abb. 17A). PPE₁ führte bei CCR-7 zu einer nicht signifikanten Induktion der LPS + R-848-induzierten Hochregulation (vgl. Abb. 17D).

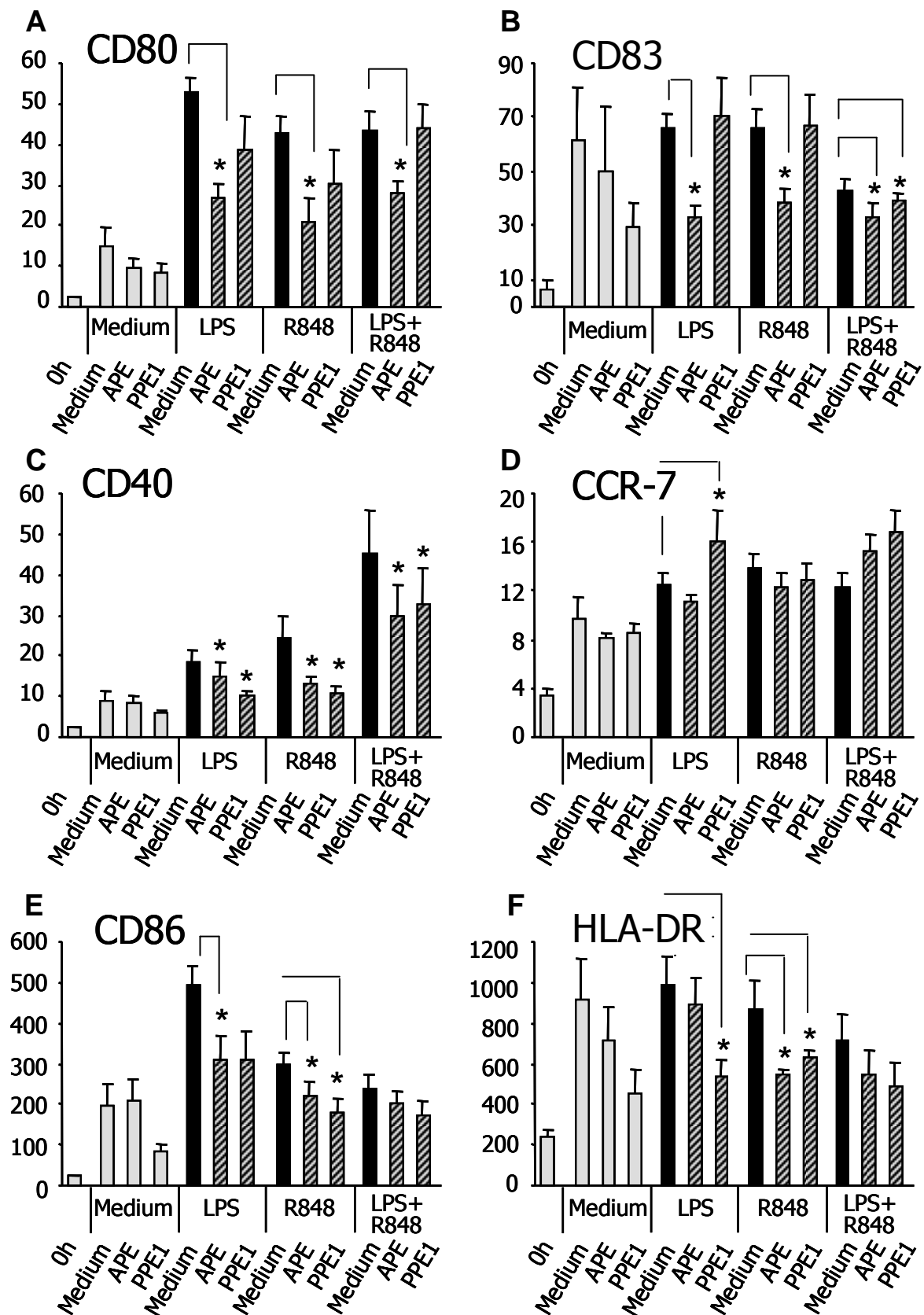


Abb. 17: Einfluss von *Bet*-APE und PPE₁ auf die LPS, R-848 und LPS + R-848-induzierte Expression von CD80, CD83, CD40, CD86, CCR-7, HLA-DR. Die Zellen wurden zum Zeitpunkt 0Std. mit LPS und/oder R-848 und *Bet*-APE oder PPE₁ stimuliert. Nach 24Std. wurde die Expression der Reifungsmarker durchflusszytometrisch untersucht. Gezeigt wird die MFI (mittlere Fluoreszenzintensität (MW ± SEM) von 12 unabhängigen Versuchen. gepaarter t-Test; *p<0,05

4.3 Plasmazytoide dendritische Zellen (PDC)

4.3.1 Phänotyp, Reinheit, Überleben

Die PDCs wurden aus PBMC mit dem *Diamond*[®] *PDC Isolation Kit* von Miltenyi isoliert. Je nach Spender konnten zwischen 1-2,5Mio PDCs aus 300ml Blut isoliert werden. In der Literatur wird ihre Häufigkeit mit etwa 0,3% angegeben. PDCs sind mittelgroße Zellen mit reichhaltigem endoplasmatischen Retikulum. Sie zeigen dendritenzell typische zytoplasmatische Ausläufer. Abbildung 18 zeigt durchflusszytometrisches Bild der PDCs mit Färbung der Zellen mit CD3-FITC und CD123-PE.

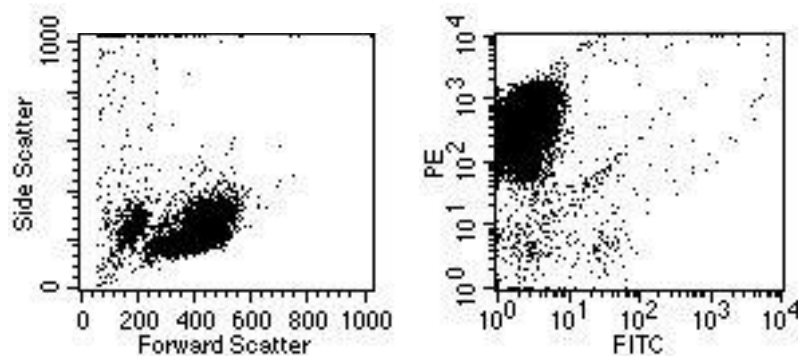


Abb. 18: FACS-Analyse von frisch isolierten PDCs. Die Zellen wurden mit dem *Diamond*[®] *Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit* (Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach) mittels MACS isoliert. Direkt nach der Isolation wurden die Zellen mit anti-CD3 FITC und anti-CD123 PE Antikörpern (Becton Dickinson, Heidelberg) angefärbt. Die Reinheit bei dieser Isolation betrug 97%.

Gleich nach der Isolation wurden die Zellen mit Antikörpern gegen die Oberflächmarker CD123 und gegen die Reifungsmarker CD40, CD80, CD83, CD86, CD206 und HLA-DR gefärbt und durchflusszytometrisch gemessen. CD40, CD80, CD86 und CCR-7 waren im nativen Stadium nur schwach nachweisbar. Die Reifungsmarker CD83 und HLA-DR zeigten zum Zeitpunkt 0Std. bereits eine verstärkte Expression.

Die Reinheit betrug im Durchschnitt 94,98% \pm 4,73%. Verunreinigungen waren auch hier durch B- und T-Lymphozyten (CD3+ Zellen) bedingt.

Nach 24Std. Inkubation überlebten rund 95% der PDCs, sofern das Medium mit IL-3 (100ng/ml) versetzt wurde. Ohne IL-3 Zugabe waren die Zellen nach 24 größtenteils apoptotisch.

4.3.2 Einfluss von *Bet.*-APE und Phytoprostan E₁ auf die CpG-induzierte IFN- α Produktion

Direkt nach der Isolation wurden die PDCs mit Medium (Kontrolle), CpG-A oder CpG-A in Kombination mit *Bet.*-APE oder PPE₁ inkubiert. Nach 24Std. wurden die Überstände abgenommen und IFN- α mittels ELISA bestimmt. Die Zellen wurden mit Propidium-Jodid gefärbt und die Überlebensrate unter jeder Stimulationsbedingung durchflusszytometrisch bestimmt.

Bet.-APE hemmte die CpG-A induzierte IFN- α Sekretion dosisabhängig ab einer Konzentration von 0,1mg/ml (siehe Abb. 19).

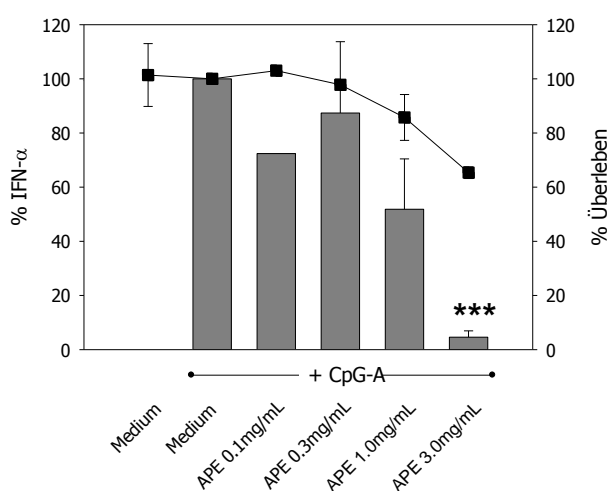


Abb. 19: Einfluss von *Bet.*-APE auf die IFN- α -Sekretion und auf das Überleben von PDCs (n=5). Nach Isolation der Zellen wurden die Zellen mit CpG-A (1 μ M) oder mit CpG-A und mit unterschiedlichen Konzentrationen *Bet.*-APE stimuliert. Nach 24Std. wurde in den Überständen die CpG-A-induzierte IFN- α -Sekretion im ELISA untersucht (Balkendiagramme). Die Zellen wurden mit Propidiumjodid gefärbt und die Überlebensrate im FACS bestimmt (dot Plots). Die CpG-A-induzierte IFN- α Sekretion wurde als 100% angegeben (IFN- α : 25000 \pm 5000pg/mL). ***=p<0.001, gepaarter t-Test; Gezeigt sind die Mittelwerte \pm SEM von 5 unabhängigen Versuchen.

Bei Stimulation der PDCs mit CpG-A und PPE₁ wurden unterschiedliche Ergebnisse beobachtet (vgl. Abb. 20A und B). Bei vier Spendern bewirkte PPE₁ in Konzentration von 10⁻⁸M bis zu 10⁻⁶M keine signifikante Änderung der IFN- α Produktion. 10⁻⁸M PPE₁ führte zwar zu einer leichten Steigerung der Sekretion von IFN- α ; signifikant war diese Steigerung aber nicht (p=0,11). Das Überleben der Zellen war bei den verwendeten Konzentrationen von PPE₁ nahezu 100% (siehe Abb. 20A).

Bei zwei Spendern konnte dagegen eine dosisabhängige Hemmung der CpG-A-induzierten IFN- α Produktion festgestellt werden. Hier führte PPE₁ ab einer Konzentration von 10⁻⁷M zu einer Abnahme der IFN- α -Produktion (siehe Abb. 20B). Bei einem dieser Spender scheint dieser Effekt nicht auf einer verminderten Zellvitalität

zurückzuführen sein. Bei den anderen Spendern war die Überlebensrate ab PPE_1 10^{-6}M drastisch gesunken (siehe Abb. 20B).

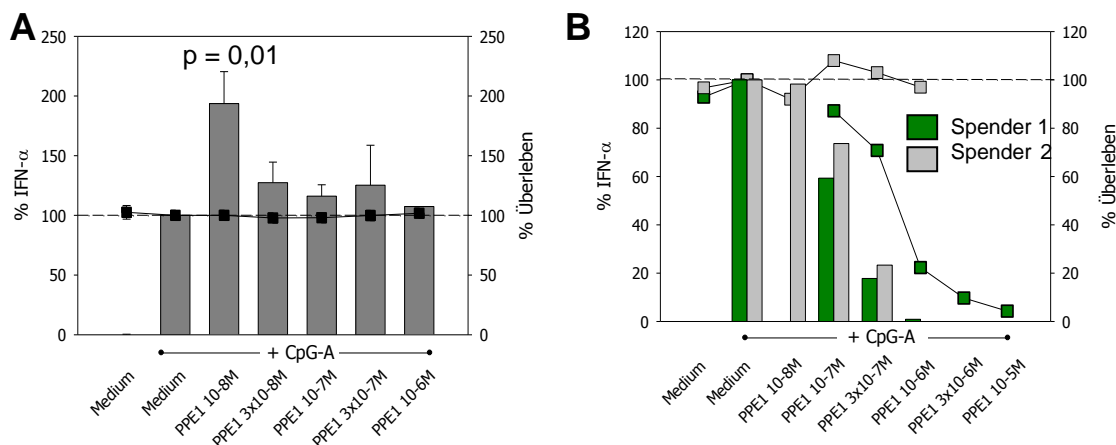


Abb. 20: Einfluss von PPE_1 auf die CpG-A induzierte IFN- α Freisetzung von PDCs. Nach Isolation wurden die Zellen mit CpG-A oder CpG-A und verschiedenen Konzentrationen PPE_1 stimuliert. Nach 24Std. wurde in den Überständen die durch CpG-A-induzierte IFN- α -Sekretion im ELISA untersucht (Balkendiagramme). Die Zellen wurden mittels Propidiumjodidfärbung im FACS Gerät auf ihr Überleben hin untersucht (dot plots). Die CpG-A-induzierte IFN- α -Sekretion wurde als 100% gesetzt (IFN- α : $25000 \pm 5000\text{pg/mL}$). Gepaarter t-Test. Gezeigt werden in A die MW \pm SEM von vier unabhängigen Experimenten.

