



Aus dem **Forschungszentrum Borstel**

Leibniz - Zentrum für Medizin und Biowissenschaften

Laborgruppe Immuntherapie (PD Dr. Sven Brandau)

Abteilung Immunologie und Zellbiologie

Direktorin: Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus

---

# **Immunmodulierende Effekte von Plättchenfaktor 4 auf die Differenzierung und Funktion Antigen-präsentierender Zellen**

## **Inauguraldissertation**

zur Erlangung der Doktorwürde

der Technisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät

der Universität zu Lübeck

vorgelegt von

**Daniell Mitchell**

aus Hamburg

Lübeck 2005

**„Du gleichst dem Geist, den Du begreifst. Nicht mir!“**  
(der Geist zu Dr. Faust)

Johann W. v. Goethe, 1806

Abgabedatum: 19. Oktober 2005  
Erstgutachter: Prof. Dr. J. Westermann  
Zweitgutachter: PD Dr. S. Brandau

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>6</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>9</b>
<b>1.1 Dendritische Zellen</b> .....	<b>10</b>
1.1.1 Immunbiologie dendritischer Zellen.....	10
1.1.2 Heterogenität der Subpopulationen dendritischer Zellen .....	11
1.1.3 Funktionelle Plastizität dendritischer Zellen .....	13
<b>1.2 Immunregulatorische Funktionen von Thrombozyten</b> .....	<b>15</b>
<b>1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit</b> .....	<b>17</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>18</b>
<b>2.1 Material</b> .....	<b>18</b>
2.1.1 Chemikalien und Lösungen sowie ihre Bezugsquellen.....	18
2.1.2 Puffer und Kulturmedien.....	18
2.1.3 Puffer für immunzytochemische Färbetechniken.....	19
2.1.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie.....	19
2.1.5 Antikörper für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie .....	20
2.1.6 Antikörper für Western-blot-Analysen.....	20
2.1.7 Wachstumsfaktoren und Stimuli .....	21
2.1.8 cDNA Microarrays .....	22
2.1.9 Kits .....	22
2.1.10 Instrumente und Geräte.....	22
2.1.11 Sonstiges.....	23
<b>2.2 Zellbiologische Methoden</b> .....	<b>23</b>
2.2.1 Isolierung humaner MNC aus peripherem Blut.....	23
2.2.2 Auftrennung humaner MNC in Monozyten und Lymphozyten .....	23
2.2.3 Isolierung humaner CD3 <sup>+</sup> T-Zellen mit dem MACS T Cell Isolation Kit .....	24
2.2.4 Isolierung humaner CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> T-Zellen mit dem MACS naive T Cell Isolation Kit.....	24
2.2.5 Isolierung humaner CD1c <sup>+</sup> BDC mit dem MACS CD1c (BDCA-1) DC Isolation Kit.....	24
2.2.6 Isolierung humaner CD56 <sup>+</sup> NK-Zellen mit dem MACS NK Cell Isolation Kit II.....	25
2.2.7 Differenzierung konventioneller dendritischer Zellen (MoDC) .....	25
2.2.8 Generierung von PF-4-differenzierten Antigen-präsentierenden Zellen (PFAPC).....	26
2.2.9 Differenzierung von Makrophagen (MΦ) .....	26
2.2.10 Humane Tumorzelllinien K562 und T24 .....	26
<b>2.3 APC-Stimulation und Experimente zur Zellfunktion</b> .....	<b>27</b>
2.3.1 Stimulation von MoDC und PFAPC.....	27
2.3.2 Stimulation von CD1c <sup>+</sup> BDC.....	27
2.3.3 Phagozytose-Assay .....	27
2.3.4 Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite .....	28
2.3.5 Gemischte Leukozytenreaktion (MLR).....	28

2.3.6 Antigenpräsentations-Assay (AG-Assay) .....	28
2.3.7 DC-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen (DAK-Assay) .....	29
<b>2.4 Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>29</b>
2.4.1 RNA Isolation .....	29
2.4.2 cDNA Synthese .....	30
2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) und quantitative PCR .....	30
2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese .....	32
2.4.5 cDNA Microarray-Analysen .....	32
2.4.6 RNase-Protektions-Assay .....	33
<b>2.5 Biochemische Methoden .....</b>	<b>33</b>
2.5.1 Konventionelle ELISA .....	33
2.5.2 Multi-Zytokin ELISA .....	34
2.5.3 Western-blot-Analysen .....	34
2.5.4 Immunfluoreszenzmarkierung für die Durchflusszytometrie .....	35
2.5.5 Immunzytochemische Färbetechnik für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie .....	35
<b>3 Ergebnisse .....</b>	<b>37</b>
<b>3.1 Plättchenfaktor 4-differenzierte Antigen-präsentierende Zellen .....</b>	<b>37</b>
3.1.1 Morphologische Charakteristika von PFAPC .....	37
3.1.2 Phagozytoseaktivität von PFAPC .....	38
3.1.3 Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite durch PFAPC .....	39
3.1.4 Analysen des konstitutiven Aktivierungsstatus von PFAPC .....	41
3.1.4.1 <i>PFAPC sind ohne mikrobielle Stimulation auf molekularer Ebene voraktiviert</i> .....	41
3.1.4.2 <i>PFAPC exprimieren konstitutiv eine Reihe inflammatorischer Chemokine</i> .....	42
3.1.5 Aktivierbarkeit von PFAPC durch mikrobielle Stimulation .....	44
3.1.5.1 <i>PFAPC und MoDC exprimieren ein identisches Repertoire von TLR-mRNA</i> .....	45
3.1.5.2 <i>PFAPC sezernieren nach TLR-Ligation geringe Mengen TNF<math>\alpha</math></i> .....	46
3.1.5.3 <i>Die BCG-induzierte Signalweiterleitung ist in PFAPC vermindert</i> .....	48
3.1.5.4 <i>Aktivierte PFAPC produzieren ein spezifisches Profil T<math>_H</math>2-assoziiertes inflammatorischer Chemokine</i> .....	49
3.1.6 Lymphostimulatorisches Potenzial von PFAPC .....	52
3.1.6.1 <i>PFAPC induzieren als professionelle APC die antigenabhängige Proliferation naiver T-Zellen</i> .....	53
3.1.6.2 <i>PFAPC verschieben das Zytokinprofil unterschiedlich aktivierter T-Zellen in Richtung T<math>_H</math>2</i> .....	54
3.1.7 Interaktion von PFAPC mit Zellen der angeborenen Immunität .....	57
<b>3.2 PF-4-vermittelte Modulation der Immunbiologie ex vivo isolierter BDC .....</b>	<b>59</b>
3.2.1 Isolierung von CD1c <sup>+</sup> BDC .....	59
3.2.2 Phänotypisierung aufgereinigter CD1c <sup>+</sup> BDC .....	60
3.2.3 PF-4-vermittelte Verlängerung des Überlebens <i>in vitro</i> kultivierter CD1c <sup>+</sup> BDC .....	61
3.2.4 Immunmodulierende Effekte von PF-4 auf CD1c <sup>+</sup> BDC .....	62
3.2.4.1 <i>PF-4 induziert eine Vielzahl inflammatorischer Zytokine in BDC</i> .....	62
3.2.4.2 <i>Die LPS-induzierte Produktion inflammatorischer Mediatoren durch BDC wird durch PF-4 moduliert</i> ..	63
3.2.5 Modulation der BDC-vermittelten Stimulation von Lymphozyten durch PF-4 .....	66

<b>3.3 Dendritische Zellen als Produzenten von IFN<math>\gamma</math> <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....</b>	<b>68</b>
3.3.1 Proteinnachweis von IFN $\gamma$ in Monozyten-generierten APC .....	69
3.3.1.1 <i>Stimulation durch BCG induziert T<math>_H</math>1-polarisierendes IFN<math>\gamma</math> in MoDC, nicht aber in PFAPC</i> .....	69
3.3.2 Modulation der IFN $\gamma$ -Produktion durch IL-12/IL-15/IL-18 .....	71
3.3.3 Nachweis von IFN $\gamma$ -produzierenden DC <i>ex vivo</i> und <i>in vivo</i> .....	72
<b>4 Diskussion.....</b>	<b>75</b>
<b>4.1 Plättchenfaktor 4-differenzierte Antigen-präsentierende Zellen .....</b>	<b>75</b>
4.1.1 PFAPC – dendritische Zelle, Makrophage oder Dendrophage? .....	76
4.1.2 Konstitutiver Aktivierungsstatus von PFAPC.....	76
4.1.3 Inflammatorisches Potenzial von aktivierten PFAPC .....	79
4.1.4 Lymphostimulatorische Kapazität von PFAPC.....	80
<b>4.2 Modulation der Immunbiologie dendritischer Zellen durch PF-4.....</b>	<b>82</b>
4.2.1 Aktivierbarkeit und inflammatorisches Potenzial CD1c <sup>+</sup> BDC .....	83
4.2.2 Indirekte Effekte von PF-4 auf die T-Zellaktivierung.....	85
<b>4.3 Produktion von IFN<math>\gamma</math> durch dendritische Zellen <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i> .....</b>	<b>86</b>
<b>Literatur .....</b>	<b>90</b>
<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>100</b>
<b>Anhang.....</b>	<b>102</b>
<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>108</b>
<b>Veröffentlichungen .....</b>	<b>110</b>
<b>Danksagung .....</b>	<b>112</b>
<b>Curriculum vitae .....</b>	<b>114</b>

## Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Anti-
APC	Antigen-präsentierende Zelle(n)
$\beta$ 2M	<b><math>\beta</math>-2</b> Mikroglobulin
BCG	<i>Mykobakterium bovis</i> <b>Bacillus Calmette-Guérin</b>
BDC	Dendritische Zelle(n) des peripheren Blutes
bp	<b>Basen</b> paar(e)
BSA	Rinderserum ( <i>bovine serum albumin</i> )
$\beta$ -TG	<b><math>\beta</math>-Thromb</b> oglobulin
CDS	Kodierende Sequenz ( <i>coding sequence</i> )
CD	Differenzierungsmarker ( <i>cluster of differentiation</i> )
cDNA	Komplementäre DNA
CCL	<b>CC</b> Chemokin <b>L</b> igand
CCR	<b>CC</b> Chemokin <b>R</b> ezeptor
CFU	Kolonie bildende Einheit ( <i>colony forming unit</i> )
Ci	Curie
CpG	<b>Cytosin-Phosphat-Guanosin</b> Oligodesoxynukleotid(e)
cpm	<b>C</b> ounts <b>p</b> er <b>m</b> illion
CXCL	<b>CXC</b> Chemokin <b>L</b> igand
CXCR	<b>CXC</b> Chemokin <b>R</b> ezeptor
DABCO	1,4- <b>Diazabicyclo</b> [2.2.2]- <b>o</b> ktan
DAK	DC-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen ( <i>dendritic cell-activated killer cell</i> )
DC	Dendritische Zelle(n) ( <i>dendritic cell</i> )
dCTP	2'- <b>D</b> esoxycytosin-5'- <b>t</b> riphosphat
DMSO	<b>D</b> imethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'- <b>D</b> esoxynukleosid-5'- <b>t</b> riphosphat
DTT	<b>D</b> ithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetische Säure
ELISA	Enzym-gekoppelter Immunabsorptions-Assay
<i>et al.</i>	<i>Et altera</i>
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
FITC	<b>F</b> luorescein <b>i</b> sothiocyant
FCS	Fötales Kälberserum
g	Erdanziehungskraft (9,81 m/s)
GAPDH	<b>G</b> lyceraldehyd-3- <b>P</b> hosphat <b>D</b> ehydrogenase
GM-CSF	<b>G</b> ranulocyte- <b>m</b> acrophage <b>c</b> olony- <b>s</b> timulating <b>f</b> actor
h	Stunde
IFN	<b>I</b> nterferon

IL	<b>I</b> nterleukin
IP-10	<b>I</b> nterferon induzierendes <b>P</b> rotein 10
LP	<b>L</b> ipopeptid
LPS	<b>L</b> ipopolysaccharid
MACS	Magnetisch aktivierte Zellsortierung
MALP2	<b>M</b> akrophagen aktivierendes <b>L</b> ipopeptid 2
MCP-1	<b>M</b> onozyten chemotaktisches <b>P</b> rotein-1
M-CSF	<i><b>M</b>acrophage <b>c</b>olony-<b>s</b>timulating <b>f</b>actor</i>
MDC	<i><b>M</b>acrophage <b>d</b>erived <b>c</b>hemoattractant</i>
MFI	Durchschnittliche Fluoreszenzintensität ( <i>mean fluorescence intensity</i> )
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplexe
MIF	<b>M</b> akrophagenmigration inhibierender <b>F</b> aktor
min	Minute(n)
MLR	Gemischte Leukozytenreaktion ( <i>mixed leukocyte reaction</i> )
MNC	Mononukleäre Zelle(n)
MIP	<b>M</b> akrophagen inflammatorisches <b>P</b> rotein
MoDC	<b>M</b> onozyten-generierte <b>D</b> C
MOI	<i><b>M</b>ultiplicity <b>o</b>f <b>i</b>nfection</i>
mRNA	Messenger Ribonukleinsäure
NF $\kappa$ -B	<i><b>N</b>uclear <b>f</b>actor of <b>k</b>appa <b>l</b>ight <b>c</b>hain <b>e</b>nhancer in <b>B</b> cells</i>
NK	<b>N</b> atürliche <b>K</b> illerzelle(n)
PAM <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	Palmitoyl-3-cystein-serin-lysin-4
PAMP	<i><b>P</b>athogen <b>a</b>ssociated <b>m</b>olecular <b>p</b>attern</i>
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDC	<b>P</b> lasmacytoide <b>D</b> C
PE	<b>P</b> hycoerythrin
PF-4	<b>P</b> lättchenfaktor 4
PFAPC	PF-4-differenzierte Antigen-präsentierende Zelle(n)
PGE <sub>2</sub>	<b>P</b> rostaglandin <b>E</b> <sub>2</sub>
poly (I:C)	Polyinosinische-polycytidylische Nukleinsäure
PPD	<i><b>T</b>uberculin-derived <b>p</b>urified <b>p</b>rotein <b>d</b>erivate</i>
PPIA	<b>P</b> eptidylprolyl <b>I</b> somerase <b>A</b>
PRR	Mustererkennungsrezeptor ( <i>pattern recognition receptor</i> )
PS	<b>P</b> enicillin/ <b>S</b> treptomycin
R-848	Kleine anti-virale Komponente Resiquimod-848 (TLR7/8 Agonist)
RANTES	<i><b>R</b>egulated upon <b>a</b>ctivation of <b>n</b>ormal <b>T</b> cells <b>e</b>xpressed and <b>s</b>ecreted</i>
rh	<b>R</b> ekombinant(es) <b>h</b> uman(es)
RLU	Relative Lichteinheiten (relative light units)
RNA	Ribonukleinsäure
RT	<b>R</b> everse <b>T</b> ranskription

---

TBE	<b>Tris-Borsäure-EDTA</b>
TBS	Tris-gepufferte Salzlösung
TCR	T-Zellrezeptor
TE	<b>Trypsin/EDTA</b>
T <sub>H</sub>	<b>T-Helferzelle(n)</b>
TLR	<b>Toll-like Rezeptor</b>
TNF	<b>Tumornekrosefaktor</b>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSST-1	<b>Toxischer-Schock-Syndrom-Toxin-1</b>
U	Biologische Aktivitätseinheit ( <b>unit</b> )
Upm	<b>Umdrehungen pro Minute</b>
v/v	<b>Volumen pro Volumen</b>
w/v	Gewicht pro Volumen