4.3.3 Einfluss von *Bet.*-APE und Phytoprostanen auf die CpG-B-induzierte Hochregulation von Reifungsmarkern

Die PDCs wurden direkt nach der Isolation mit Medium (Kontrolle), CpG-B oder CpG-B und *Bet.*-APE oder CpG-B und PPE_1 stimuliert. Nach 24Std. wurden die Zellen geerntet und auf die Expression von den Reifungsmarkern CD40, CD80, CD83, CD86, CCR-7 und HLA-DR untersucht. Auch PDCs zeigen nach 24Std. Stunden Inkubation im Medium eine gewisse Spontanreifung, die im Gegensatz zu den slanDCs eher als gering einzuschätzen ist (siehe Abb. 21A-E). Allein bei HLA-DR zeigte sich eine ausgeprägte Zunahme der Expression (siehe Abb. 21F).

CpG-B Stimulation führt zur deutlichen Induktion aller Reifungsmarker mit Ausnahme von HLA-DR (vgl. Abb. 21A-F)

Bet.-APE hemmt die CpG-B-induzierte Induktion von CD80, CD83, CD40 und CCR-7 signifikant (vgl. Abb. 21A-D). Bei Stimulation der PDCs mit PPE_1 , zeigte sich eine signifikante Hemmung der CpG-B-induzierten Reifung von CD80 und CD83 (siehe Abb. 21A und B).

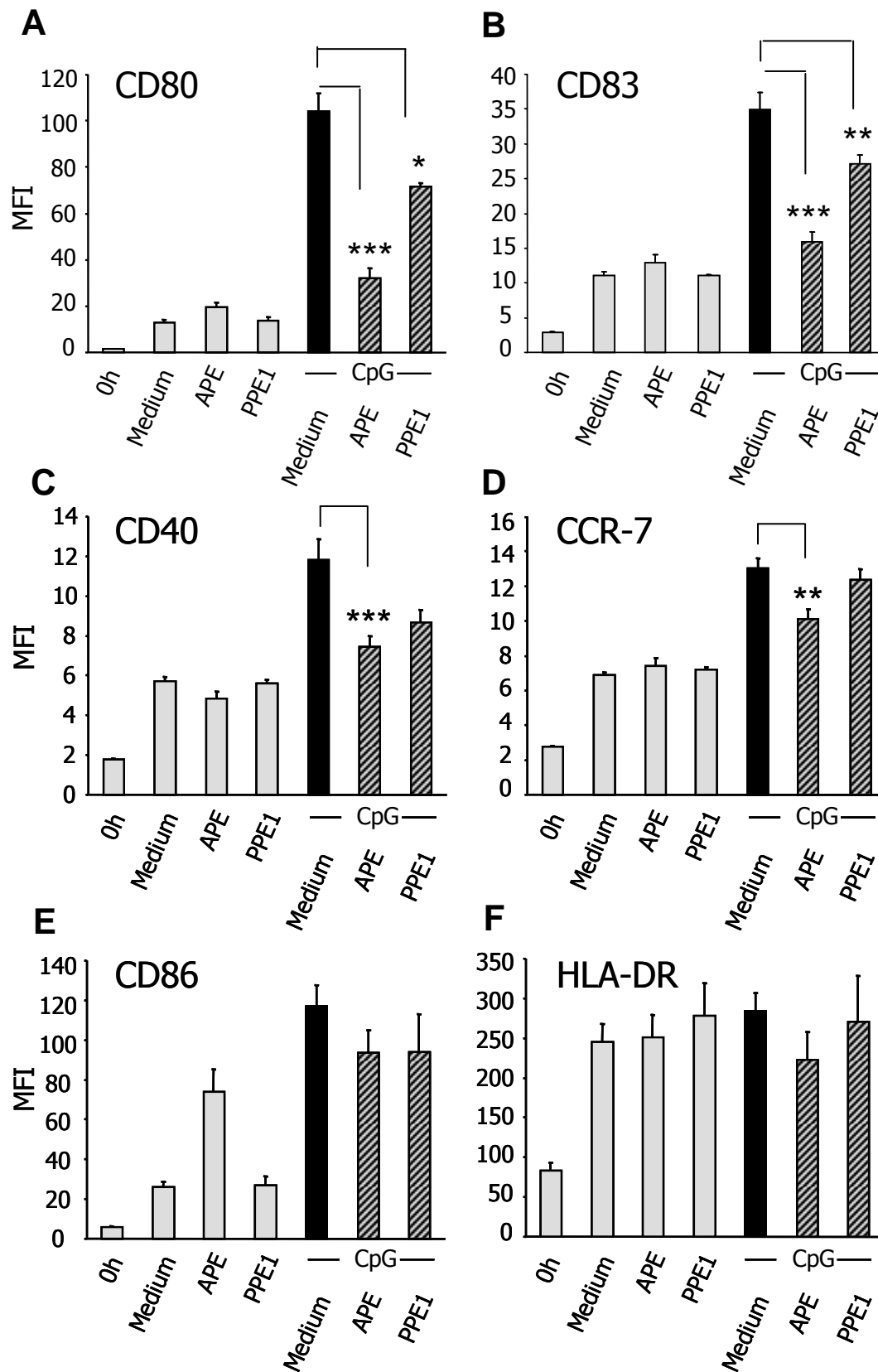


Abb. 21: Einfluss von CpG-B, Bet.-APE und PPE₁ auf die Reifung von PDCs. Direkt nach der Isolation wurden die Zellen mit CpG-B oder mit CpG-B und PPE₁/Bet.-APE stimuliert. Nach 24Std. wurden die Reifungsmarker durchflusszytometrisch untersucht. Dargestellt wurde die mean fluorescent intensity (MFI). Gezeigt werden die MW ± SEM von zehn unabhängigen Experimenten. *= $p < 0,05$, **= $p < 0,01$, ***= $p < 0,001$, gepaarter t-Test.

5 Diskussion

Vorarbeiten unserer Gruppe konnten zeigen, dass Pollen-assoziierte E₁-Phytoprostane die IL-12p70 Sekretion von Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen hemmen und dadurch eine T_H1-Antwort von naiven T-Zellen hemmen und eine T_H2 Antwort begünstigen [25]. Da diese dendritischen Zellen ein *in vitro* Modell darstellen, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss wässriger Pollenextrakte und Phytoprostane auf native humane dendritische Subpopulationen aus peripherem Blut untersucht werden.

5.1 Dendritische Zellen

Es konnte gezeigt werden, dass Pollen-assoziierte wasserlösliche Faktoren multiple Funktionen aller DC-Subtypen modulieren. Dabei wurden slanDCs, MDCs und PDCs untersucht.

Als erste Subpopulation wurden die 6-sulfo-LacNAc⁺ dendritischen Zellen (slanDCs) untersucht. SlanDCs exprimieren in hohem Maße den FcγRIII/CD16. Wir wissen, dass Subpopulationen von CD16⁺ Monozyten prädestiniert sind, migratorische DCs zu werden [177]. Daher ist es vorstellbar, dass slanDCs, welche CD16 exprimieren, auch eine Rolle bei der Initiierung oder Modulation von Immunreaktionen in der Haut und der Schleimhaut spielen. Somit kommen sie als Zielzellen für Pollen-assoziierte adjuvante Faktoren in Frage.

Es zeigte sich, dass, ähnlich wie bei Monozyten-abgeleiteten DCs (moDCs), wässrige Pollenextrakte die LPS-induzierte IL-12p70-Sekretion myeloider DCs (sowohl der CD1c⁺ MDCs als auch der slanDCs) hemmen, wobei die IL-6-Sekretion durch *Bet.*-APE nicht gehemmt wird. Weiterhin konnte festgestellt werden, dass bei den slanDCs E₁-Phytoprostane sowohl die LPS-induzierte IL-6- als auch die IL-12p70-Produktion hemmen. Dieses Ergebnis deckt sich nicht mit den bereits publizierten Daten aus moDCs, wo nur die IL-12-, nicht aber die IL-6-Sekretion gehemmt wird. Bei den CD1c⁺ MDCs hemmte PPE₁ dagegen weder die IL-12-, noch die IL-6 Produktion.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass PPE₁ die LPS-induzierte IL-12p70-Produktion von moDCs über eine Blockade des NF-κB-Signalweges und über einen PPAR-γ-abhängigen Mechanismus hemmt [178]. Die unterschiedlichen Ergebnisse mit PPE₁ bei den verschiedenen myeloiden DC-Subpopulationen legen den Verdacht nahe, dass PPAR-γ in diesen Subpopulationen unterschiedlich stark exprimiert sein könnte. Alternativ wäre es auch denkbar, dass MDCs eine geringere Kapazität zur Aufnahme von PPE₁ haben oder die aktiven E₁-Phytoprostane in der Zelle zu inaktiven Metaboliten umgebaut werden.

Novak et al. beschreiben in der Haut von Patienten mit atopischem Ekzem das Vorhandensein von IDECs (*Inflammatory Dendritic Epidermal Cells*), welche den hochaffinen IgE-Rezeptor (FcεRI) stark exprimieren. Möglicherweise leiten sich diese IDECs aus Monozyten her [167]. Wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, zeichnen sich slanDCs durch eine deutliche Expression des FcεRI aus. Es wäre denkbar, dass die im atopischen Ekzem beschriebenen IDECs sich auch aus myeloiden dendritischen Vorläuferzellen, wie zum Beispiel den slanDCs, herleiten. Interessanterweise konnten slanDCs auch in der Dermis und Epidermis von Patienten mit Psoriasis vulgaris und atopischem Ekzem nachgewiesen werden ([179] und K. Schäkel, persönliche Mitteilung).

In einer bereits publizierten Studie an moDCs konnte kein hemmender Einfluss von wässrigen Pollenextrakten oder PPE₁ auf die Expression von Reifungsmarkern festgestellt werden. Allenfalls wurde eine leichte Induktion von HLA-DR durch *Bet.*-APE beobachtet, diese wurde jedoch auf eine mögliche Verunreinigung der Extrakte mit bakteriellen Produkten zurückgeführt [25].

In unseren Versuchen verwendeten wir ausschließlich Extrakte, die über Polymyxin B Säulen von LPS gereinigt wurden. Es lässt sich jedoch nicht ausschließen, dass andere bakterielle Produkte in den Extrakten vorhanden waren. Im Gegensatz zu den an moDCs publizierten Daten zeigten unsere Versuche an slanDCs eine signifikante Hemmung der LPS-induzierten Reifung durch *Bet.*-APE der Reifungsmarker CD80, CD83 und CD40 sowie eine Hemmung des Oberflächenrezeptors CCR-7. Auch bei den CD1c+ MDCs beobachteten wir eine Reifungshemmung durch *Bet.*-APE. Auch beobachteten wir gegenüber Medium-gereiften Zellen keine erhöhte Reifung in Gegenwart von *Bet.*-APE. Dies spricht gegen eine signifikante bakterielle Verunreinigung der in dieser Arbeit verwendeten Extrakte.

Monozyten-abgeleitete DCs werden aus Monozyten durch Zusatz von GM-CSF und dem T-Zell-abgeleiteten Zytokin Interleukin 4 (IL-4) generiert. IL-4 erhöht die Kapazität von moDCs, große Mengen an IL-12p70 zu sekretieren [180]. Auch ist gezeigt worden, dass moDCs - im Gegensatz zu Monozyten und CD1c+ MDCs - bereits durch einfache LPS-Stimulation zur Sekretion von IL-12p70 angeregt werden. Myeloide Zellen aus dem Blut benötigen dagegen eine kombinierte Stimulation mit LPS und einem TLR8-Liganden, um IL-12 produzieren zu können [55]. Möglicherweise maskiert das während der DC-Kultur zugesetzte IL-4 bei moDCs die reifungshemmenden Effekte von wässrigen Pollenextrakten, weshalb sie nur bei nativen myeloiden DC-Populationen zu beobachten sind.

Bei slanDCs hemmt Prostaglandin E₂ (PGE₂) die LPS-induzierte IL-12-Sekretion und -Reifung (S. Gilles, persönliche Mitteilung). Es wurden bisher bereits einige *Bet.*-APE-vermittelte Effekte auf moDCs beobachtet, welche nicht auf das Vorhandensein von

PPE₁ zurückzuführen sind. Hierzu zählen die Induktion von cAMP und die Ausprägung eines migratorischen Phänotyps, der dem von PGE₂-gereiften DCs ähnelt [26]. Es ist mithin vorstellbar, dass bislang noch nicht identifizierte, PGE₂-ähnliche Lipide in den wässrigen Pollenextrakten auch für die beobachtete Reifungshemmung bei slanDCs und MDCs verantwortlich sind.

Interleukin-10 hemmt die Expression von diversen kostimulatorischen Molekülen bei Monozyten und dendritischen Zellen [181, 182] und wirkt daher begrenzend und hemmend auf Immunprozesse. Wir konnten jedoch im Überstand von slanDCs kein IL-10 nachweisen. Daher ist es unwahrscheinlich, dass die in unseren Experimenten beobachtete Hemmung der IL-12-Sekretion von slanDCs durch IL-10 vermittelt wird. Allerdings ist es denkbar, dass slanDCs als Vorläufer stark proinflammatorischer dendritischer Zellen nicht zu einer ausgeprägten IL-10-Produktion neigen, IL-10 jedoch bei der Hemmung der Zytokinproduktion von MDCs durchaus eine Rolle spielt.

Plasmazytoide dendritische Zellen (PDCs) spielen eine wichtige Rolle in der Abwehr von viralen Infektionen. Sie finden sich vermehrt in der nasalen Schleimhaut von Allergikern, in der Synovia von Patienten mit rheumatoider Arthritis sowie in von Lupus erythematodes oder Psoriasis befallener Haut [71, 183-185]. Sie exprimieren den FcεRI, allerdings werden sie kaum in der Haut von AE-Patienten gefunden [186].