# 1. Einleitung

Das menschliche Immunsystem läßt sich funktionell in zwei unterschiedliche Teilsysteme aufgliedern. Das aus evolutivem Blickwinkel betrachtet ursprünglichere Teilsystem ist das so genannte angeborene Immunsystem, welches unter anderem mithilfe nicht-zellulärer Komponenten wie dem Komplementsystem eine erste Verteidigungslinie gegen eingedrungene Pathogene bildet. Daneben bilden Makrophagen und neutrophile Granulozyten innerhalb der angeborenen Immunität eine erste zelluläre Barriere. Diese Phagozyten können antigenunspezifisch unter anderem mithilfe keimbahnkodierter Mustererkennungsrezeptoren konservierte und wiederkehrende mikrobielle Struktur motive, wie Membran- und Geißelbestandteile oder auch Nukleinsäurestrukturen, als körperfremd erkennen. Auf diesem Wege werden invasive Pathogene von diesen Zellen phagozytiert und im Rahmen inflammatorischer Immunreaktionen eliminiert. Zudem sind auch natürliche Killerzellen (NK-Zellen) aufgrund ihres Rezeptorrepertoires der angeborenen Immunität zuzurechnen, wobei sich diese Zellen insbesondere durch effiziente zytotoxische Aktivität gegenüber entarteten oder viral infizierten, körpereigenen Zellen auszeichnen<sup>1</sup>. Die angeborene Immunität als erste Verteidigungslinie kann jedoch bei schwerwiegenden Entzündungsreaktionen von Mikroorganismen oder auch Tumorzellen überwunden werden, weswegen die verschiedenen Zellpopulationen der adaptiven Immunantwort innerhalb kurzer Zeit aktiviert werden müssen. Zelluläre Komponenten der adaptiven Immunität sind vornehmlich  $CD4^+$  T-Helferzellen und  $CD8^+$  zytotoxische T-Zellen sowie Antikörper produzierende B-Zellen. Maßgebliche Charakteristika adaptiver Immunantworten sind die hochspezifische Antigenrestriktion der aktivierten Immunzellen sowie die anschließende Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses mittels Gedächtniszellen auch nach erfolgreicher Beseitigung der Infektion. Beide immunologischen Teilsysteme existieren jedoch nicht autark nebeneinander, sondern sind vielmehr eng miteinander verknüpft und beeinflussen sich zudem gegenseitig<sup>2</sup>. In diesem Zusammenhang kommt dendritischen Zellen (DC) als professionell Antigen-präsentierenden Zellen eine einzigartige Bedeutung bei der Aktivierung und Ausrichtung antigenspezifischer Immunantworten zu. DC erkennen mikrobielle Pathogene zwar ebenfalls über Mustererkennungsrezeptoren der angeborenen Immunität, leiten die integrierten Signale jedoch an antigenspezifische T-Zellen weiter. Infolgedessen wird ein Spektrum qualitativ unterschiedlicher adaptiver Immunantworten, welches von humoral über zytolytisch bis hin zu immunsuppressiv reicht, durch DC-vermittelte Parameter fein abgestimmt<sup>3</sup>. Des Weiteren werden durch DC bereits zu frühen Zeitpunkten einer Infektion nach neueren Erkenntnissen auch aktivierende Signale an Zellen der angeborenen Immunität, wie beispielsweise NK-Zellen, weitergeleitet<sup>4,5</sup>. DC bilden somit ein funktionelles Bindeglied zwischen dem angeborenen Immunsystem und adaptiven Immunzellen und sind dadurch nach heutigem Verständnis der zentrale Drehpunkt bei der Initiierung und Regulierung von Immunität<sup>6</sup>.

Thrombozyten kommen wichtige Funktionen im Rahmen homöostatischer Prozesse oder bei Blutgerinnungskaskaden während der Wundheilung zu. Im Laufe der vergangenen Jahre ist jedoch deutlich geworden, dass diesen anukleären Zellen zusätzlich immunmodulatorische Funktionen zuzurechnen sind. Thrombozyten werden lokal bei akuter Verletzung oder unter inflammato-

rischen Bedingungen aktiviert, wobei die dabei freigesetzten Thrombozytenmediatoren in dem jeweiligen Mikromilieu akkumulieren und modulierenden Einfluss auf die am Ort der Inflammation vorliegenden Immunzellen nehmen können. Im Zusammenhang mit der zentralen Bedeutung von DC bei der Steuerung von Immunantworten einerseits und den erst vor kurzem aufgedeckten immunmodulierenden Fähigkeiten von Thrombozyten andererseits wurden im Rahmen dieser Arbeit schwerpunktmäßig Interaktionen zwischen diesen beiden Zelltypen untersucht. Zum einen wurde analysiert, ob das unter inflammatorischen Bedingungen oder bei akuter Verletzung von aktivierten Thrombozyten in hohen Konzentrationen freigesetzte Chemokin Plättchenfaktor 4 (PF-4; CXCL4) Einfluss auf die Differenzierung von humanen professionell Antigen-präsentierenden Zellen aus monozytären Vorläuferzellen hat. Zum anderen sollten modulierende Effekte von PF-4 auf die Immunbiologie von bereits terminal differenzierten, *ex vivo* isolierten humanen DC in funktionellen *in vitro*-Studien analysiert werden. Bei diesen Untersuchungen stand im Wesentlichen die Fragestellung im Vordergrund, ob das von Thrombozyten freigesetzte PF-4 durch Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen Einfluss auf die Immunbiologie dieser Zellen an sich und auf die Qualität resultierender DC-vermittelter Immunantworten nehmen kann.

## 1.1 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden erstmals 1868 als Langerhans-Zellen in der Haut sichtbar gemacht, wobei jedoch eine weiterführende initiale Charakterisierung dieser seltenen Immunzellen erst vor ungefähr 30 Jahren erfolgte<sup>7</sup>. Ein Meilenstein auf dem Gebiet der DC-Forschung war dann 20 Jahre später die Etablierung eines Generierungsprotokolls zur *in vitro*-Differenzierung von DC aus Monozyten als Vorläuferzellen<sup>8</sup>. Mithilfe dieses Protokolls konnten *in vitro* differenzierte DC in ausreichender Zahl verfügbar gemacht werden, um ausführliche Phänotypisierungen vorzunehmen und diese Zellen auch in funktionellen Studien zu analysieren.

### 1.1.1 Immunbiologie dendritischer Zellen

Inzwischen ist eine Vielzahl von DC-spezifischen Funktionen bekannt. So besitzen DC insbesondere die einzigartige Fähigkeit, als professionell Antigen-präsentierende Zellen adaptive Immunantworten durch Aktivierung antigenspezifischer naiver T-Zellen zu initiieren. Gleichzeitig wird aber auch die Ausrichtung der adaptiven Immunantwort durch die DC-induzierte Polarisierung der aktivierten T-Zellen entscheidend dirigiert<sup>9</sup>. Hierbei beeinflussen drei wesentliche Faktoren die Balance der induzierten adaptiven Immunantwort: 1. die Herkunftslinie und der Differenzierungsstatus der bei der Immunreaktion involvierten DC, 2. die Art und Dosis der DC-aktivierenden Signale und 3. das resultierende Profil der induzierten Zytokine<sup>10;11</sup>.

*In vivo* differenzieren DC zunächst aus hämatopoetischen Vorläuferzellen, welche anschließend als so genannte unreife DC aus dem Knochenmark in die Peripherie auswandern und dort als Wächter des Immunsystems patrouillieren<sup>12</sup>. Im gesunden Gewebe werden ständig körpereigene Antigene von unreifen DC unter nicht-inflammatorischen Bedingungen phagozytiert, prozessiert und über Haupthistokompatibilitätskomplexe (MHC) der Klassen I oder II an T-Zellen präsentiert. Dabei werden antigenspezifische und somit potenziell autoreaktive T-Zellen aufgrund von fehlender Kostimulation und ohne aktivierende Zytokine entweder deletiert oder in einen anergischen

Zustand versetzt. Auf diesem Wege wird die kontinuierliche Aufrechterhaltung von Selbsttoleranz gewährleistet<sup>13;14</sup>. Die DC-vermittelte Induktion von Selbsttoleranz unter nicht-inflammatorischen Bedingungen stellt eine wesentliche immunbiologische Funktion von DC in der Peripherie dar<sup>14</sup>.

Die Erkennung von in Gewebe eingedrungenen Pathogenen durch unreife DC mithilfe von Mustererkennungsrezeptoren, beispielsweise durch membranständige *toll-like*-Rezeptoren (TLR)<sup>15;16</sup> oder intrazelluläre *nucleotide oligomerization domain*-(NOD)-Proteine<sup>17;18</sup>, führt in den DC zur Induktion Liganden-spezifischer inflammatorischer Signaltransduktionskaskaden<sup>19</sup>. Damit einhergehend wird in den DC ein Transformationsprozess ausgelöst, der in einer vollständigen Aktivierung zu nunmehr reifen DC resultiert. Die ausgereiften DC unterscheiden sich in ihrer Immunkompetenz sowohl phänotypisch als auch funktionell grundlegend von ihren unreifen Vorläufern. So zeichnen sich reife DC durch eine massive Heraufregulation der Antigen-präsentierenden MHC-Moleküle der Klassen I und II aus. Zudem exprimieren reife DC neben den eigentlichen Antigen-präsentierenden MHC-Komplexen zusätzlich große Mengen T-Zell-aktivierender kostimulatorischer Moleküle wie CD40, CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) und den DC-spezifischen Aktivierungsmarker CD83<sup>20</sup>. Des Weiteren ist eine wesentliche Fähigkeit reifer DC die Produktion verschiedenartiger proinflammatorischer und T-Zell-aktivierender Zytokine. Nach heutigem Verständnis werden die drei durch DC bereitgestellten Signale 1) antigenrestringierte Peptidpräsentation über MHC-Komplexe, 2) kostimulierende Signale und 3) aktivierende Zytokine für die nachhaltige Aktivierung naiver T-Zellen sowie die Polarisierung in T-Effektorzellen benötigt<sup>21;22</sup>. Somit wird deutlich, dass reife DC aufgrund ihres immunstimulatorischen Potenzials maßgeblich bei der Initiierung und Modulierung adaptiver Immunantworten beteiligt sind.