Es gibt Hinweise darauf, dass PDCs – im Gegensatz zu MDCs – eine protektive Rolle bei asthmatischen Reaktionen auf inhalede Antigene spielen. Nach Depletion von PDCs in der Lunge reagierten Mäuse auf die Inhalation eines inerten Antigens mit erhöhtem Serum-IgE-Spiegel, Eosinophilie in der Lunge sowie vermehrter Expression von T_H2-Zytokinen [173]. In einem anderen Mausmodell konnte bei durch Ovalbumin sensibilisierten Mäusen gezeigt werden, dass sowohl die akute Entzündungsreaktion als auch die Remodelierung in der Lunge durch CpG reduziert wurde [187]. Diese Beobachtung findet sich allerdings primär bei unreifen PDCs. Bei IFN-α-produzierenden PDCs findet sich dieser Effekt nicht mehr [188]. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von *Bet.*-APE und PPE₁ auf die CpG-induzierte Reifung und Interferon-α-Produktion untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass *Bet.*-APE die CpG-B-induzierte Expression der Reifungsmarker CD80, CD83, CD40 und CCR-7 signifikant hemmt. Des Weiteren wurde bei fünf Spendern eine Hemmung der CpG-A-induzierten IFN-α-Sekretion beobachtet. Diese Befunde könnte man dahingehend deuten, dass Substanzen in wässrigen Pollenextrakten in der Lage sein könnten, mögliche Toleranzbrechende Eigenschaften von PDCs (Reifung, IFN-α-Sekretion) zu hemmen. PPE₁ könnte eine der verantwortlichen Substanzen sein, ein hemmender Effekt auf die IFN-α-Produktion wurde jedoch nur bei zwei von fünf Spendern beobachtet. Die Spender waren in der gleichen Altersgruppe und hatten ähnliche Ergebnisse im RAST. Interessant wäre

zu untersuchen, ob es bei diesen Spendern ebenfalls einen Unterschied auf der Ebene der PPAR- γ Expression gibt.

Die Ausreifung verschiedener dendritischer Zell-Subpopulationen mit wässrigen Pollenextrakten und E₁-Phytosterolen lieferte z. T. sehr divergierende Ergebnisse. So unterschieden sich beispielsweise slanDCs und MDCs bezüglich der Hemmung der Zytokinproduktion durch PPE₁. Diese Unterschiede könnten darauf beruhen, dass die verschiedenen DCs unterschiedliche Rezeptoren für PPE₁ exprimieren oder diese Substanzen unterschiedlich gut aufnehmen. Aufgrund der Tatsache, dass bei moDCs die Hemmung der IL-12-Sekretion durch PPE₁ über PPAR- γ vermittelt wird [178], erscheint eine Untersuchung der Expression von PPAR- γ interessant.

Unsere Arbeitsgruppe hat untersucht, ob die Hemmung der LPS-induzierten Reifung der slanDCs durch *Bet.*-APE von der Sensibilisierung der Spender abhängt. Alle Versuche an slanDCs wurden in den Monaten Januar bis März durchgeführt, wenn der Birken-Pollenflug gering ist. Die Spender waren alle gegen *Betula*-Pollen sensibilisiert, und alle Spenderzellen wurden mit *Bet.*-APE stimuliert. Dabei wurde festgestellt, dass die LPS-induzierte Reifung der slanDCs von Atopikern gleichermaßen durch *Bet.*-APE gehemmt wird. Das bedeutet, dass die in den wässrigen Pollenextrakten vorhandenen Substanzen, welche für diese Reifungshemmung verantwortlich sind, unabhängig vom Sensibilisierungszustand wirken [Jacoby et al, Clin Exp Allergy, accepted]. In einer weiteren Studie konnte kein Unterschied zwischen Atopikern und nicht-Atopikern bei Stimulation von moDCs mit diversen TLR Liganden festgestellt werden [189]. Diese Befunde können durch die hier vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden.

Die Tatsache, dass Pollen-assoziierte niedermolekulare Faktoren auf Zellen von Nichtatopikern und Atopikern gleichermaßen wirken, könnte bedeuten, dass sich die unterschiedlichen Reaktionsmuster der Entzündungsreaktionen von Atopikern und Nicht-atopikern auf einer anderen Zellebene abspielen. Dabei könnten die Epithelzellen der Haut oder des Respirationstraktes eine Rolle spielen. Die Epithelzellen sind die ersten Zellen, die mit Außenluftallergenen in Kontakt treten. Möglich wäre, dass bei Atopikern primär die Epithelzelle anders reagiert und dadurch die DCs von vorneherein anders stimuliert werden. Dafür bedarf es allerdings weiterführender Versuche, welche den Crosstalk zwischen Epithelzellen (Schleimhaut- und Respiratorisches Epithel oder Keratinozyten) und dendritischen Zellen näher untersuchen.

5.2 Einfluss von Pollen assoziierten Lipidmediatoren

Bet.-APE und PPE₁ beeinflussen bei dendritischen Zellen neben der Zytokinproduktion auch die TLR-Liganden-induzierte Reifung. Die LPS-induzierte Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD80 (B7-1), CD40, CD83 und CCR-7 wurde bei den

slanDCs und den MDCs durch wässrige Pollenextrakte gehemmt. Bei den PDCs wurde die CpG-B- induzierte Reifung der Oberflächenmarker CD80, CD83, CD40 und CCR-7 und die CpG-A-induzierte IFN- α Sekretion durch *Bet.*-APE gehemmt. Die Phytoprostane E_1 und F_1 führten bei den myeloiden DCs zu keiner Hemmung der LPS-induzierten Reifung. Bei den PDCs konnte allerdings eine signifikante Hemmung der CpG-B induzierten Hochregulation der Reifungsmarker CD80 und CD83 durch PPE_1 beobachtet werden. Aufgrund der Tatsache, dass sich die Effekte von *Bet.*-APE - die Hemmung der Reifungsmarker CD80 und CD83 bei den PDCs ausgenommen - durch Stimulation mit E_1 - und F_1 -Phytoprostanen nicht reproduzieren ließen, dachten wir an die Möglichkeit einer Hemmung durch in wässrigen Pollenextrakten befindliche Proteine. Dazu wurden die wässrigen Pollenextrakte mit Proteinase K verdaut und der Einfluss von verdautem *Bet.*-APE auf die slanDCs untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass wässrige Pollenextrakte auch in Abwesenheit von Proteinen die LPS-induzierte Reifung hemmten. Auch die Auftrennung von *Bet.*-APE über einen Cut-off von 3kD zeigte, dass die Fraktion <3kD stärker hemmte als die Fraktion >3kD (sowohl auf der Ebene der IL-12-Hemmung als auch der Reifungshemmung).

Diese Ergebnisse legen den Verdacht nahe, dass ein niedrigmolekularer, nicht-proteiner Faktor, wie zum Beispiel ein noch nicht identifiziertes Lipid, für diesen Einfluss mitverantwortlich ist. In physiologischen Lösungen befinden sich viele an Proteine gebundene Lipide. An moDCs wurden bereits mehrere Effekte beobachtet, die durch PGE_2 -artige Lipide vermittelt sein könnten. Vorarbeiten unserer Arbeitsgruppe konnten beispielsweise zeigen, dass Eikosanoid-ähnliche Substanzen aus *Bet.*-APE bei Monozyten abgeleiteten DCs eine intrazelluläre cAMP-Antwort induzieren und die Expression von Chemokinrezeptoren modulieren sowie die Migration auf die Chemokine CCL19, CCL21 und CXCL12 modulieren. Diese Effekte können nicht dem PPE_1 zugeschrieben werden [26]. Es wäre daher denkbar, dass auch die in unseren Versuchen beobachteten Effekte durch ein Lipid vermittelt werden, das PGE_2 -ähnlich, jedoch nicht identisch mit PPE_1 ist („PALM- PGE_2 “). Es gibt verschiedene Hinweise aus der Literatur, dass PGE_2 bei DCs unter bestimmten Bedingungen nicht nur die Zytokinproduktion, sondern auch die Expression von Reifungsmarkern hemmen kann. So wurde berichtet, dass PGE_2 aus dem Speichel von Insekten die Reifung von DCs hemmt [190]. Eigene, unveröffentlichte Versuche an slanDCs ergaben, dass PGE_2 die LPS-induzierte Reifung hemmt (S. Gilles, persönliche Mitteilung). Bekannt ist, dass das Mikromilieu und der Mikrometabolismus aus Lipiden die dendritischen Zellen beeinflussen [191-193]. So wurde berichtet, dass oxidierte Phospholipide die Reifung und Zytokinproduktion bei moDCs hemmen [194]. Auch konnte gezeigt werden, dass exogenes PGE_2 die HLA-DR Expression in dendritischen Zellen aus murinem Knochenmark herunterreguliert [195].

Die Hemmung der Expression von CD86 (B7-1) und MHC-Klasse II durch *Bet.*-APE war bei den slanDCs nicht signifikant. Auch bei den MDCs zeigte sich keine signifikante Hemmung der LPS-induzierten Hochregulation von CD86 durch *Bet.*-APE. Allerdings besteht hier ein Trend in Richtung Hemmung, wobei PPE₁ eher wirksamer als *Bet.*-APE zu sein scheint. Bei den MDCs wird die LPS-induzierte Hochregulation von HLA-DR signifikant durch PPE₁ gehemmt. Die verschiedenen Effekte, die wir beobachten, legen den Verdacht nahe, dass mehrere verschiedene Signalwege beteiligt sind. Es scheint daher sehr wahrscheinlich, dass eine Reihe von unabhängigen Faktoren den hemmenden Effekt vermitteln. Einer dieser Faktoren könnte PPE₁ sein.

Aus der Literatur ist bekannt, dass NF- κ B viele kostimulatorische Moleküle reguliert [196]. Die Hemmung von NF- κ B fördert in dendritischen Zellen Anergie oder die Generierung von T-regulatorischen Zellen [197]. Unsere Arbeitsgruppe konnte erst vor kurzem zeigen, dass sowohl *Bet.*-APE als auch PPE₁ die Translokation von NF- κ B p65 in den Zellkern bei moDCs hemmen [178]. Toleranz oder Anergie kann in dendritischen Zellen durch Aktivierung von PPAR- γ ausgelöst werden [191, 198, 199]. Kürzlich wurde gezeigt, dass das Phytoprostan E₁ die LPS-induzierte IL-12p70 Produktion über einen PPAR- γ abhängigen Signalweg hemmt [178], wobei bislang noch unbekannt ist, ob PPE₁ PPAR- γ direkt hemmt. Dazu passt, dass die nasale Instillation von PPE₁ im Mausmodell sowohl die T_H1- als auch die T_H2-Differenzierung von T-Zellen in den drainierenden Lymphknoten hemmte [200]. Ob die Reifung von murinen DCs durch PPE₁ *in vivo* gehemmt wird, ist nicht bekannt.

Neben den Lipiden befinden sich in wässrigen Pollenextrakten viele andere, potentiell bioaktive niedermolekulare Substanzen, zumeist Sekundärmetabolite der Pflanze. Unter anderem finden sich darin Flavonoide, polyzyklische Pigmente, von denen bekannt ist, dass sie antioxidative oder antikarzinogene Eigenschaften besitzen. Eine ganze Reihe von Arbeiten weisen darauf hin, dass Flavonoide die Reifung und/oder die Zytokinproduktion dendritischer Zellen über eine Hemmung von NF- κ B und/oder über MAPK hemmen können [201-204]. Eine andere mengenmäßig relevante Molekülklasse in den Pollen sind die Arabinogalaktane. Bislang konnte jedoch noch kein hemmender Einfluss von Polysacchariden auf die Reifung von dendritischen Zellen beobachtet werden. Andererseits wirken bakterielle Polysaccharide als PAMPs und aktivieren proinflammatorische Signalwege [205]. Es gibt Daten, die zeigen, dass dendritische Zellen bei ständiger Stimulation durch eine niedrige Dosis an Nukleotiden eine Entzündungsreaktion unterdrückt oder verändert [206].

Ein weiteres niedermolekulares Molekül ist das Adenosin, welches in *Bet.*-APE nachgewiesen werden konnte (S. Gilles, persönliche Mitteilung). Adenosin wird im Rahmen von entzündlichen Reaktionen vermehrt freigesetzt [207] und wirkt über G-Protein-gekoppelte Rezeptoren auf inflammatorische Zellen. Es ist bekannt, dass

Adenosin die IL-12-Produktion von DCs supprimiert und damit T_H1-hemmend wirkt. Allerdings besitzen DCs eine Adenosin-Deaminase Aktivität, was zu einer Herunterregulation von Adenosin-vermittelten Effekten führt [208, 209].

In Pollen befinden sich sogenannte Defekt-assoziierte molekulare Strukturen (Damage-associated molecular patterns, DAMPs) wie zum Beispiel Harnsäure oder Adenosin-Triphosphat. Diese Moleküle führen bei entzündlichen Reaktionen zur Rekrutierung und Aktivierung von Entzündungszellen. Dabei scheint eine enge Zusammenarbeit von PAMPs und DAMPs notwendig zu sein, um eine Immunreaktion auszulösen. Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass endogene Signale wie Adenosin eine wichtige Rolle bei der Initiierung und Aufrechterhaltung einer allergischen Reaktion haben [210]. Auch Pollen-assoziiertes Adenosin könnte als „Gefahr-Signal“ fungieren und damit pro-inflammatorisch wirken.