Reife DC sind zudem durch Variation des Repertoires an Chemokinrezeptoren in der Lage, inflammatorische Gewebe zu verlassen und in T-Zell-reiche Areale von sekundären lymphatischen Organen einzuwandern. So ist beispielsweise CC-Chemokinrezeptor 5 (CCR5) als spezifischer Rezeptor der proinflammatorischen Chemokine MIP-1 $\alpha$  (CCL3) und MIP-1 $\beta$  (CCL4) auf unreifen myeloiden DC exprimiert. Diese Chemokinrezeptorachse dirigiert die aktive Wanderung unreifer myeloider DC innerhalb der interzellulären Matrix in Richtung eines Inflammationsherdes. Nach Aktivierung von DC wird CCR7 als spezifischer Rezeptor für CCL19 (*EBI-1-Ligand chemokine*; ELC) und CCL21 (*secondary lymphoid tissue chemokine*; SLC) induziert. ELC und SLC werden konstitutiv von Endothelzellen der sekundären lymphatischen Organe produziert, wobei diese Chemokinrezeptorachsen die Wanderung der aktivierten, antigenbeladenen DC aus dem entzündeten Gewebe heraus über afferente lymphatische Gefäße in Richtung Lymphknoten dirigieren. Aufgrund dieser sequenziellen Regulation von Chemokinrezeptoren positionieren sich DC im Verlauf einer inflammatorischen Reaktion den jeweiligen Anforderungen entsprechend<sup>23;24</sup>.

### 1.1.2 Heterogenität der Subpopulationen dendritischer Zellen

Dendritische Zellen stellen *in vivo* nach heutigem Kenntnisstand keinen einheitlichen Zelltypus dar, sondern bilden vielmehr eine heterogene, aus verschiedenen Subpopulationen zusammengesetzte Leukozytenklasse. Dabei werden die Herkunftslinien und die Differenzierungswege der diversen bisher charakterisierten humanen DC-Subpopulationen nach wie vor – insbesondere im Zusammenhang mit möglichen funktionellen Konsequenzen – kontrovers diskutiert<sup>25</sup>. Allerdings

lassen sich die verschiedenen DC-Subpopulationen heute anhand phänotypischer Merkmale einwandfrei in zumindest zwei distinkte Hauptdifferenzierungslinien mit unterscheidbarem funktionellen Potenzial unterteilen<sup>26-28</sup>. Eine Differenzierungslinie wird hierbei von myeloiden CD11c<sup>++</sup> DC gebildet, da diese Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aus myeloiden Vorläuferzellen differenzieren können<sup>29</sup>. Im humanen peripheren Blut sind zudem innerhalb der Linie der CD11c<sup>++</sup> DC eine Reihe weiterer phänotypisch unterscheidbarer Subpopulationen identifiziert worden<sup>30</sup>. Im Detail sind diese myeloiden dendritischen Zellen des peripheren Blutes (BDC) ausnahmslos negativ für die Leukozyten-Linienmarker CD3<sup>-</sup> (T-Zellen), CD14<sup>-</sup> (Monozyten/ Makrophagen), CD19<sup>-</sup> (B-Zellen) und CD56<sup>-</sup> (NK-Zellen), exprimieren jedoch große Mengen an MHC II-Molekülen (MHC II<sup>+++</sup>)<sup>31</sup>. Ebenfalls wurde bei dieser Studie eine CD11c<sup>++</sup> CD1c<sup>-</sup> CD123<sup>-</sup> BDCA-3<sup>+</sup> Subpopulation von myeloiden BDC einem weiteren myeloiden CD11c<sup>++</sup> CD1c<sup>+</sup> CD123<sup>+/-</sup> BDCA-3<sup>-</sup> Subtypus gegenübergestellt. Daneben wurde unlängst eine zusätzliche, sehr seltene Subpopulation von CD11c<sup>++</sup> CD14<sup>+</sup> CD209<sup>+</sup> BDC phänotypisch und funktionell charakterisiert<sup>32</sup>. Ein weiterer Typ von myeloiden DC befindet sich im epidermalen Gewebe. Diese Zellen exprimieren CD1a und sind zudem positiv für das Typ II-Lektin Langerin (CD207), sie enthalten deutlich sichtbare Birbeck-Granulae und bilden als Langerhans-Zellen phänotypisch und funktionell eine weitere spezialisierte Form von dendritischen Zellen in den Epithelien<sup>33</sup>.

Diesem Zelltyp steht im peripheren Blut eine andere Differenzierungslinie dendritischer Zellen mit grundsätzlich abweichendem Phänotyp gegenüber. Die Zellen dieser Linie sind zwar auch Linienmarker<sup>-</sup> und MHC II<sup>+</sup>, es wird jedoch aufgrund eines charakteristischen Expressionsmusters der Oberflächenmoleküle (CD11c<sup>-</sup> CD1c<sup>-</sup> CD45RA<sup>+</sup> CD123<sup>++</sup> BDCA-2<sup>+</sup> BDCA-4<sup>+</sup>) ein lymphoider Ursprung dieser Zellen angenommen<sup>34</sup>. Diese aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit zu Antikörper produzierenden Plasmazellen als plasmacytoide DC (pDC) bezeichneten dendritischen Zellen exprimieren zudem Vorläufer von T-Zellrezeptor (TCR)  $\alpha$ -Ketten. Die Expression von TCR  $\alpha$ -Ketten wird als ein weiteres Indiz für die lymphoide Herkunft der pDC angesehen<sup>31;35</sup>. Zudem sind pDC in der Lage, ähnlich wie lymphozytäre B- oder T-Zellen, durch die Venolen mit hohem Endothel direkt aus der Blutbahn in die T-Zellzonen der sekundären lymphatischen Organe einzuwandern<sup>36</sup>.

Seit der Erstbeschreibung der *in vitro*-Differenzierung von DC aus Monozyten unter Verwendung von GM-CSF/IL-4<sup>8</sup> oder der Differenzierung aus multipotenten CD34<sup>+</sup> Blutstammzellen mithilfe von GM-CSF/TNF $\alpha$ <sup>37-39</sup> wurde das in der Fachliteratur beschriebene Spektrum der *in vitro*-Generierungsmöglichkeiten von DC aus humanen Vorläuferzellen kontinuierlich weiterentwickelt. Infolgedessen hat sich die Komplexität phänotypischer und funktioneller Unterschiede der verschiedenen DC-Subpopulationen fortlaufend, noch zusätzlich zu der oben dargestellten umfangreichen *in vivo*-Situation, drastisch erhöht. Im humanen System werden inzwischen allerdings vornehmlich Monozyten-generierte DC (MoDC) zu Forschungszwecken oder bei klinischen Anwendungen eingesetzt. Konventionelle MoDC werden nach dem ursprünglichen Protokoll von Sallusto *et al.*<sup>8</sup> innerhalb von sieben Tagen mithilfe von GM-CSF/IL-4 aus Monozyten differenziert. Diese Zellen sind im Vergleich zu anderen *in vitro* generierten DC-Subtypen am ehesten den myeloiden CD11c<sup>++</sup> BDC vergleichbar. Die Differenzierung weiterer DC-Subtypen kann aus Monozyten oder CD34<sup>+</sup> Stammzellen durch Verwendung diverser Zytokinkombinationen unter

unterschiedlichen Kulturbedingungen induziert werden<sup>40-46</sup>. Zusätzlich zu diesen früheren Studien wurde unlängst gezeigt, dass auch durch die Verwendung der Zytokinkombinationen IL-3/IL-4, IL-3/IFN $\beta$  oder GM-CSF/IL-15 innerhalb von fünf bis sieben Tagen eine *in vitro*-Differenzierung humaner Monozyten zu verschiedenartigen MoDC stattfindet<sup>47-49</sup>.