Aus unseren vorherigen Untersuchungen an moDCs konnten wir zeigen, dass PALMs die Polarisierung der T-Zellantwort in Richtung T_H2 fördern [25, 26]. Diese Ergebnisse stimmen gut mit denen im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnissen überein. Gleichzeitig konnte im Mausmodell gezeigt werden, dass die nasale Instillation von *Bet.*-APE einen T_H2 Shift bei T-Zellen in drainierenden Lymphknoten induziert [200] und so die Gegebenheiten *in vivo* widerspiegelt. Wir wissen auch, dass CpG-A durch Bindung an TLR9 die Produktion von T_H1-Typ Zytokinen und Chemokinen bei PDCs fördert [211]. Die Stimulation der slan-, plasmazytoiden und myeloiden DCs durch *Bet.*-APE beeinträchtigt die Hochregulation der T-Zell kostimulatorischen Moleküle. Es könnte daher spekuliert werden, dass naive T-Helferzellen durch *Bet.*-APE-stimulierte DCs eher anergisch werden als dass sie zu einer T_H2 Polarisierung führen. Aus unseren Versuchen ist bekannt, dass wässrige Pollenextrakte die Zytokinproduktion und Reifung dendritischer Zellen modulieren. Unbekannt bleibt allerdings, ob die DCs die eigentlichen, d. h. die primären Zielzellen der PALMs sind. Weiterhin ist nicht bekannt, welche Substanz(en) aus dem komplexen Substanzgemisch den stärksten Einfluss auf die Zellen ausüben. Die Identifikation weiterer immunmodulatorischer Substanzen aus Pollen ist daher ein wichtiges Ziel, um besser zu verstehen, wie adjuvante Faktoren die Sensibilisierung gegenüber Pollenallergenen fördern könnten.

6 Zusammenfassung

Nachdem bekannt war, dass Pollen-assoziierte E₁-Phytoprostane bei Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (moDCs) die LPS-induzierte IL12-Produktion hemmen und so eine T_H2 Differenzierung von naiven T-Zellen fördern, sollte im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss von wasserlöslichen Substanzen aus Birkenpollen und insbesondere der Phytoprostane auf die Reifung und Zytokinproduktion von nativen Subpopulationen dendritischer Zellen aus humanem, peripherem Blut untersucht werden. Dabei wurden myeloide, plasmazytoide und 6-sulfo-LacNAc⁺ („slan“-) dendritische Zellen für 24Std. mit geeigneten Reifungsstimuli in Gegenwart oder Abwesenheit von Pollenextrakten bzw. Phytoprostanen inkubiert. Anschließend wurde die Zytokinsekretion und die Reifung der unterschiedlichen DCs untersucht

Dabei wurde festgestellt, dass wässrige Pollenextrakte von *Betula alba* (*Bet.-APE*) die reifungsinduzierte Zytokinproduktion sowie die Aufregulation von Maturationsmarkern bei allen DC-Subpopulationen hemmten. Die Versuche ergaben ferner, dass in *Bet.-APE* ein nicht-proteiner Faktor mit einem Molekulargewicht <3kD für die Hemmung der LPS-induzierten Reifung und Zytokinproduktion verantwortlich ist. Zwei Kandidaten-substanzen, die E₁- und F₁-Phytoprostane, hatten jedoch keinen Einfluss auf die LPS-induzierte Reifung myeloider DCs (MDCs und slanDCs). Allerdings führte E₁-Phytoprostan bei einzelnen Spendern zu einer Hemmung der CpG-induzierten Reifung von PDCs. Die beobachteten Unterschiede in der Wirkung auf die verschiedenen DC-Subpopulationen lassen sich möglicherweise durch die Verwendung unterschiedlicher Signalwege oder aber durch eine(n) unterschiedliche(n) Abbau/Aufnahme der Phytoprostane bei den verschiedenen DC-Zelltypen erklären. Weiterhin konnten wir feststellen, dass die E₁-Phytoprostane zu einer dosis-abhängigen Hemmung der TLR-Liganden-induzierten IL-12-Sekretion myeloider DCs führen. Damit konnten wir die Ergebnisse einer früheren Studie an Monozyten-abgeleiteten DCs bestätigen.

Unsere Versuche mit nativen DC-Subpopulationen zeigen, dass native humane dendritische Zellen Zielzellen für Pollen-assoziierte immun-modulatorische Faktoren sein könnten. Die Identifikation weiterer immunmodulatorischer Substanzen aus Pollen wird zu einem umfassenderen Verständnis der Rolle biogener, adjuvanter Faktoren bei der allergischen Sensibilisierung führen.

IV Literaturverzeichnis

1. Knox, R.B., *Pollen and Allergy. In: Studies in Biology.* 1979(10: 1, 23 - 32, 51).
2. Schubert, R., Wagner, G., *Botanisches Wörterbuch*, 1993(11. Auflage, 397).
3. Brown, H.M., Irving, K.R., *The size and weight of common allergenic pollens.* Acta Allergol., 1973 (28): p. 132 - 137.
4. Shaw, G., *The chemistry of sporopollenin In: Sporopollenin*, in Academic Press, London, New York. 1971, Brooks, J.: Grant, P. R.; Muir, M.; van Gijssel, P., Shaw, G. (Hrsg.).
5. Behrendt, H., Becker, W. M., *Localization, release and bioavailability of pollen allergens: influence of environmental factors.* Curr. Opin. In Immunol., 2001. 13:709-715.
6. Liem, A.S., Groot, J., *Anthesis and pollen dispersal of *Holcus lanatus* L. and *Festuca rubra* L. in relation to climate factors.* Rev. Palaeobotany Palynology, 1973(15: 3).
7. Suphioglu, C., Shing, M. B., Taylor, P., Bellomo, R., Holmes, P., Puy, R., Knox, R. B., *Mechanism of grass-pollen induced asthma.* Lancet, 1992(339; 569 - 572).
8. Blackley, C.H., *Experimental Researches on the Causes and Nature of Catarrhus Aestivus: Hay Fever or Hay Asthma.* Oxford Historical Books, 1988(September 1988).
9. Johnson P., M.D.G., *The isolation and characterization of allergens from the pollen of rye grass (*Lolium perenne*).* Eur Polymer J, 1965.
10. Grote, M., *In situ localization of pollen allergens by immunogold electron microscopy: allergens at unexpected sites.* Int Arch Allergy Immunol, 1999(118:1-6).
11. Grote M, F.H., *Cross-reactivity of birch anthers and leaves with birch pollen antigens and allergens. A fine-structural immunocytochemical study using the post-embedding protein-A-gold technique.* J Histochem Cytochem., 1986(Nov;34(11):1459-64).
12. Poupard P, S.D., Simoneau P, *Two members of the *Bet v 1* gene family encoding birch pathogenesis-related proteins display different patterns of root expression and wound-inducibility.* Ast J Plant Pysiol., 1998(25:459-464).
13. Puc, M., *Characterisation of pollen allergens.* Ann Agric Environ Med., 2003(10(2):143-9).
14. WHO/IUIS, A.N.S., *Allergen nomenclatur.* Bull. World Health Org., 1994(72; 797-806).

15. Bufe, A., Spangfort, M. D., Kahlert, H., Schlaak, M., Becker, W. M., *The major birch pollen allergen, Bet v 1, shows ribonuclease activity*. *Planta*, 1996(199: 413-415).
16. Ebner, C., Hirschwehr, R., Bauer, L., Breiteneder, H., Valenta, R., Ebner, H., Kraft, D., Scheiner, O., *Identification of allergens in fruits and vegetables: IgE cross-reactivities with important birch pollen allergens Bet v 1 and Bet v 2 (birch profilin)*. *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1995(95).
17. Tinghino, R., Twardosz, A., Barletta, B., Puggioni, E. M., Iacovacci, P., C. Butteroni, Afferni, C., Mari, A., Hayek, B., Di Felice, G., Focke, M., and K. Westritschnig, Valenta, R., Pini, C, *Molecular, structural, and immunologic relationship between different families of recombinant calcium-binding pollen allergens*. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 2002(109 314-320).
18. Twardosz, A., Hayek, B., Seiberle, S., Vangelista, L., Elfman, L., Gronlu, H., Kraft, D., Valenta, R., *Molecular characterization, expression in Escherichia coli, and epitope analysis of a two EF-hand calcium-binding birch pollen allergen, Bet v 4*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1997(239 197 - 204).
19. Kasche, A., *Wechselwirkungen zwischen Birkenpollen und humanen polymorphonukleären Granulozyten von Atopikern und Normalpersonen*. Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin, 2002.
20. Siegel, I., Shermann, W.B., *Pollen-white cell interactions*. *J Allergy* 45, 1970(133-145).
21. Behrendt, H., Kasche, A., Ebner von Eschenbach, C., Risse, U., Huss-Marp, J., Ring, J., *Secretion of proinflammatory eicosanoid-like substances precedes allergen release from pollen grains in the initiation of allergic sensitization*. *Int. Arch. Allergy Clin. Immunol.*, 2001(124:121-125).
22. Imbusch R, M.M., *Formation of isoprostane F(2)-like compounds (phytoprostanes F(1)) from alpha-linolenic acid in plants*. *Free Radic Biol Med.*, 2000(Mar 1;28(5):720-6.).
23. Traidl-Hoffmann C, K.A., Jakob T, Huger M, Plötz S, Feussner I, Ring J, Behrendt H., *Lipid mediators from pollen act as chemoattractants and activators of polymorphonuclear granulocytes*. *J Allergy Clin Immunol*. 2002, 2002(May;109(5):831-8).
24. Plötz SG, T.-H.C., Feussner I, Kasche A, Feser A, Ring J, Jakob T, Behrendt H., *Chemotaxis and activation of human peripheral blood eosinophils induced by pollen-associated lipid mediators*. *J Allergy Clin Immunol.*, 2004(Jun;113(6):1152-60.).

25. Traidl-Hoffmann C, M.V., Hochrein H, Karg K, Wagner H, Ring J, Mueller MJ, Jakob T, Behrendt H., *Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization*. J Exp Med., 2005(Feb 21;201(4):627-36. Erratum in: J Exp Med. 2005 Apr 18;201(8):1347.).
26. Mariani V, G.S., Jakob T, Thiel M, Mueller MJ, Ring J, Behrendt H, Traidl-Hoffmann C, *Immunomodulatory mediators from pollen enhance the migratory capacity of dendritic cells and license them for Th2 attraction*. J Immunol., 2007. Jun 15; 178(12).
27. Samuelsson B, D.S., Lindgren JA, Rouzer CA, Serhan CN, *Leukotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects*. Science, 1987(Sep 4;237(4819):1171-6).
28. Feussner, I., Bachmann, A., Höhne, M., Kindl, H., *All three acyl moieties of trilinolein are efficiently oxygenated by recombinant Histagged lipid body lipoxygenase*. FEBS Letters, 1998(431:433- 436).
29. Kasche A, K.S., Thiel M, Buters J, Weichenmeier I, Krämer U, Behrendt H, Traidl-Hoffmann C, *Release of LTB4-like pollen associated lipid mediators (PALMLTB4) from birch pollen in different air polluted areas in West and Southern Germany*. Journal of the World Allergy Congress, 2005(Supplement No.1 June26-July 1).
30. Langerhans, P., *Über die Nerven der menschlichen Haut*. Virchows Arch, 1868(44, pp. 325-27.).
31. Steinman, R.M.a.C., Z.A., *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution*. Journal of Experimental Medicine, 1973(137, pp. 1142-62.).
32. Steinman, R.M.a.C., Z.A., *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro*. J Exp Med, 1974(139(2), pp. 380-97.).
33. Steinman, R.M., Adams, J.C. and Cohn, Z.A., *Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen*. J Exp Med, 1975(141(4), pp. 804-20.).
34. Gluckman, J.C., B. Canque and M. Rosenzweig, *Dendritic cells: a complex simplicity*. Transplantation, 2002(73(1 Suppl): S3-6.).
35. Steinman, R.M., D. Hawiger and M.C. Nussenzweig, *Tolerogenic dendritic cells*. Annu Rev Immunol, 2003(21: 685-711).
36. Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B., and Palucka, K., *Immunobiology of dendritic cells*. Annu.Rev.Immunol., 2000(18:767-811).

37. Banchereau, J.a.S., R. M., *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998(392:245-252.).
38. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A., *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(182:389-400.).
39. Engering, A.J., Cella, M., Fluitsma, D., Brockhaus, M., Hoefsmit, E. C., Lanzavecchia, A., and Pieters, J., *The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells*. Eur J Immunol, 1997(27:2417-2425).
40. Tan, M.C., Mommaas, A. M., Drijfhout, J. W., Jordens, R., Onderwater, J. J., Verwoerd, D., Mulder, A. A., van der Heiden, A. N., Scheidegger, D., Oomen, L. C., Ottenhoff, T. H., Tulp, A., Neefjes, J. J., and Koning, F., *Mannose receptor-mediated uptake of antigens strongly enhances HLA class II-restricted antigen presentation by cultured dendritic cells*. Eur J Immunol, 1997. (27:2426-2435).
41. Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M., and Nussenzweig, M. C., *The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing*. Nature, 1995. (375:151-155).
42. Fanger, N.A., Wardwell, K., Shen, L., Tedder, T. F., and Guyre, P. M., *Type I (CD64) and type II (CD32) Fc gamma receptor-mediated phagocytosis by human blood dendritic cells*. J Immunol, 1996. (157:541-548.).
43. Albert, M.L., Sauter, B., and Bhardwaj, N., *Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs*. Nature, 1998.(392:86-89.).
44. Albert, M.L., Pearce, S. F., Francisco, L. M., Sauter, B., Roy, P., Silverstein, R. L., and Bhardwaj, N., *Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via alpha(v)beta5 and CD36, and crosspresent antigens to cytotoxic T lymphocytes*. J Exp.Med., 1998.(188:1359-1368.).
45. Inaba, K., Inaba, M., Naito, M., and Steinman, R. M., *Dendritic cell progenitors phagocytose particulates, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo*. J Exp.Med., 1993.(178:479-488).
46. Rubartelli, A., Poggi, A., and Zocchi, M. R., *The selective engulfment of apoptotic bodies by dendritic cells is mediated by the alpha(v)beta3 integrin and requires intracellular and extracellular calcium*. Eur.J Immunol, 1997(27:1893-1900).
47. Schäkel K, K.R., Kniep B, Goto Y, Mitsuoka C, Zwirner J, Soruri A, von Kietzell M, Rieber E., *6-Sulfo LacNAc, a novel carbohydrate modification of PSGL-1, defines an inflammatory type of human dendritic cells*. Immunity, 2002(Sep;17(3):289-301.).

48. de Baey A., I.M., G. Baretton, A. Greiner, W. H. Hartl, P. A. Baeuerle and H. M. Diepolder, *A Subset of Human Dendritic Cells in the T Cell Area of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue with a High Potential to Produce TNF- α* . J. Immunol., 2003(170; 5089-5094).
49. Schäkel K, v.K.M., Hänsel A, Ebling A, Schulze L, Haase M, Semmler C, Sarfati M, Barclay AN, Randolph GJ, Meurer M, Rieber EP., *Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes*. Immunity, 2006(Jun;24(6):767-77.).
50. Schäkel K, M.E., Federle C, Schmitz M, Riethmüller G, Rieber EP., *A novel dendritic cell population in human blood: one-step immunomagnetic isolation by a specific mAb (M-DC8) and in vitro priming of cytotoxic T lymphocytes*. Eur J Immunol., 1998(Dec;28(12):4084-93.).
51. Schäkel K, P.C., Mayer E, Federle C, Riethmüller G, Rieber EP., *M-DC8+ leukocytes--a novel human dendritic cell population*. Pathobiology, 1999(67(5-6):287-90).
52. Gueronprez P, V.J., Zitvogel L, Théry C, Amigorena S., *Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells*. Annu Rev Immunol., 2002(20:621-67. Epub 2001 Oct 4).
53. Grouard Géraldine, D.I., Filgueira Luis, Banchereau Jacques & Liu Yong-Jun, *Dendritic cells capable of stimulating T cells in germinal centres*. Nature, 1996(384, 364 - 367 (28 November)).
54. Urban BC, F.D., Pain A, Willcox N, Plebanski M, Austyn JM, Roberts DJ., *Plasmodium falciparum-infected erythrocytes modulate the maturation of dendritic cells*. Nature., 1999(Jul 1;400(6739):73-7.).
55. Bekeredjian-Ding I, R.S., Gilles S, Giese T, Ablasser A, Hornung V, Endres S, Hartmann G, *T cell-independent, TLR-induced IL-12p70 production in primary human monocytes*. J Immunol., 2006(Jun 15;176(12):7438-46).
56. Lennert K, K.E., Muller-Hermelink HK., *Letter: T-associated plasma-cells*. Lancet., 1975(1:1031-2).
57. Papadimitriou CS, S.-N.S., Malamou-Mitsi VD., *Comparative immunostaining of T-associated plasma cells and other lymph- node cells in paraffin sections*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1983(43:31-6.).
58. Lennert, K.a.W.R., *Karyometrische Untersuchungen an Lymphknotenzellen des Menschen I. Mitteilung: Germinoblasten, Lymphoblasten und Lymphozyten*. Acta Haemat, 1958(19: 99).
59. Muller-Hermelink, H.K., E. Kaiserling, et al., *Pseudofollicular nests of plasmacells of a special type in paracortical pulp of human lymph nodes*. Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol, 1973(14(1): 47-56.).

60. Facchetti, F., C. de Wolf-Peeters, et al., *Plasmacytoid T cells. Immunohistochemical evidence for their monocyte/macrophage origin.* Am J Pathol, 1988(133(1):15-21.).
61. U O'Doherty, M.P., S Gezelter, W J Swiggard, M Betjes, N Bhardwaj, and R M Steinman, *Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature.* Immunology, 1994(82(3):487-93.).
62. Grouard Géraldine, M.-C.R., Luis Filgueira, Dagger Isabelle Durand, Jacques Banchereau and Yong-Jun Liu, *The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand.* J Exp Med, 1997(185:1101-11).
63. Fitzgerald-Bocarsly, P., *Human natural interferon-alpha producing cells.* Pharmacol. Ther., 1993(60:39-62.).
64. Peter, H.H., H. Dallugge, et al., *Human peripheral null lymphocytes. II. Producers of type-1 interferon upon stimulation with tumor cells, Herpes simplex virus and Corynebacterium parvum.* Eur J Immunol, 1980(10(7): 547-55).
65. Ferbas JJ, J.T., AJ Logar, JS Navratil and CR Rinaldo Jr, *CD4+ blood dendritic cells are potent producers of IFN-alpha in response to in vitro HIV-1 infection.* J Immunol, 1994(152(9): 4649-62.).
66. Cella M, J.D., Facchetti F, Alebardi O, Nakajima H, Lanzavecchia A, Colonna M., *Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon.* Nat Med, 1999(5: 919-23).
67. Siegal FP, K.N., Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ, *The nature of the principal type 1 interferonproducing cells in human blood.* Science, 1999(284 (5421): 1835-7).
68. Shigematsu H, R.B., Iwasaki H, Mizuno S, Hu D, Traver D, Leder P, Sakaguchi N, Akashi K, *Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin.* Immunity, 2004(21(1): 43-53).
69. Dzionek A, F.A., Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J., *BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood.* J. Immunol., 2000(165(11): 6037-46).
70. Facchetti F, B.G., De Wolf-Peeters C, Vandaele R, Degreeef H, Desmet VJ., *Plasmacytoid monocytes in Jessners lymphocytic infiltration of the skin.* Am. J. Dermatopathol., 1990(12(4): 363-9).
71. Jahnsen FL, L.-J.F., Dunne JF, Farkas L, Haye R, Brandtzaeg P, *Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy.* J Immunol, 2000(165(7): 4062-8.).

72. Wollenberg A, W.M., Günther S, Towarowski A, Tuma E, Moderer M, Rothenfusser S, Wetzel S, Endres S, Hartmann G., *Plasmacytoid dendritic cells: a new cutaneous dendritic cell subset with distinct role in inflammatory skin diseases*. J Invest Dermatol, 2002(119(5): 1096-102).
73. Liu, Y.J., *IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors*. Annu Rev Immunol., 2005(23: 275-306).
74. Kadowakia Norimitsu, A.S., Yiu-Nam Laub Johnson and Liua Yong-Jun, *Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity*. J Exp Med, 2000(192(2): 219-26).
75. Krug A, T.A., Britsch S, Rothenfusser S, Hornung V, Bals R, Giese T, Engelmann H, Endres S, Krieg AM, Hartmann G., *Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12*. Eur J Immunol, 2001(31:3026-37.).
76. Kadowaki, N.a.Y.J.L., *Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity*. Hum Immunol, 2002(63(12): 1126-32.).
77. Hornung V, R.S., Britsch S, Krug A, Jahrsdörfer B, Giese T, Endres S, Hartmann G., *Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides*. J Immunol., 2002(May 1;168(9):4531-7).
78. Banchereau J, B.F., Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K, *Immunobiology of dendritic cells*. Annu Rev Immunol., 2000(18:767-811.).
79. Netea, M.G., van der Graaf, C., Van der Meer, J.W. and Kullberg, B.J., *Toll-like receptors and the host defense against microbial pathogens bringing specificity to the innate-immune system*. J Leukoc Biol, 2004(75, 749-755).
80. Hashimoto, C., Hudson, K.L. and Anderson, K.V., *The Toll gene of Drosophila, required for dorsal-ventral embryonic polarity, appears to encode a transmembrane protein*. Cell, 1988(52, 269-279.).
81. Lemaitre, B., Nicolas, E., Michaut, L., Reichhart, J.M. and Hoffmann, J.A., *The dorsoventral regulatory gene cassette spatzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults*. Cell, 1996(86, 973-983.).
82. Williams MJ, R.A., Kimbrell DA, Eldon ED, *The 18-wheeler mutation reveals complex antibacterial gene regulation in Drosophila host defense*. EMBO J., 1997(Oct 15;16(20):6120-30.).
83. Medzhitov R, P.-H.P., Janeway CA, Jr., *A human homologue of the Drosophila Toll protein signals activation of adaptive immunity*. Nature, 1997(388:394-7.).

84. Janeway, C.A., Jr. and Medzhitov, R., *Innate immune recognition*. Annu Rev Immunol, 2002(20, 197-216).
85. Akira, S.a.T., K., *Toll-like receptor signalling*. Nat Rev Immunol, 2004(4, 499-511.).
86. Rock FL, H.G., Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF., *A family of human receptors structurally related to Drosophila Toll*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1998(95:588-93).
87. Tauszig-Delamasure S, B.H., Capovilla M, Hoffmann JA, Imler JL., *Drosophila MyD88 is required for the response to fungal and Gram-positive bacterial infections*. Nat. Immunol., 2002(3 (1): 91-7).
88. Poltorak A, H.X., Smirnova I, Liu MY, Van Huffel C, Du X, Birdwell D, Alejos E, Silva M, Galanos C, Freudenberg M, Ricciardi-Castagnoli P, Layton B, Beutler B., *Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene*. Science, 1998(282:2085-8.).
89. Qureshi ST, L.L., Leveque G, Clermont S, Moore KJ, Gros P, Malo D., *Endotoxin-tolerant mice have mutations in Toll-like receptor 4 (Tlr4)*. J Exp Med., 1999(Feb 15;189(4):615-25.[Click here to read](#)).
90. Arbour NC, L.E., Schutte BC, Zabner J, Kline JN, Jones M, Frees K, Watt JL, Schwartz DA, *TLR4 mutations are associated with endotoxin hyporesponsiveness in humans*. Nat Genet., 2000(25:187-91.).
91. Hemmi H, K.T., Takeuchi O, Sato S, Sanjo H, Hoshino K, Horiuchi T, Tomizawa H, Takeda K, Akira S., *Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway*. Nat Immunol, 2002(Feb;3(2):196-200. Epub 2002 Jan 22).
92. Bilu D, S.D., *Imiquimod: modes of action*. British Journal of Dermatology, 2003(149(Suppl. 66):5-8).
93. Krieg AM, Y.A., Matson S, Waldschmidt TJ, Bishop GA, Teasdale R, Koretzky GA, Klinman DM, *CpG motifs in bacterial DNA trigger direct B-cell activation*. Nature, 1995(374:546-9.).
94. Wiemann B, S.C., *Coley's toxins, tumor necrosis factor and cancer research: a historical perspective*. Pharmacol Ther., 1994(64(3):529-64.[Click here to read](#)).
95. Carpentier AF, C.L., Maltonti F, Delattre JY., *Oligodeoxynucleotides containing CpG motifs can induce rejection of a neuroblastoma in mice*. Cancer Res, 1999(59:5429-32).
96. Coley, W.B., *The treatment of malignant tumors by repeated inoculations of erysipelas with a report of ten original cases*. Am. J. Med. Sci., 1893(105, 487-511.).
97. Coley, W.B., *Treatment of inoperable malignant tumors with the toxins of erysipelas and the bacillus prodigiosus*. Am. J. Med. Sci., 1894(108, 183-212.).

98. Yamamoto T, Y.S., Kataoka T, Komuro K, Kohase M, Tokunaga T., *Synthetic oligonucleotides with certain palindromes stimulate interferon production of human peripheral blood lymphocytes in vitro*. Jpn J Cancer Res., 1994(Aug;85(8):775-9.).
99. Ballas ZK, R.W., Krieg AM., *Induction of NK Activity in Murine and Human Cells by CpG Motifs in Oligodeoxynucleotides and Bacterial DNA*. Journal of Immunology, 1996(1996; vol. 157:1840-1845.).
100. Klinman D M, Y.A.K., Beaucage S L, Conover J, and Krieg A M, *CpG motifs present in bacteria DNA rapidly induce lymphocytes to secrete interleukin 6, interleukin 12, and interferon gamma*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1996(April 2; 93(7): 2879-2883.).
101. JS Cowdery, J.C., AK Yi, AM Krieg -, *Bacterial DNA induces NK cells to produce IFN-g in vivo and increases the toxicity of lipopolysaccharides*. J. Immunol., 1996(156:4570.).
102. Anitescu M, C.J., Tuetken R, Yi AK, Berg DJ, Krieg AM, Cowdery JS., *Interleukin-10 functions in vitro and in vivo to inhibit bacterial DNA-induced secretion of interleukin-12*. J Interferon Cytokine Res., 1997(Dec;17(12):781-8).
103. Bird, *CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus*. Trends Genet., 1987 (3:342-347.).
104. Schwartz DA, Q.T., Thorne PS, Sayeed S, Yi AK, Krieg AM., *CpG motifs in bacterial DNA cause inflammation in the lower respiratory tract*. J.Clin.Invest., 1997(100: 68-73).
105. Krieg, A.M., Yi, A. K., Schorr, J. & Davis, H. L., *The role of CpG dinucleotides in DNA vaccines*. Trends in Microbiology, 1998b. (6, 23-27.).
106. Bauer S, K.C., Häcker H, Redecke V, Hausmann S, Akira S, Wagner H, Lipford GB., *Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition*. Proc Natl Acad Sci U S A., 2001(Jul 31;98(16):9237-42. Epub 2001 Jul 24).
107. Hemmi H, T.O., Kawai T, Kaisho T, Sato S, Sanjo H, Matsumoto M, Hoshino K, Wagner H, Takeda K, Akira S., *A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA*. Nature., 2000(Dec 7;408(6813):740-5.).
108. Latz E, V.A., Espevik T, Golenbock DT., *Mechanisms of TLR9 activation*. J Endotoxin Res., 2004(10(6):406-12.).
109. Heckelsmiller K, R.K., Beck S, Schlamp A, Seiderer J, Jahrsdörfer B, Krug A, Rothenfusser S, Endres S, Hartmann G., *Peritumoral CpG DNA elicits a coordinated response of CD8 T cells and innate effectors to cure established tumors in a murine colon carcinoma model*. J Immunol., 2002(Oct 1;169(7):3892-9.).