Dessen ungeachtet ergab sich in diesem Kontext die wesentliche Frage, ob diese *in vitro* generierten Daten zur DC-Differenzierung eine physiologische *in vivo*-Relevanz besitzen. Es konnten allerdings in neuerer Zeit in einer wachsenden Zahl von Studien deutliche Hinweise auf eine offensichtlich auch *in vivo* stattfindende Transition von DC aus Monozyten als Vorläuferzellen erbracht werden. So wurde in diesen Arbeiten beschrieben, dass DC in einem *ex vivo*-Modellsystem spontan und ohne Applikation exogener Zytokine innerhalb weniger Stunden aus Monozyten differenzieren können<sup>50</sup>. Zudem wurde *in vivo* nachgewiesen, dass DC ebenfalls sehr schnell aus phagozytierenden Monozyten<sup>51</sup> oder aber unter pathologischen Bedingungen, zum Beispiel durch inflammatorisches IFN $\alpha$  induziert, differenzieren<sup>52:53</sup>. Des Weiteren wurden in verschiedenen *in vitro*-Studien physiologische Bedingungen nachgestellt und das Differenzierungsverhalten von Monozyten im inflammatorischen Kontext analysiert. Auch hierbei stellte sich heraus, dass in Monozyten eine schnelle Differenzierung zu DC bei Interaktion mit Endothelzellen oder durch Aktivierung mit TLR-Liganden, CD40L (CD154) oder IFN $\alpha$  stattfindet<sup>54-58</sup>. Demzufolge geben die experimentellen Daten deutliche Hinweise darauf, dass Monozyten *in vivo* durchaus als DC-Vorläuferzellen fungieren können. Dennoch bleiben trotz dieser umfangreichen publizierten Datenlage exakt definierte Bedingungen, unter welchen eine Transition von Monozyten zu DC *in vivo* tatsächlich stattfindet, weitestgehend unaufgeklärt. Auffällig bleibt außerdem, dass die Kinetik dieser schnellen Monozyten zu DC-Differenzierung unter inflammatorischen oder physiologischen Bedingungen nicht adäquat durch die bisher etablierten fünf bis sieben Tage dauernden *in vitro*-Protokolle zur DC-Generierung widerspiegelt wird.

### 1.1.3 Funktionelle Plastizität dendritischer Zellen

Die unter 1.1.2 dargestellte Datenlage beleuchtet die extreme Heterogenität der einzelnen bisher *in vivo* und *in vitro* charakterisierten humanen DC-Subpopulationen in Bezug auf ihre jeweiligen Herkunftslinien und Differenzierungswege. Doch auch in Bezug auf funktionelle immunbiologische Konsequenzen deutet sich aufgrund verschiedener Arbeiten der letzten Jahre eine hochkomplexe und zudem variable funktionelle Plastizität der einzelnen DC-Subpopulationen an. So sind *ex vivo* isolierte plasmacytoide DC durch eine selektive Expression von TLR7 und TLR9 in ihren endosomalen Kompartimenten gekennzeichnet<sup>59</sup>. Diese Rezeptoren erkennen spezifisch, neben bakteriellen CpG-Motiven<sup>60:61</sup>, Nukleinsäurebestandteile von RNA- bzw. DNA-Viren, wobei die Ligation von TLR7 und TLR9 eine vollständige Aktivierung der pDC auslöst<sup>62</sup>. Die Ausreifung von pDC resultiert in einer schnellen und massiven Induktion von anti-viralen und T<sub>H</sub>1-polarisierenden Typ I-Interferonen<sup>63</sup>, weswegen dieser Zelltyp auch als natürliche Typ I-Interferon-produzierende Zelle bezeichnet wird<sup>64:65</sup>. Es wird somit deutlich, dass pDC aufgrund ontogenetischer Eigenschaften zur Erkennung von Viren prädestiniert sind und dadurch sehr wahrscheinlich eine zentrale Stellung bei der Bekämpfung viraler Infektionen einnehmen<sup>66</sup>. Myeloide DC hingegen exprimieren TLR1-6, sowie TLR8 und TLR10<sup>67:68</sup> und sind zudem nicht in der Lage, substanzielle

Mengen an Typ I-Interferonen zu sezernieren. Bereits die differenzielle Expression von TLR durch plasmacytoide und myeloide DC deutet auf eine funktionelle Spezialisierung der beiden Hauptentwicklungslinien in Bezug auf die Pathogenerkennung und das polarisierende Potenzial der nachgeschalteten Immunantworten hin<sup>69</sup>.

Nach neueren Erkenntnissen wird die funktionelle Plastizität von DC allerdings dadurch weiter erhöht, dass ebenfalls der Typus des aktivierenden Signals die Eigenschaften von DC beeinflusst und sich so richtungweisend auf die zu induzierende Immunantwort auswirkt. Dementsprechend wurde gezeigt, dass die selektive Aktivierung verschiedener TLR in myeloiden DC unterschiedliche Profile T-Zell-polarisierender Zytokine induziert. So erkennt TLR4 bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und induziert durch vollständige Ausreifung von konventionellen MoDC neben großen Mengen proinflammatorischer Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  und IL-6 auch substantielle Mengen von  $\text{T}_\text{H}1$ -polarisierendem IL-12p70<sup>70</sup>. Die Aktivierung von TLR4 durch LPS in Kombination mit TLR8-Ligation durch einzelsträngige RNA verstärkt das  $\text{T}_\text{H}1$ -polarisierende Potenzial von MoDC durch synergistisch gesteigerte Sezernierung von IL-12p70<sup>71</sup>. Allerdings kann zumindest *in vitro* auch unabhängig von TLR-Aktivierung, beispielsweise durch Ligation von CD40 mit CD40L (CD154), eine vollständige Aktivierung von DC mit deutlich  $\text{T}_\text{H}1$ -polarisierendem Zytokinprofil induziert werden<sup>72</sup>. TLR2 in Kombination mit verschiedenen Adaptermolekülen erkennt eine Vielzahl pathogener Struktur motive, wie zum Beispiel Lipopeptide (TLR1/-2), Glykolipide (TLR2/-6) oder Zymosan (TLR2/Dektin-1)<sup>73</sup>. Im Gegensatz zu TLR4 resultiert die Aktivierung von MoDC über TLR2 jedoch generell in vergleichsweise geringen Mengen IL-12p70<sup>74</sup>. Infolgedessen werden nach Ligation von TLR2, unter anderem durch Cholera-Toxin, Zymosan oder synthetisches Lipopeptid  $\text{PAM}_3\text{CSK}_4$ , präferenziell  $\text{T}_\text{H}2$ -polarisierte T-Zellantworten durch MoDC induziert<sup>75-77</sup>. Des Weiteren wird durch Aktivierung von TLR2 durch schistosomale Phosphatidylserine, Yersinia-Antigene oder mycoplasmatische Lipopeptide (MALP2) vornehmlich IL-10 induziert<sup>78-80</sup>. IL-10 wird als einem immunregulatorischen Zytokin eine fundamentale Bedeutung bei der Aufrechterhaltung von Selbsttoleranz und immunsuppressiven Prozessen durch Polarisierung naiver T-Zellen in Richtung regulatorischer T-Effektorzellen ( $\text{T}_\text{REG}$ ) zugeschrieben<sup>81</sup>. In diesem Zusammenhang muss eine weitere funktionelle Spezialisierung dendritischer Zellen Erwähnung finden. So ist inzwischen bekannt, dass die Aktivierungsgrade von DC je nach Dosis der aktivierenden Signale sequenziell unterschiedlich sind und die Differenzierung  $\text{CD}4^+ \text{IL-10}^+ \text{T}_\text{REG}$  aus naiven Vorläufern von so genannten semi-ausgereiften DC ausgelöst werden kann<sup>82</sup>. Dieser Aktivierungsstatus entsteht *in vivo* durch Migration geweberesidenten DC unter nicht-inflammatorischen Bedingungen in die Lymphknoten. Diese dendritischen Zellen exprimieren zwar deutliche Mengen an MHC II sowie T-Zell-kostimulierender Moleküle, produzieren jedoch keinerlei proinflammatorische oder polarisierende Zytokine<sup>83</sup>. Auf diese Weise induziert die Bereitstellung von nur zwei der drei aktivierenden Signale die Differenzierung naiver Vorläufer in  $\text{T}_\text{REG}$  und führt somit zur Aufrechterhaltung von Selbsttoleranz<sup>82</sup>.

Nach heutigem Kenntnisstand ist jedoch nicht nur die Herkunftslinie der DC oder die Art und Dosis des aktivierenden Signals für die Polarisierung der T-Effektorzellen von Bedeutung, sondern vielmehr kann auch der Modus der *in vitro*-Differenzierung aus monozytären oder  $\text{CD}34^+$  Vorläufern bei der Aktivierung von T-Zellen ausschlaggebend sein. So ist der *in vitro*-Differenzie-

rungsstatus von IL-3/IL-4-differenzierten MoDC funktionell dadurch gekennzeichnet, dass diese dendritischen Zellen bei Stimulation generell geringe Mengen IL-12p70 produzieren und dadurch T-Zellantworten in Richtung  $T_H2$  verschieben<sup>47</sup>. Die Differenzierung von Monozyten in Gegenwart von GM-CSF/IL-15 anstelle von GM-CSF/IL-4 resultiert in DC, die nach Ausreifung das ansonsten üblicherweise ausschließlich von lymphoiden Zellen produzierte Leitzytokin IL-2 sezernieren. Infolgedessen sind diese MoDC in der Lage, bereits zu sehr frühen Zeitpunkten einer Inflammation T-Effektorzellen oder NK-Zellen zu regulieren<sup>5;48</sup>. Des Weiteren konnte zumindest für das murine System der Nachweis erbracht werden, dass auch  $IFN\gamma$ , ein weiteres lymphoides Leitzytokin, von myeloiden dendritischen Zellen produziert werden kann<sup>84</sup>. Welche funktionellen Konsequenzen die Produktion von  $IFN\gamma$  durch myeloide DC bei der frühen Interaktion von Zellen der angeborenen Immunität hat und ob auch humane DC zur Produktion von  $IFN\gamma$  befähigt sind, ist dahingegen noch gänzlich ungeklärt. Zusammengenommen illustriert die aktuelle Datenlage jedoch, dass die jeweilige Orientierung einer adaptiven Immunantwort ganz entscheidend von der Differenzierungslinie, dem Grad der Ausreifung sowie der Natur stimulierender Signale während der Differenzierung und Aktivierung von DC abhängig ist<sup>85;86</sup>.