110. Hartmann G, K.A., *Mechanism and function of a newly identified CpG DNA motif in human primary B cells*. J Immunol., 2000(164(2): 944-53).
111. Löffler Georg, P.P.E., *Biochemie und Pathobiochemie*. 2003(7. Auflage).
112. T. Hirano, K.Y., H. Harada, T. Taga, Y. Watanabe, T. Matsuda, S. Kashiwamura, K. Nakajima, K. Koyama, A. Iwamatsu, S. Tsunasawa, F. Sakiyama, H. Matsui, Y. Takahara, T. Taniguchi and T. Kishimoto, *Complementary DNA for a novel human interleukin (BSF-2) that induces B lymphocytes to produce immunoglobulin*. Nature, 1986(324, 73 - 76 (06 November)).
113. Weissenbach J, C.Y., Zeevi M, Shulman L, Soreq H, Nir U, Wallach D, Perricaudet M, Tiollais P, Revel M., *Two interferon mRNAs in human fibroblasts: in vitro translation and Escherichia coli cloning studies*. Proc Natl Acad Sci U S A., 1980(Dec;77(12):7152-6).
114. Ritchie DG, F.G., *Hepatocyte-stimulating factor: a monocyte-derived acute-phase regulatory protein*. Ann N Y Acad Sci., 1983(Jun 27;408:490-502).
115. Le J, V.J., *Interleukin 6: A Multifunctional Cytokine regulating Immune Reactions and the Acute Phase Protein Response*. Lab Invest, 1989(61 (6): 588-602).
116. Snick, J.V., *Interleukin-6: An Overview*. Annu Rev Immunol, 1990(8:253-278).
117. Kishimoto. T., S.A., M. Narazaki., and T. Taga., *Interleukin-6 family of cytokines and gp130*. Blood, 1995. (86: 1243-1254.).
118. Gabay C, K.I., *Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation*. N Engl J Med, 199(340 (6): 448-454).
119. Heinrich PC, C.J., Andus T, *Interleukin-6 and the acute phase response*. Biochem J, 1990(265: 621-636).
120. Koj, A., *Initiation of acute phase response and synthesis of cytokines*. Biochim Biophys Acta, 1996(1317: 84-94).
121. Malle E, S.A., Raynes JG, *Serum amyloid A (SAA): an acute phase protein and apolipoprotein*. Atherosclerosis, 1993(102: 131-146).
122. Becker, C., M. C. Fantini, C. Schramm, H. A. Lehr, S. Wirtz, A. Nikolaev, J. Burg, S. Strand, R. Kiesslich, S. Huber, Ito H, Nishimoto N, Yoshizaki K, Kishimoto T, Galle PR, Blessing M, Rose-John S, Neurath MF., *TGF- β suppresses tumor progression in colon cancer by inhibition of IL-6 trans-signaling*. Immunity, 2004. (21: 491-501.).
123. Atreya, R., J. Mudter, S. Finotto, J. Müllberg, T. Jostock, S. Wirtz, M. Schütz, B. Bartsch, M. Holtmann, C. Becker, Strand D, Czaja J, Schlaak JF, Lehr HA, Autschbach F, Schürmann G, Nishimoto N, Yoshizaki K, Ito H, Kishimoto T, Galle PR, Rose-John S, Neurath MF., *Blockade of interleukin-6 trans signaling suppresses T-cell resistance against apoptosis in chronic intestinal inflammation:*

- evidence in Crohn's disease and experimental colitis in vivo.* Nat. Med., 2000.(6:583-588).
124. Xing, Z., J. Gauldie, G. Cox, H. Baumann, M. Jordana, X.-F. Lei, and M. K. Achong, *IL-6 is an anti-inflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses.* J. Clin. Invest., 1998(101: 311-320).
 125. Tilg. H., E.T., M. B. Atkins, C. A. Dinarello, and J. W. Mier., *Interleukin-6 (IL-6) as an anti-inflammatory cytokine: induction of circulating IL-1 receptor antagonist and soluble tumor necrosis factor receptor p55.* Blood, 1994.(83: 113-118).
 126. Jones, S., *Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6.* J Immunol., 2005(Sep 15;175(6):3463-8).
 127. Grütz, G., *New insights into the molecular mechanism of Interleukin-10-mediated immunosuppression.* Journal of Leukocyte Biology, 2005(Volume 77, January:3-15.).
 128. Fiorentino, D.F., Bond, M. W., Mosmann, T. R., *Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.* J. Exp. Med., 1989(170, 2081-2095.).
 129. Del Prete, G., De Carli, M., Almerigogna, F., Giudizi, M. G., Biagiotti, R., Romagnani, S., *Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production.* J. Immunol., 1993 (150, 353-360).
 130. Schroder, M., Meisel, C., Buhl, K., Profanter, N., Sievert, N., Volk, H. D., Grutz, G., *Different Modes of IL-10 and TGF- to inhibit cytokine-dependent IFN- production: consequences for reversal of lipopolysaccharide desensitization.* J. Immunol., 2003(170, 5260-5267).
 131. de Waal Malefyt, R., Haanen, J., Spits, H., Roncarolo, M. G., te Velde, A., Figdor, C., Johnson, K., Kastelein, R., Yssel, H., de Vries, J. E., *Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression.* J. Exp. Med., 1991(174, 915-924).
 132. Fiorentino, D.F., Zlotnik, A., Vieira, P., Mosmann, T. R., Howard, M., Moore, K. W., O'Garra, A. *(IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells.* J. Immunol., 1991(146, 3444-3451.).
 133. Asadullah, K., Sterry, W., Volk, H. D., *Interleukin-10 therapy-review of a new approach.* Pharmacol. Rev., 2003(55, 241-269).
 134. Nouri-Aria KT, D.S., *Regulatory T cells and allergic disease.* Inflamm Allergy Drug Targets., 2008(Dec;7(4):237-52.).

135. Susanne J. Szabo, A.S.D., Ueli Gubler and Kenneth M. Murphy, *Regulation of the Interleukin (IL)-12R beta 2 Subunit Expression in Developing T Helper 1 (Th1) and Th2 Cells*. J. Exp. Med., 1997(Volume 185, Number 5, March 3, 817-824).
136. Trinchieri Giorgio, P.S.a.K.R.A., *The IL-12 Family of Heterodimeric Minireview Cytokines: New Players in the Regulation of T Cell Responses*. Immunity, 2003(Vol. 19, 641-644, November).
137. MJ Robertson, R.S., SF Wolf, TJ Manley, C Donahue, D Young, SH Herrmann and J Ritz, *Response of human natural killer (NK) cells to NK cell stimulatory factor (NKSF): cytolytic activity and proliferation of NK cells are differentially regulated by NKSF*. Journal of Experimental Medicine, 2003(Vol 175, 779-788).
138. Maurice K. Gately, L.M.R., Jeanne Magram, Alvin S. Stern, Luciano Adorini, Ueli Gubler, and David H. Presky, *The Interleukin-12/Interleukin-12-receptor system: Role in Normal and Pathologic Immune Responses*. Annual Review of Immunology, 1998(Vol. 16: 495-521).
139. Guenova E, V.T., Sauer K, Kaesler S, Müller MR, Wölbing F, Chen K, Schwärzler C, Brossart P, Röcken M, Biedermann T., *IL-4-mediated fine tuning of IL-12p70 production by human DC*. Eur J Immunol., 2008 (Nov;38(11):3138-49).
140. Aste-Amezaga M, M.X., Sartori A, Trinchieri G., *Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10*. J Immunol., 1998 (Jun 15;160(12):5936-44).
141. Bright John J., D.C., Coon Michael, Sriram Subramaniam and Klaus Stephen J., *Prevention of Experimental Allergic Encephalomyelitis via Inhibition of IL-12 Signaling and IL-12-Mediated Th1 Differentiation: An Effect of the Novel Anti-Inflammatory Drug Lisofylline*. The Journal of Immunology, 1998(161: 7015-7022).
142. Cohen, J., *Clinical Trials: IL-12 Deaths: Explanation and a Puzzle*. Science, 1995(270, 908).
143. John P. Leonard, M.L.S., Gerald L. Fisher, Lynn J. Buchanan, Glenn Larsen, Michael B. Atkins, Jeffrey A. Sosman, Janice P. Dutcher, Nicholas J. Vogelzang, and John L. Ryan, *Effects of Single-Dose Interleukin-12 Exposure on Interleukin-12-Associated Toxicity and Interferon-gamma Production*. Blood, 1997(90, 2541-2548).
144. Portielje Johanna E., J.G., Heidi H. van Ojik, Gerrit Stoter, Wim H. Kruit, *IL-12: a promising adjuvant for cancer vaccination*. Cancer Immunology, Immunotherapy, 2003(Volume 52, Number 3).
145. Isaacs, A.L., J., *Virus interference. I. The interferon*. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957(147,258-67).

146. Donnelly Raymond P., S.F., Kotenko Sergei V. and Dickensheets Harold, *The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain*. *Journal of Leukocyte Biology*, 2004(Volume 76, August; 314-321).
147. Roberts, R.M., Liu, L., Guo, Q., Leaman, D. and Bixby, J., *The evolution of the type I interferons*. *J Interferon Cytokine Res.*, 1998(18, 805-16.).
148. LaFleur, D.W., Nardelli, B., Tsareva, T., Mather, D., Feng, P., Semenuk, M., Taylor, K., Buergin, M., Chinchilla, D., Roshke, V., Chen, G., Ruben, S. M., Pitha, P. M., Coleman, T. A. and Moore, P. A., *Interferon-kappa, a novel type I interferon expressed in human keratinocytes*. *J Biol Chem*, 2001(276, 39765-71).
149. Pestka, S., Krause, C. D. and Walter, M. R., *Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors*. *Immunol Rev*, 2004(202, 8-32).
150. Takaoka, A.a.Y., H., *Interferon signalling network in innate defence*. *Cell Microbiol*, 2006(8, 907-22.).
151. Kojiro Sato, S.H., Hiroshi Takayanagi, Taeko Yokochi, Nobuhiko Kayagaki, Kazuyoshi Takeda, Hideo Yagita, Ko Okumura, Nobuyuki Tanaka, Tadatsugu Taniguchi, Kouetsu Ogasawara, *Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN- γ* . *Eur. J. Immunol.*, 2001(31: 3138-3146).
152. Farrar, M.A.a.S., R. D., *The Molecular Cell Biology of Interferon-Gamma and Its Receptor*. *Annu Rev Immunol*, 1993(11: 571-611.).
153. Zoon, K.C., Miller, D., Bekisz, J., zur Nedden, D., Enterline, J. C., Nguyen, N. Y. and Hu, R. Q., *Purification and Characterization of Multiple Components of Human Lymphoblastoid Interferon-Alpha*. *J Biol Chem*, 1992(267: 15210-15216.).
154. Lutfalla, G., Gardiner, K., Proudnon, D., Vielh, E. and Uze, G., *The Structure of the Human Interferon Alpha/Beta Receptor Gene*. *J Biol Chem*, 1992(267: 2802-2809.).
155. Sen, G.C., *Viruses and interferons*. *Annu Rev Microbiol*, 2001(55, 255-81.).
156. Vilcek, J.a.S., G. C., *In: Fields Virology, Ed.: Bn Fields, Dm Knipe, Pm Howley*. Philadelphia: Lippincott-Raven., 1996(3rd ed.: 4792-4796.).
157. Malmgaard, L., *Induction and regulation of IFNs during viral infections*. *J Interferon Cytokine Res.*, 2004(24, 439-54.).
158. Takeda, K.A., S., *Toll-like receptors in innate immunity*. *Int Immunol*, 2005(17, 1-14.).
159. Janeway C.A., T.P., Walport M., Shlomik M., *Immunologie*. 2002(5. Auflage).
160. Sallusto F, S.P., Loetscher P, Schaniel C, Lenig D, Mackay CR, Qin S, Lanzavecchia A., *Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation*. *Eur J Immunol*, 1998(28, 2760-2769.).

161. Caux C, A.-Y.S., Chemin K, de Bouteiller O, Dieu-Nosjean MC, Homey B, Massacrier C, Vanbervliet B, Zlotnik A, Vicari, *Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines*. Molecular Vision, 2000(22:345-69).
162. Randolph GJ, A.V., Swartz MA., *Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels*. Nat Rev Immunol, 2005(5:617-28).
163. Jin Y, S.L., Chong EM, Hamrah P, Zhang Q, Chen L, Dana MR., *The chemokine receptor CCR7 mediates corneal antigen-presenting cell trafficking*. Mol Vis., 2007(Apr 27;13:626-34.).
164. Banchereau J, B.F., Blanchard D, Brière F, Galizzi JP, van Kooten C, Liu YJ, Rousset F, Saeland S., *The CD40 antigen and its ligand*. Annu Rev Immunol., 1994(12:881-922.).
165. Reinwald S, W.C., Westendorf AM, Breloer M, Probst-Kepper M, Fleischer B, Steinkasserer A, Buer J, Hansen W, *CD83 Expression in CD4+ T Cells Modulates Inflammation and Autoimmunity*. J Immunol., 2008(May 1;180(9):5890-7.).
166. Breloer M, F.B., *CD83 regulates lymphocyte maturation, activation and homeostasis*. Trends Immunol., 2008(Apr;29(4):186-94. Epub 2008 Mar 7.).
167. Novak N, B.T., *Pathogenesis of atopic eczema*. J Dtsch Dermatol Ges., 2005 (Dec;3(12):994-1004; quiz 1005-6. Links).
168. Ra, C., Jouvin, M. H., Blank, U., Kinet, J. P., *A macrophage Fc gamma receptor and the mast cell receptor for IgE share an identical subunit*. Nature, 1989(341:752 - 754).
169. Kinet, J.-P., *The high affinity IgE receptor (FcεRI): From physiology to pathology*. Annu. Rev. Immunol., 1999(17:931 - 972).
170. Gounni, A.S., Lamkhioed, B., Ochiai, K., Tanaka Y., Delaporte E., Capron, A., Kinet, J. P., Capron, M., *High-affinity IgE receptor on eosinophils is involved in defence against parasites*. Nature, 1994(367:183 - 186).
171. Gounni, A.S., Lamkhioed, B., Koussih, L., Ra, C., Renzi, P. M., Hamid, Q., *Human neutrophils express the high-affinity receptor for immunoglobuline E (FcεRI): role for asthma*. FASEB J., 2001(15:940 - 949).
172. Bieber, T., *Fc Epsilon RI on human epidermal Langerhans cells: An old receptor with new structure and functions*. Int. Arch. Allergy Immunol., 1997(113:30 - 34).
173. Hendrik Jan de Heer, H.H., Thomas Soullié, Daniëlle Hijdra, Nanda Vos, Monique A.M. Willart, Henk C. Hoogsteden, and Bart N. Lambrecht, *Essential Role of Lung Plasmacytoid Dendritic Cells in Preventing Asthmatic Reactions to Harmless Inhaled Antigen*. JEM, 2004(Volume 200, Number 1, 89-98).
174. Huger, M., *Einfluß von Pollenextrakten auf Effektorfunktionen von neutrophilen Granulozyten unter besonderer Berücksichtigung des Effektes von Desloratadin*.

- Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin, 2005.
175. Drenckhahn D., Z.W., *Benninghoff Anatomie*. 1994.
 176. Wikipedia, 2009.
 177. Randolph GJ, S.-S.G., Liebman RM, Schäkel K., *The CD16(+) (FcγRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting*. J Exp Med., 2002(Aug 19;196(4):517-27. Erratum in: J Exp Med 2002 Sep 16;196(6):869).
 178. Gilles S., M.V., Bryce M., Mueller J.M., Ring J., Jakob T., Pastore S., Behrendt H., Traidl-Hoffmann C, *Pollen derived E₁ Phytoprostanes inhibit NF-κB signaling*. 2008.
 179. Schakel, K., et al., *Human 6-sulfo LacNAc-expressing dendritic cells are principal producers of early interleukin-12 and are controlled by erythrocytes*. Immunity, 2006. **24**(6): p. 767-77.
 180. Biedermann T, Z.S., Himmelrich H, Gumy A, Egeter O, Sakrauski AK, et al., *IL-4 instructs TH1 responses and resistance to Leishmania major in susceptible BALB/c mice*. Nat Immunol, 2001(2:1054-60).
 181. Harizi H, G.N., *Pivotal role of PGE2 and IL-10 in the cross-regulation of dendritic cell-derived inflammatory mediators*. Cell Mol Immunol, 2006. **3:271-7**.
 182. Chan A, B.M., Mercer AA, Fleming SB., *Maturation and function of human dendritic cells are inhibited by orf virus-encoded interleukin-10*. J Gen Virol, 2006. **87:3177-81**.
 183. Cavanagh LL, B.A., Smith L, Padmanabha J, Filgueira L, Pietschmann P, Thomas R., *Rheumatoid arthritis synovium contains plasmacytoid dendritic cells*. Arthritis Res Ther, 2005;(7:R230-40.).
 184. Ronnblom L, A.G., *Systemic lupus erythematosus and the type I interferon system*. Arthritis Res Ther, 2003(5:68-75.).
 185. Nestle FO, C.C., Tun-Kyi A et al., *Plasmacytoid predendritic cells initiate psoriasis through interferon-alpha production*. J Exp Med, 2005; (202:135-43.).
 186. Novak N, P.W., Yu C., *Network of myeloid and plasmacytoid dendritic cells in atopic dermatitis*. Adv Exp Med Biol., 2007. **601:97-104**.
 187. Jain VV, K.K., Businga T, Hussain I, George C, O'shaughnessy P, Kline JN., *CpG-oligodeoxynucleotides inhibit airway remodeling in a murine model of chronic asthma*. J Allergy Clin Immunol., 2002. **Dec;110(6):867-72**.
 188. Tighe H, T.K., Schwartz D, Marsden R, Beck L, Corbeil J, et al., *Conjugation of protein to immunostimulatory DNA results in a rapid, long-lasting and potent induction of cell-mediated and humoral immunity*. Eur J Immunol, 2000;(30:1939-47.).

189. Terhorst D, K.B., Weidinger S, Illig T, Novak N, Ring J, et al., *Monocyte-derived dendritic cells from highly atopic individuals are not impaired in their pro-inflammatory response to toll-like receptor ligands*. Clin Exp Allergy, 2007(37:381-90.).
190. Sa-Nunes A, B.A., Lucas DA, Conrads TP, Veenstra TD, Andersen JF, et al., *Prostaglandin E2 is a major inhibitor of dendritic cell maturation and function in Ixodes scapularis saliva*. J Immunol, 2007(179:1497-505).
191. Szatmari I, R.E., Nagy L., *PPARgamma, a lipid-activated transcription factor as a regulator of dendritic cell function*. Ann N Y Acad Sci, 2006. **1088:207-18**.
192. Harizi H, G.C., Gualde N., *Prostaglandin E2 modulates dendritic cell function via EP2 and EP4 receptor subtypes*. J Leukoc Biol, 2003(73:756-63.).
193. Martino, A., *Sphingosine 1-phosphate as a novel immune regulator of dendritic cells*. J Biosci, 2003(32:1207-12.).
194. Bluml S, K.S., Bochkov VN, Kronke G, Stuhlmeier K, Majdic O, et al., *Oxidized phospholipids negatively regulate dendritic cell maturation induced by TLRs and CD40*. J Immunol, 2005(175:501-8.).
195. Harizi H, G.N., *Dendritic cells produce eicosanoids, which modulate generation and functions of antigen-presenting cells*. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids, 2002. **66:459-66**.
196. Ade N, A.D., Kerdine-Romer S, Boisleve F, Rousset F, Pallardy M., *NF-kappaB plays a major role in the maturation of human dendritic cells induced by NiSO(4) but not by DNCB*. Toxicol Sci, 2007(99:488-501.).
197. Hernandez A, B.M., Blomberg BB, Ross WA, Gaynor JJ, Lindner I, et al., *Inhibition of NF-kappa B during human dendritic cell differentiation generates anergy and regulatory T-cell activity for one but not two human leukocyte antigen DR mismatches*. Hum Immunol, 2007(68:715-29.).
198. Iruretagoyena MI, S.S., Lezana JP, Hermoso M, Bronfman M, Gutierrez MA, et al., *Inhibition of nuclear factor-kappa B enhances the capacity of immature dendritic cells to induce antigen-specific tolerance in experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Pharmacol Exp Ther, 2006(318:59-67.).
199. Klotz L, D.I., Edenhofer F, Nolden L, Evert B, Paul B, et al., *Peroxisome proliferator-activated receptor gamma control of dendritic cell function contributes to development of CD4+ T cell anergy*. J Immunol, 2007(178:2122-31.).
200. Gutermuth J, B.M., Traidl-Hoffmann C, Ring J, Mueller MJ, Behrendt H, Jakob T., *Immunomodulatory effects of aqueous birch pollen extracts and phytoprostanes on primary immune responses in vivo*. J Allergy Clin Immunol., 2007(Aug;120(2):293-9. Epub 2007 Apr 23.).

201. Kim GY, K.K., Lee SH, Yoon MS, Lee HJ, Moon DO, et al., *Curcumin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: MAPKs and translocation of NF-kappa B as potential targets*. J Immunol, 2005(174:8116-24.).
202. Lee JS, J.I., Jeong YI, Lee CM, Shin YK, Lee SY, et al., *D-pinitol inhibits Th1 polarization via the suppression of dendritic cells*. Int Immunopharmacol, 2007(7:791-804.).
203. Lee JS, K.S., Kim HK, Lee TH, Jeong YI, Lee CM, et al., *Silibinin polarizes Th1/Th2 immune responses through the inhibition of immunostimulatory function of dendritic cells*. J Cell Physiol, 2007(210:385-97.).
204. Yoon MS, L.J., Choi BM, Jeong YI, Lee CM, Park JH, et al., *Apigenin inhibits immunostimulatory function of dendritic cells: Implication of immunotherapeutic adjuvant*. Mol Pharmacol, 2006(70:1033-44.).
205. Lin YL, L.Y., Lee SS, Chiang BL., *Polysaccharide purified from Ganoderma lucidum induced activation and maturation of human monocyte-derived dendritic cells by the NF-kappaB and p38 mitogen-activated protein kinase pathways*. J Leukoc Biol, 2005(78:533-43.).
206. la Sala A, F.D., Di Virgilio F, Idzko M, Norgauer J, Girolomoni G., *Alerting and tuning the immune response by extracellular nucleotides*. J Leukoc Biol., 2003. **Mar;73(3):339-43.**
207. Haskó G, C.B., *Trends Immunol*. Adenosine: an endogenous regulator of innate immunity., 2004. **Jan;25(1):33-9.**
208. Flach TL, P.W., Chau EM, Desrosiers MD, Shi Y., *Adenosine primes resting stage dendritic cells before their activation*. Biochem Biophys Res Commun., 2009(Mar 20;380(4):748-51. Epub 2009 Jan 24).
209. Desrosiers MD, C.K., Fakir MJ, Stephens LA, Jama FM, Shameli A, Mehal WZ, Santamaria P, Shi Y., *Adenosine deamination sustains dendritic cell activation in inflammation*. J Immunol., 2007(Aug 1;179(3):1884-92.).
210. Willart MA, L.B., *The danger within: endogenous danger signals, atopy and asthma*. Clin Exp Allergy., 2009.
211. Yu D, P.M., Lakshmi B, Dai M, Wang D, Trombino AF, Sullivan T, Kandimalla ER, Agrawal S, *Impact of secondary structure of Toll-like receptor 9 agonists on interferon- α induction*. Antimicrob Agents Chemother., 2008(Oct 13.).

V Danksagung

Ich möchte mich bei all denen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Frau Prof. Dr. med. Heidrun Behrendt, Leiterin des Zentrums Allergie und Umwelt an der Klinik und Poliklinik für Dermatologie und Allergologie am Biederstein der Technischen Universität München, möchte ich für die Möglichkeit an ihrem Institut zu forschen, herzlich danken.

Mein spezieller Dank gebührt Frau apl. Prof. Dr. med. Claudia Traidl-Hoffmann für die Überlassung des Themas. Nur durch ihre außerordentliche Unterstützung und Betreuung konnte diese Arbeit verwirklicht werden.

Von unschätzbarem Wert war die Betreuung durch Frau Dr. rer. biol. hum. Stefanie Gilles. Sie hatte stets ein offenes Ohr für mich. Ihre Geduld und ihre wertvollen fachlichen Hinweise während der ganzen Arbeit waren beeindruckend. Ihre engagierte und ausdauernde Betreuung während sämtlichen Arbeitsabschnitten waren überragend und haben entscheidend zum erfolgreichen Abschluss dieser Arbeit beigetragen.

Weiterhin möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Zentrums Allergie und Umwelt für die gute Zusammenarbeit im Labor bedanken.

Mein Dank gebührt meinen Eltern und meinen Geschwistern, Lynn und Steve, für die Ermöglichung des Studiums und für die stetige Unterstützung in jeglicher Hinsicht. Nicht zuletzt möchte ich mich bei meiner Freundin, Carole Molitor, bedanken. Carole, vielen Dank für deinen mentalen Beistand, deine Geduld und dein Verständnis während der Arbeit an der Dissertation.

VI Lebenslauf

Dan Jacoby

Marianne-Brandt-Strasse 21

80807 München

E-mail: jacobydan_at_gmx.de

Persönliches

Geburtsdatum/-ort: 29. Januar 1982 in Ettelbruck (Luxemburg)

Familienstand: ledig

Ausbildung

1986-1994 Grundschule in Mondercange (Luxemburg)

1994-1997 Gymnasium Lycée Hubert Clement in Esch-sur-Alzette, (Luxemburg)

1997-2001 Gymnasium Lycée de Garçons d'Esch-sur-Alzette (Luxemburg)

2001-2002 Studium der Humanmedizin auf den Cours universitaires in Luxemburg

2002-2004 Studium der Humanmedizin (Vorklinik) an der Ludwig Maximilians Universität München

September 2004 Ärztliche Vorprüfung

Oktober 2004 - November 2008 Klinisches Studium an der Technischen Universität München

November 2008 Abschluss des Medzinstudiums (2. Staatsexamen)

Seit Januar 2009 Assistenzarzt (Klinik und Poliklinik für Frauenheilkunde und Geburtshilfe, Klinikum Grosshadern, Prof. Dr. K. Friese)

Famulaturen

März 2005 Neurochirurgie (Singapore General Hospital, Singapore, Dr. John Thomas)

September 2005 Chirurgie (Centre hospitalier Emil Mayrisch, Esch-sur-Alzette, Luxemburg, PD Dr. Nikolaus Zügel)

März 2006 Innere Medizin (Centre hospitalier universitaire, Pointe-à-Pitre, Guadeloupe, Dr. Jean-Paul Donnet)

März 2007 Notfallmedizin (Redcliffe Hospital, Redcliffe, Australia, Dr. Doug Morel)

Praktisches Jahr

August 2007 – Dezember 2007 Innere Medizin (Deutsches Herzzentrum München, Prof. Dr. A. Schömig)

Dezember 2007 – April 2008 Chirurgie (Centre hospitalier de Luxembourg, Prof. Dr. J.S. Azagra)

April 2008-Juli 2008 Gynäkologie (Frauenklinik und Polyklinik der Technischen Universität München, Prof. Dr. M. Kiechle)