## 1.2 Immunregulatorische Funktionen von Thrombozyten

Thrombozyten werden im Allgemeinen als zelluläre Schlüsselemente bei homöostatischen Prozessen und bei der Gewebereparatur angesehen. Im Laufe der vergangenen Jahre ist jedoch immer deutlicher geworden, dass diesen Zellen unter inflammatorischen Bedingungen zusätzlich wichtige Funktionen bei der Weiterleitung von Alarmsignalen an Immunzellen zukommen<sup>87;88</sup>. Thrombozyten sind die ersten zellulären Komponenten, die bei akuter Verletzung der Vaskulatur oder bei traumatischen Ereignissen lokal im umgebenden Gewebe in großer Zahl akkumulieren. Diese Zellen fungieren als Wächter in der Peripherie, gepaart mit der Fähigkeit zum Transfer von Informationen, durchaus vergleichbar mit Mastzellen, Makrophagen oder dendritischen Zellen<sup>89</sup>. Sie können zudem innerhalb von Sekunden auf aktivierende Signale beschädigter Gewebe wie zum Beispiel Adenosin-Diphosphat (ADP), Thrombin oder Kollagen reagieren. Aktivierte Thrombozyten aggregieren am Ort der Noxe durch rasche Expression von Adhäsionsmolekülen und stellen dadurch zellulären Kontakt zwischen Endothelien einerseits und beispielsweise Granulozyten oder Monozyten andererseits her. Auf diesem Wege formen aggregierte Thrombozyten eine zelluläre Matrix, die den Blutverlust verringert, die transendotheliale Wanderung verschiedener Immunzellen erleichtert und die Neubildung von Gewebestrukturen einleitet. Zudem hat die Thrombozytenaggregation den positiven Nebeneffekt, dass eingedrungene Mikroorganismen opsoniert werden. Nach neueren Erkenntnissen kommt hinzu, dass stimulierte Thrombozyten sofort nach Aktivierung eine große Bandbreite an gespeicherten Mediatoren freisetzen, die zusätzlich die Funktion und Wanderung diverser Immunzellen modulieren können. So setzen aktivierte Thrombozyten unter anderem Wachstumsfaktoren (PDGF, VEGF), Cyclooxygenase-abhängige Derivate der Arachidonsäure (bspw.  $PGE_2$ ) oder inflammatorische Zytokine und Chemokine wie MIP-1 $\alpha$ , RANTES (CCL5), GRO- $\alpha$  (CXCL1) oder  $\beta$ -Thromboglobulin ( $\beta$ -TG; CXCL7) frei<sup>89;90</sup>. Eine weitere Hauptkomponente der bei

Thrombozytenaktivierung freigesetzten Mediatoren bildet zudem Plättchenfaktor 4 (PF-4). Im Rahmen von traumatischen Ereignissen wird vermutet, dass die lokale Konzentration von PF-4 in einem gegebenen Mikromilieu durchaus in den mikromolaren Bereich ansteigen kann<sup>91</sup>. Dieses inflammatorische CXC-Chemokin vereint eine Vielzahl von bisher charakterisierten immunmodulatorischen Effekten auf diverse Zielzellen. Hierzu gehört die Histaminfreisetzung in basophilen Granulozyten<sup>92</sup> oder die Induktion von Adhärenz neutrophiler Granulozyten auf Endothelzellen bei gleichzeitiger Freisetzung des Inhalts der sekundären Granulae<sup>93;94</sup>. NK-Zellen werden durch PF-4 zur Sekretion von IL-8 angeregt, während die Interaktion von PF-4 mit aktivierten CD3<sup>+</sup> T-Zellen die Proliferation und die Produktion von IL-2 und IFN $\gamma$  in diesen Zellen inhibiert<sup>95</sup>. Im Gegensatz dazu wird das proliferatorische Potenzial CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> T<sub>REG</sub> durch PF-4 zwar gesteigert, gleichzeitig die inhibitorischen Effekte dieser regulatorischen Zellen auf CD4<sup>+</sup> CD25<sup>-</sup> T-Zellen jedoch abgeschwächt<sup>96</sup>. Interessanterweise wurde in weiteren Studien aufgezeigt, dass PF-4 die spontan-induzierte Apoptose in Monozyten, durchaus vergleichbar zu GM-CSF oder M-CSF, verhindert und überdies die Differenzierung dieser Zellen zu spezialisierten Makrophagen einleitet. Diese PF-4-differenzierten Makrophagen sind durch substantielle TNF $\alpha$ -Produktion und verstärkte Phagozytoseaktivität gekennzeichnet, wohingegen die Expression von MHC II-Molekülen nahezu vollständig herabreguliert wird<sup>97;98</sup>. In einer weiteren Studie wurde gezeigt, dass Monozyten nach Stimulation durch PF-4 in Kombination mit RANTES zur verstärkten Adhärenz auf Endothelzellen aktiviert werden können<sup>99</sup>.

Neben der Sezernierung löslicher Mediatoren üben aktivierte Thrombozyten auch durch direkten Zellkontakt immunmodulatorische Funktionen auf Zielzellen aus. Aktivierte Thrombozyten exprimieren P-Selektine (CD62L), welche die Adhäsion von Granulozyten oder Monozyten fördern<sup>100</sup>. Außerdem konnte thrombozytenassoziierter CD40L (CD154) in verschiedenen *in vitro*-Studien die vollständige Ausreifung dendritischer Zellen induzieren<sup>101-103</sup>. Es konnte zudem gezeigt werden, dass die CD40L-vermittelten Effekte durch Thrombozyten in viralen *in vivo*-Infektionsmodellen immunmodulatorische Konsequenzen auf die Antikörperklasse und die Nachhaltigkeit der Zytotoxizität von antigenspezifischen CD8<sup>+</sup> T-Zellen haben<sup>104</sup>. In zwei kürzlich erschienenen Publikationen wird sogar die Expression von funktionellen TLR auf Thrombozyten beschrieben<sup>105;106</sup>.

Die dargestellte Datenlage macht deutlich, dass Thrombozyten weit über ihre bereits bekannten homöostatischen Funktionen hinaus wichtige immunmodulatorische Funktionen erfüllen. Diese Funktionen werden von Thrombozyten sowohl parakrin als auch durch direkten Zellkontakt vermittelt. Thrombozyten stellen als Wächter in der Peripherie somit nach heutigem Kenntnisstand eine direkte und modulierende Verbindung zwischen unspezifischen, inflammatorischen Alarmsignalen und der adaptiven Immunität her.

### 1.3 Ziele der vorliegenden Arbeit

Dendritische Zellen besitzen als funktionelles Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität eine Schlüsselfunktion bei der Aktivierung und Polarisierung von T-Effektorzellen. Im Laufe der vergangenen Jahre konnte gezeigt werden, dass DC einen heterogenen Zelltyp bilden, wobei zwischen den einzelnen Subpopulationen funktionelle Unterschiede bestehen und sogar innerhalb einer Subpopulation ein hohes Maß an funktioneller Plastizität existiert. Aufgrund dieser Untersuchungen ist inzwischen deutlich geworden, dass die Ausrichtung einer adaptiven Immunantwort zwar einerseits von der DC-Differenzierungslinie, andererseits aber auch von der Art der DC-integrierten Signale während der Differenzierung und bei der Aktivierung abhängig ist.

In vorangegangenen Arbeiten dieser Laborgruppe konnte gezeigt werden, dass von aktivierten Thrombozyten unter inflammatorischen Bedingungen freigesetztes PF-4 in Kombination mit IL-4 die Differenzierung von Monozyten zu Antigen-präsentierenden Zellen (PFAPC) induziert. In Phänotypisierungen und initialen funktionellen Studien wurden PFAPC mit konventionellen MoDC verglichen. PFAPC konnten hierbei durch geringe TNF $\alpha$ - und IL-12p70-Sekretion charakterisiert werden. Diese Zellen besaßen dennoch ein hohes lymphostimulatorisches Potenzial bei gleichzeitig geringer Induktion von lymphozytären IFN $\gamma$ . Auffällig war zudem die vergleichsweise schnelle Induktion von DC-spezifischen Merkmalen innerhalb von drei Tagen sowie ein Abfall des immunstimulatorischen Potenzials zu späteren Differenzierungszeitpunkten<sup>107</sup>.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es nun, immunmodulatorische Effekte bei der Interaktion von aktivierten Thrombozyten und Antigen-präsentierenden Zellen unter inflammatorischen Bedingungen aufzuklären. Hierbei stand die detaillierte weiterführende Charakterisierung der durch PF-4/IL-4 differenzierten Antigen-präsentierenden Zellen im Mittelpunkt. Bei diesen Untersuchungen sollte zunächst geklärt werden, ob PFAPC dendritischen Zellen zuzuordnen sind oder eher Makrophagencharakter besitzen. In weiterführenden Studien wurde dann sowohl die Interaktion von PFAPC mit Zellen der angeborenen Immunität als auch die Aktivierung und Polarisierung adaptiver Immunzellen untersucht. Es sollte die Fähigkeit dieser Zellen untersucht werden, modulierenden Einfluss auf die Initiierung und die Ausrichtung von Immunantworten nehmen zu können. Als Referenz wurden den PFAPC in allen experimentellen Arbeiten die gut charakterisierten GM-CSF/IL-4-differenzierten, konventionellen MoDC gegenübergestellt. Ergänzend zu diesen Langzeiteffekten auf die Differenzierung von Antigen-präsentierenden Zellen aus monozytären Vorläufern sollten zusätzlich modulierende Effekte von PF-4 auf die Immunbiologie von bereits terminal differenzierten CD1c<sup>+</sup> BDC aufgedeckt werden. Hierbei stand die Frage im Vordergrund, ob PF-4, insbesondere auch in Kombination mit TLR-aktivierenden Signalen, Einfluss auf die Immunbiologie dieser Zellen nehmen kann. Gegenstand der Untersuchungen war dabei das inflammatorische Potenzial der PF-4-modulierten BDC an sich als auch die möglichen indirekten Effekte von PF-4 auf die Ausrichtung und Qualität adaptiver Immunantworten.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Chemikalien und Lösungen sowie ihre Bezugsquellen

Agarose	LifeTechnologies (Paisley, Schottland)
Aqua injectabilia	Braun (Melsungen)
Akkutase	PAA (Pasching, Österreich)
β-Mercaptoethanol	Fluka (Buchs, Schweiz)
Bromphenolblau	Serva (Heidelberg)
BSA	PAA (Pasching, Österreich)
Complete! Protease Inhibitor	Roche (Penzberg)
DABCO	Sigma-Aldrich (München)
DMSO	Sigma-Aldrich (München)
dNTP	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA	Serva (Heidelberg)
Ethidiumbromid (1μg/ml, pH 8,0)	Merck (Darmstadt)
FCS, inaktiviert bei 56°C, sterilfiltriert	Linaris (Bettlingen)
Glycerin	Serva (Heidelberg)
HBSS	Gibco (Eggenstein)
Lucigenin	Roche (Penzberg)
Lymphozyten-Separationsmedium	PAA (Pasching, Österreich)
Na <sub>2</sub> [ <sup>51</sup> Cr]O <sub>4</sub>	Hartmann-Analytik (Braunschweig)
Oligo dT Primer	MWG Biotech (Ebersberg)
P <sup>33</sup> dCTP	Hartmann-Analytik (Braunschweig)
para-Formaldehyd	Fluka (Buchs, Schweiz)
Penicillin/Streptomycin-Lsg.	PAA (Pasching, Österreich)
RPMI 1640	PAA (Pasching, Österreich)
Rotiscint eco plus (Szintillationsflüssigkeit)	Roth (Karlsruhe)
Salze u.a. Bestandteile für Lösungen	Merck, Fluka oder Serva
TE	Biochrom (Berlin)
Tris	Fluka (Buchs, Schweiz)
Triton -X- 100	Fluka (Buchs, Schweiz)

#### 2.1.2 Puffer und Kulturmedien

Kulturmedium R <sub>xx</sub> 10:	RPMI 1640, 1% PS (v/v), 10% FCS (v/v)
Kulturmedium R <sub>xx</sub> 1:	RPMI 1640, 1% PS (v/v), 1% heterologes Plasma (v/v)
Elutriationsmedium:	1x HBSS, 2% (v/v) FCS, 2% (v/v) NaHCO <sub>3</sub> (3,5%) in aqua injectabilia
CL-Medium:	RPMI 1640 ohne Phenolrot, 25 mM Hepes
Kryomedium:	70% (v/v) RPMI, 20% (v/v) FCS, 10% (v/v) DMSO

Humanserum:	Humanserum wurde aus Vollblut gesunder Spender der Blutgruppe AB gewonnen und vor Verwendung für 30 min bei 56°C inaktiviert, danach steriltriftriert und bei -20°C gelagert. Zur Verfügung gestellt vom Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin UKSH, Universität zu Lübeck
Humanplasma:	Humanplasma wurde aus Vollblut gesunder Spender gewonnen und vor Verwendung bei -20°C eingefroren
1x PBS:	0,9 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> ; 2,7 mM KCl; 140 mM NaCl; 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> ; 8,1 mM Na <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> <sup>2-</sup> lösen in aqua dest.
1x MACS-Puffer:	1x PBS, 0,5% (w/v) BSA, 2 mM EDTA; pH 7,2
1x Azid-PBS:	3 mM NaN <sub>3</sub> , 121,5 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O, 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> lösen in aqua dest.; pH 7,4
1x TBE:	89 mM Tris, 89 mM Borsäure, 1 mM EDTA; pH 8,0
Western-blot-Lysepuffer:	1 M HEPES, 3 M NaCl, 0,5 M EDTA, 10% NP-40, 1 M β-Glycerophosphat, 1 M NaVO <sub>4</sub> , 1 M NaF, 1 M Benzamidin, 1 M pNPP, 1 M DTT, 0,1 M PMSF in aqua dest.
Transferpuffer:	50 ml 20x NuPage Transfer-Buffer, 100 ml Methanol, 1 ml NuPage Antioxidant in 850 ml aqua dest.
Beladungspuffer:	50% (v/v) Glycerin, 1 mM EDTA, 0,4% (v/v) Bromphenolblau

### 2.1.3 Puffer für immunzytochemische Färbetechniken

1x TBS:	50 mM Tris, 150 mM NaCl; pH 7,4
Absättigungspuffer:	0,1M Glycin in 1x TBS
Permeabilisierungspuffer:	0,2% Triton -X- 100 in 1x TBS
Inkubationspuffer:	1x TBS, 3% HS (v/v), 3% BSA (w/v)

### 2.1.4 Antikörper für die Durchflusszytometrie

In der folgenden Tabelle 2.1.4 sind die verschiedenen für die Charakterisierung von Oberflächenantigenen in der Durchflusszytometrie eingesetzten monoklonalen Antikörper und deren Hersteller aufgelistet.

**Tab. 2.1.4:** Antikörper für die Durchflusszytometrie zur Charakterisierung humaner Oberflächenantigene

Spezifität	Klon	Isotyp	konjugierte Gruppe	Hersteller
CCR1	53504.111	mlgG1	-	R&D
CCR5	45549.110	mlgG2b	-	R&D
CCR7	CCR7.6B3	mlgG1	-	eBioscience
CD1a	BL6	mlgG1	PE	BeckmanCoulter
CD1b/c	B-B5	mlgG1	-	Biosource
CD1c	M241	mlgG1	FITC	Ancell
CD3	UCHT1	mlgG1	PE	Calbiochem
CD11b	ICRF44	mlgG1	-	Pharmingen
CD11c	B-ly6	mlgG1	PE	Pharmingen
CD14	18D11	mlgG1	PE	Dianova

Spezifität	Klon	Isotyp	konjugierte Gruppe	Hersteller
CD19	HD37	mlgG1	PE	DAKO
CD40	mAb89	mlgG1	PE	Immunotech
CD45RO	UCHL1	mlgG2a	FITC	Pharmingen
CD56	MOC-1	mlgG1	PE	DAKO
CD80	MAB104	mlgG1	PE	Immunotech
CD83	HB15e	mlgG1	PE	Pharmingen
CD86	FUN-1	mlgG1	PE	Pharmingen
C209	AZND1	mlgG1	PE	BeckmanCoulter
CXCR1	E3	mlgG1	-	Dr. Voitenock
CXCR2	RII 115	mlgG1	-	Dr. Brandt
HLA-DR	Immu-357	mlgG1	PE	BeckmanCoulter
MHC I	W6/32	mlgG2a	PE	DAKO
MHC II	I3-RD1	mlgG2a	PE	BeckmanCoulter
Isotyp	DAK-GO2	mlgG1	FITC	DAKO
Isotyp	DAK-GO3	mlgG1	PE	DAKO
Isotyp	DAK-GO5	mlgG2a	-	DAKO
Isotyp	MPC-11	mlgG2b	-	BeckmanCoulter
Ziege $\alpha$ -Maus	-	F(ab') <sub>2</sub>	RPE	DAKO
Ziege $\alpha$ -Maus	-	F(ab') <sub>2</sub>	FITC	DAKO

### 2.1.5 Antikörper für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Nachstehend sind in Tabelle 2.1.5 die für immunzytochemische Untersuchungen am konfokalen Laserscanning-Mikroskop verwendeten Antikörper und Reagenzien aufgelistet.