VII Anhang

Daten zu Abbildung 10:

slanDC	Interleukin-6	Überleben	Interleukin-12	Überleben
Medium	1,11 ± 1,11	44,63 ± 6,95	1,23 ± 1,35	44,63 ± 6,95
LPS	100 ± 0,00	40,38 ± 5,83	100 ± 0,00	40,00 ± 3,84
APE 0.3mg/mL	1,08 ± 0,99	38,30 ± 3,22	0,88 ± 0,28	40,38 ± 5,83
APE 1.0mg/mL	1,23 ± 1,06	37,56 ± 5,58	0,33 ± 0,16	38,30 ± 3,22
APE 3.0mg/mL	1,00 ± 0,89	40,00 ± 3,84	0,00 ± 0,00	37,56 ± 4,58
LPS + APE 0,3mg/ml	96,63 ± 0,00	33,50 ± 9,77	47,83 ± 12,85	33,50 ± 9,77
LPS + APE 1mg/ml	99,54 ± 0,00	37,15 ± 8,57	20,15 ± 8,17	37,15 ± 8,57
LPS + APE 3mg/ml	85,93 ± 0,00	41,07 ± 5,20	7,02 ± 2,52	41,07 ± 5,20
PPE1 10-7	0,33 ± 0,13	48,57 ± 6,88	0,00 ± 0,00	44,63 ± 6,95
PPE1 3x10-7	0,02 ± 0,01	46,56 ± 3,43	0,00 ± 0,00	48,57 ± 6,88
PPE1 10-6	0,00 ± 0,00	44,55 ± 5,12	0,00 ± 0,00	46,56 ± 3,43
PPE1 3x10-6	0,00 ± 0,00	42,75 ± 5,56	0,00 ± 0,00	44,55 ± 5,12
PPE1 10-5	0,00 ± 0,00	41,68 ± 6,09	0,00 ± 0,00	42,75 ± 5,56
LPS + PPE1 10-7	109,31 ± 10,04	44,04 ± 5,64	125,91 ± 15,46	44,04 ± 5,64
LPS + PPE1 3x10-7	121,81 ± 11,60	38,09 ± 3,92	106,73 ± 14,07	38,09 ± 3,92
LPS + PPE1 10-6	88,66 ± 12,67	44,16 ± 6,48	74,31 ± 18,66	44,16 ± 6,48
LPS + PPE1 3x10-6	65,70 ± 14,30	46,26 ± 7,90	35,18 ± 11,51	46,26 ± 7,90
LPS + PPE1 10-5	18,50 ± 6,65	43,23 ± 7,39	9,19 ± 5,56	43,23 ± 7,39

Daten zu Abbildung 11:

slanDC	CD80	CD83	CD40	CCR-7
0h	3,32 ± 0,89	4,90 ± 0,94	11,95 ± 6,90	16,55 ± 13,09
Medium	12,04 ± 3,11	17,70 ± 6,11	12,94 ± 3,06	8,68 ± 0,98
LPS	66,16 ± 17,08	71,57 ± 8,44	42,46 ± 6,03	18,81 ± 3,32
APE	11,53 ± 3,20	12,29 ± 1,37	12,50 ± 4,19	9,17 ± 1,06
LPS + APE	31,54 ± 9,10	32,53 ± 4,98	19,33 ± 5,06	12,00 ± 1,50
PPE1	53,29 ± 26,64	88,31 ± 106,06	19,09 ± 7,23	10,39 ± 2,70
LPS + PPE1	65,86 ± 32,93	54,67 ± 10,72	42,87 ± 8,48	16,13 ± 2,65
PPF1	17,10 ± 3,02	30,88 ± 15,44	9,717 ± 0,69	10,76 ± 0,96
LPS + PPF1	65,31 ± 7,48	102,52 ± 51,26	28,06 ± 3,39	21,06 ± 4,57

Daten zu Abbildung 12:

slanDC	CD86	HLA-DR	CD 206	FcεRI
0h	37,11 ± 6,92	88,07 ± 8,42	6,25 ± 0,32	13,54 ± 1,28
Medium	122,43 ± 27,29	238,50 ± 35,46	11,62 ± 1,20	24,40 ± 2,63
LPS	117,67 ± 21,98	229,94 ± 44,42	14,40 ± 1,18	26,82 ± 3,11
APE	106,35 ± 18,08	192,53 ± 29,80	14,94 ± 1,30	30,88 ± 6,73
LPS + APE	91,56 ± 19,50	205,84 ± 32,75	16,22 ± 2,92	26,48 ± 3,73
PPE1	66,06 ± 9,64	184,87 ± 19,31	12,59 ± 1,09	29,20 ± 8,84
LPS + PPE1	66,98 ± 7,41	153,02 ± 26,45	16,95 ± 1,42	24,62 ± 2,59
PPF1	188,53 ± 16,78	309,54 ± 55,34		
LPS + PPF1	204,29 ± 25,99	436,47 ± 188,94		

Daten zu Abbildung 13:

slanDC	CD80	CD83	CD40	CCR-7
Medium	59,86	52,69	49,03	14,03
LPS + APE 0,3mg/ml	51,64	38,42	37,56	13,87
LPS + APE 1,0mg/ml	39,2	31,87	28,67	10,10
LPS + APE 3,0mg/ml	18,42	23,91	16,81	6,94

Daten zu Abbildung 14:

slanDC	CD80	CD83	CD40	CCR-7
Medium	12,04 ± 2,53	17,70 ± 6,11	12,94 ± 3,06	8,68 ± 0,98
LPS	66,16 ± 4,75	71,57 ± 8,44	42,46 ± 6,03	18,81 ± 3,32
LPS + APE 3,0mg/ml	31,54 ± 7,48	32,53 ± 4,99	19,33 ± 5,06	12,00 ± 1,50
LPS + APE + Proteinase K	26,76 ± 14,35	44,96 ± 9,16	11,07 ± 4,55	13,81 ± 2,66

Daten zu Abbildung 15:

slanDC	CD80	CD83	CD40	CCR-7
Medium 0h	2,37 ± 1,51	3,39 ± 1,65	5,37 ± 1,67	4,70 ± 1,44
Medium 24h	38,42 ± 3,65	36,20 ± 2,51	18,96 ± 2,76	13,90 ± 1,66
APE	27,38 ± 2,76	29,14 ± 5,43	11,39 ± 4,22	12,30 ± 2,26
APE Konzentrat	13,59 ± 5,55	39,52 ± 14,88	8,21 ± 2,30	11,30 ± 2,40
APE Filtrat	17,52 ± 1,91	22,54 ± 3,05	7,56 ± 2,27	10,12 ± 2,15
LPS	50,12 ± 1,87	44,95 ± 9,08	25,02 ± 5,02	16,58 ± 2,20
LPS + APE	31,20 ± 1,71	40,16 ± 6,89	13,26 ± 4,36	14,36 ± 2,34
LPS + APE Konzentrat	18,80 ± 12,59	42,85 ± 6,93	11,2 ± 1,56	13,16 ± 1,73
LPS + APE Filtrat	16,89 ± 6,13	26,00 ± 4,15	9,14 ± 3,74	11,20 ± 1,64

Daten zu Abbildung 16:

MDC	Interleukin-6	Überleben	Interleukin-12	Überleben
Medium	5,06 ± 2,40	127,01 ± 18,71	0,58 ± 0,19	123,85 ± 20,26
LPS + R-848	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00	100,00 ± 0,00
LPS + R-848 + APE 0,1mg/ml	101,61 ± 4,92	101,33 ± 12,40	106,11 ± 11,12	118,93 ± 13,66
LPS + R-848 + APE 0,3mg/ml	102,84 ± 2,13	113,12 ± 6,91	101,47 ± 11,25	119,30 ± 14,92
LPS + R-848 + APE 1mg/ml	102,67 ± 4,48	108,06 ± 9,79	55,67 ± 11,01	127,33 ± 9,70
LPS + R-848 + APE 3mg/ml	103,88 ± 5,76	103,44 ± 7,88	30,68 ± 10,90	114,30 ± 6,87
LPS + R-848 + APE 10mg/ml	109,01 ± 16,25	74,43 ± 15,28	8,66 ± 2,11	99,45 ± 11,82
LPS + R-848 + PPE1 10-9M			105,65 ± 1,35	101,18 ± 12,18
LPS + R-848 + PPE1 3x10-9M			104,65 ± 5,86	106,53 ± 4,36
LPS + R-848 + PPE1 10-8M	96,82 ± 9,87	99,71 ± 2,90	117,83 ± 6,43	98,70 ± 8,20
LPS + R-848 + PPE1 3x10-8M	101,32 ± 9,79	106,90 ± 4,94	122,33 ± 51,66	96,25 ± 5,99
LPS + R-848 + PPE1 10-7M	115,28 ± 10,40	111,58 ± 4,22	94,66 ± 17,28	100,15 ± 1,90
LPS + R-848 + PPE1 3x10-7M	112,11 ± 9,72	101,43 ± 4,74	94,29 ± 13,12	109,55 ± 8,51
LPS + R-848 + PPE1 10-6M	105,77 ± 13,58	107,06 ± 11,87	99,10 ± 10,45	101,75 ± 10,53
LPS + R-848 + PPE1 3x10-6M	90,76 ± 12,68	133,55 ± 27,16	99,83 ± 9,19	111,78 ± 4,09

Daten zu Abbildung 17:

MDC	CD80	CD83	CD40	CCR-7	CD86	HLA-DR
0h	2,13 ± 0,57	7,00 ± 1,94	2,28 ± 1,14	248,63 ± 124,32	24,97 ± 6,6,7	14,34 ± 7,17
Medium	13,58 ± 3,51	58,81 ± 15,19	9,02 ± 4,51	626,25 ± 313,12	209,16 ± 54,00	9,96 ± 4,98
LPS	53,74 ± 13,88	67,53 ± 17,44	18,80 ± 9,40	999,06 ± 499,53	507,39 ± 130,99	12,62 ± 6,31
APE	8,86 ± 2,46	57,77 ± 16,02	8,30 ± 4,15	659,66 ± 329,83	202,19 ± 56,08	8,16 ± 4,08
LPS + APE	26,82 ± 7,74	32,61 ± 9,41	15,00 ± 7,50	891,54 ± 445,77	309,00 ± 89,20	11,19 ± 5,59
R-848	43,25 ± 21,62	33,45 ± 16,72	23,69 ± 11,84	887,03 ± 443,52	313,94 ± 156,97	14,08 ± 7,04
LPS + R-848	43,70 ± 21,85	67,58 ± 33,79	44,88 ± 22,44	750,61 ± 375,30	257,06 ± 128,53	13,67 ± 6,83
PPE1	5,57 ± 2,79	43,76 ± 21,88	5,49 ± 2,74	367,71 ± 183,86	69,48 ± 34,74	8,83 ± 4,42
LPS + PPE1	38,67 ± 19,33	22,23 ± 11,12	10,24 ± 5,12	532,46 ± 266,23	310,31 ± 155,16	16,09 ± 8,05
R-848 + PPE1	30,54 ± 15,27	70,55 ± 35,27	10,54 ± 5,27	633,49 ± 316,74	178,22 ± 89,11	12,82 ± 6,41
R-848 + LPS + APE	29,02 ± 14,51	66,86 ± 33,43	26,75 ± 13,37	553,51 ± 276,76	220,98 ± 110,49	15,03 ± 7,52
R-848 + LPS + PPE1	45,00 ± 22,50	35,09 ± 17,55	30,86 ± 15,43	486,84 ± 243,42	185,17 ± 92,59	17,02 ± 8,51
R-848 + APE	20,94 ± 10,47	40,05 ± 20,03	12,82 ± 6,41	546,34 ± 273,17	218,69 ± 109,35	12,36 ± 6,18

Daten zu Abbildung 19:

PDC	Interferon α	Überleben
Medium	0,00 ± 0,00	101,40 ± 11,61
CpG-A	100 ± 0,00	100 ± 0,00
CpG-A + APE 0,1mg/ml	72,40 ± 0,00	103,00 ± 0,00
CpG-A + APE 0,3mg/ml	87,37 ± 26,34	97,81 ± 1,52
CpG-A + APE 1mg/ml	51,85 ± 18,59	85,74 ± 8,47
CpG-A + APE 3mg/ml	4,58 ± 2,36	65,34 ± 2,14

Daten zu Abbildung 20:

PDC	Interferon α	Überleben	Interferon α	Überleben	Interferon α	Überleben
Medium	0,24 ± 0,22	102,55 ± 5,71	0,040889489	92,9	0	96,7
CpG-A	100 ± 0,00	100 ± 0,00	100	100	100	100
CpG-A + PPE1 10-8M	193,66 ± 26,75	100,04 ± 3,51			98,28822316	92
CpG-A + PPE1 3x10-8M	127,37 ± 17,22	97,83 ± 2,47	59,32974531	87,2		108
CpG-A + PPE1 10-7M	116,10 ± 9,55	98,07 ± 1,98	17,8045218	70,8	73,65852708	103
CpG-A + PPE1 3x10-7M	125,30 ± 33,44	99,87 ± 4,29	0,910756801	22,3	23,33536883	97
CpG-A + PPE1 10-6M	107,41 ± 0,00	101,8 ± 0,00	0,075851103	9,7	0	
CpG-A + PPE1 3x10-6M						
CpG-A + PPE1 10-5M			0,077316356	4,3		

Darten zu Abbildung 21:

PDC	CD80	CD83	CD40	CCR-7	CD86	HLA-DR
0h	1,67 ± 0,43	2,83 ± 0,79	1,77 ± 0,47	2,77 ± 0,07	5,84 ± 0,50	83,38 ± 9,96
Medium	12,88 ± 3,33	11,04 ± 2,85	5,71 ± 1,47	6,87 ± 0,15	25,90 ± 2,71	244,82 ± 23,32
CpG-B 1µM	103,97 ± 26,84	34,98 ± 9,03	11,80 ± 3,05	13,04 ± 0,57	117,40 ± 10,38	283,41 ± 23,75
APE	19,46 ± 5,40	12,85 ± 3,57	4,86 ± 1,35	7,40 ± 0,46	73,97 ± 11,13	251,17 ± 28,43
CpG + APE	32,19 ± 9,29	15,94 ± 4,60	7,41 ± 2,14	10,09 ± 0,58	93,46 ± 11,54	222,88 ± 34,62
PPE1	13,54 ± 3,91	11,04 ± 3,19	5,60 ± 1,62	7,20 ± 0,17	26,81 ± 4,56	277,84 ± 41,37
CpG + PPE1	71,39 ± 20,61	27,06 ± 7,81	8,66 ± 2,50	12,36 ± 0,60	94,08 ± 19,10	270,15 ± 57,84