**Tab. 2.1.5:** Antikörper und Reagenzien für die Immunzytochemie zum Nachweis CD209<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> DC auf Objektträgerpräparaten und in Blasenbiopsien mittels konfokaler Laserscanning-Mikroskopie

Bezeichnung	Klon	Isotyp	konjugierte Gruppe	Verdünnung	Hersteller
CD4	Leu3a/3b	mlgG1	FITC	1 $\mu$ l / 75 $\mu$ l	Becton Dickinson
CD209	eB-h209	rlgG2a	-	1 $\mu$ l / 75 $\mu$ l	eBioscience
IFN $\gamma$	GZ-4	mlgG1	-	2 $\mu$ l / 75 $\mu$ l	BenderMedSystems
Isotyp	DAK-GO1	mlgG1	-	4 $\mu$ l / 75 $\mu$ l	DAKO
Isotyp	R2a00	rlgG2a	-	5 $\mu$ l / 75 $\mu$ l	CALTAG Lab.
Ziege $\alpha$ -Maus	-	F(ab') <sub>2</sub>	Alexa 546	0,5 $\mu$ l / 75 $\mu$ l	Molecular Probes
Ziege $\alpha$ -Maus	-	F(ab') <sub>2</sub>	Alexa 488	0,5 $\mu$ l / 75 $\mu$ l	Molecular Probes
Ziege $\alpha$ -Ratte	-	F(ab') <sub>2</sub>	Alexa 488	0,5 $\mu$ l / 75 $\mu$ l	Molecular Probes
TOTO®-3 Iodide	-	-	-	0,5 $\mu$ l / 75 $\mu$ l	Molecular Probes
SYTO® 45	-	-	-	2 $\mu$ l / 75 $\mu$ l	Molecular Probes

### 2.1.6 Antikörper für Western-blot-Analysen

Die für Western-blot-Analysen verwendeten Antikörper sind im Folgenden nach primären und sekundären Antikörpern aufgelistet. In Tabelle 2.1.6 werden zudem die eingesetzten Verdünnungen gezeigt.

primäre Antikörper:

- Kaninchen  $\alpha$ -p38 Cell Signaling (Frankfurt a.M.)
- Maus  $\alpha$ -phospho-p38 Cell Signaling (Frankfurt a.M.)
- Kaninchen  $\alpha$ -I $\kappa$ B- $\alpha$  Cell Signaling (Frankfurt a.M.)
- Maus  $\alpha$ -phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$  Alexis Biochemicals (Lausen, Schweiz)

sekundäre Antikörper:

- Ziege  $\alpha$ -Kaninchen, Alexa Fluor 680 IgG(h+L) Mol. Probes Eugene (Oregon, USA)
- Ziege  $\alpha$ -Kaninchen, IR Dye 800 goat  $\alpha$  rabbit Mol. Probes Eugene (Oregon, USA)
- Ziege  $\alpha$ -Maus, Alexa Fluor 680 IgG(h+L) Mol. Probes Eugene (Oregon, USA)
- Ziege  $\alpha$ -Maus, IR Dye 800 goat  $\alpha$  mouse Mol. Probes Eugene (Oregon, USA)

**Tab. 2.1.6:** Zusammenfassung der verwendeten primären und sekundären Antikörper für den Western-blot und die jeweiligen Verdünnungen

Primärer Antikörper	eingesetzte Verdünnung	Sekundärer Antikörper	eingesetzte Verdünnung
$\alpha$ -p38	1:1000	Ziege $\alpha$ -Kaninchen	1:10000
$\alpha$ -phospho-p38	1:10000	Ziege $\alpha$ -Maus	1:10000
$\alpha$ -I $\kappa$ B- $\alpha$	1:1000	Ziege $\alpha$ -Kaninchen	1:10000
$\alpha$ -phospho-I $\kappa$ B- $\alpha$	1:1000	Ziege $\alpha$ -Kaninchen / Ziege $\alpha$ -Maus	1:10000

### 2.1.7 Wachstumsfaktoren und Stimuli

Die verwendeten Substanzen zur Differenzierung und zur Ausreifung humaner Antigen-präsentierender Zellen sind nachfolgend aufgelistet.

Cholera-Toxin	Sigma-Aldrich (München)
CpG	Invivogen (San Diego, USA)
Flagellin	Axxora LLC (San Diego, USA)
natives hPF-4 (Endotoxinfrei)	Natives humanes PF-4 wurde von PD Dr. F. Petersen (Forschungszentrum Borstel) nach der durch Petersen <i>et al.</i> <sup>108</sup> beschriebenen Methode aus Thrombozytenkonzentraten isoliert
logBCG	<i>Mykobakterium bovis BCG</i> (Stamm Connaught, WTC) wurde in der logarithmischen Wachstumsphase verwendet. Die Bakterienzahl (CFU/ml) wurde unmittelbar vor Verwendung anhand der optischen Dichte bei 600 nm errechnet und die Zellen in angezeigten MOI eingesetzt.
LPS ( <i>Salmonella minnesota</i> )	Prof. Dr. K. Brandenburg (Forschungszentrum Borstel)
MALP2	EMC microcollections (Tübingen)
Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> (syn. Lipopeptid)	EMC microcollections GmbH (Tübingen)
Poly (I:C)	Axxora LLC (San Diego, USA)
PPD	Statens Serum Institute (Kopenhagen, Dänemark)
rhGM-CSF	R&D (Wiesbaden)
rhM-CSF	PeptoTech-Tebu (Frankfurt a.M.)

rhIL-4	R&D (Wiesbaden)
rhIL-12	PeptoTech-Tebu (Frankfurt a.M.)
rhIL-15	PeptoTech-Tebu (Frankfurt a.M.)
rhIL-18	R&D (Wiesbaden)
Resiquimod R-848 <sup>109;110</sup>	Invivogen (San Diego, USA)
Zymosan	Sigma-Aldrich (München)

### 2.1.8 cDNA Microarrays

GEArray™ Q Series Human Signal Transduction	
PathwayFinder Gene Array HS-005	SuperArray Bioscience (Frederick, USA)
GEArray™ Q Series Human Inflammatory	
Cytokines & Receptors Gene Array HS-015	SuperArray Bioscience (Frederick, USA)

### 2.1.9 Kits

AmpoLabelling L-03 Kit	SuperArray (Frederick, USA)
Beadlyte® Human Multi-Cytokine Detection System 2	Biomol (Hamburg)
Human Bio-Plex T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-panel Multiplex-Assay	BioRad (München)
LightCycler FastStart DNA Master <sup>PLUS</sup> SYBR Green I Kit	Roche (Penzberg)
MACS CD1c (BDCA-1) DC Isolation Kit	Miltenyi Biotec (Berg.-Gladbach)
MACS CD3 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec (Berg.-Gladbach)
MACS naive CD4 <sup>+</sup> T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec (Berg.-Gladbach)
MACS NK Cell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec (Berg.-Gladbach)
NucleoSpin II RNA Isolation Kit	Macherey&Nagel (Dueren)
RiboQuant™ Ribonuklease Protection-Assay	Becton Dickinson (Heidelberg)

### 2.1.10 Instrumente und Geräte

autoMACS™	Miltenyi Biotec (Berg.-Gladbach)
β-Counter 1205 Betaplate®	PerkinElmer (Boston, USA)
Bio-Plex System	Biorad (München)
FACS Calibur	Becton Dickinson (Heidelberg)
γ-Counter LB 2111	Berthold Detection Systems (Wildbad)
Konfokales Laserscanning-Mikroskop TCS SP	Leica (Bensheim)
Kryostat Mikrotom CM 3000	Leica (Bensheim)
LightCycler Instrument 2.0	Roche (Penzberg)
Mikroplatten Luminometer LB 96V	Berthold Detection Systems (Wildbad)
Phasenkontrast-Mikroskop	Zeiss (Jena)
PhosphorImager SI	Molecular Dynamics (Sunnyvale, USA)
Photometer Ultrospec 1000	Pharmacia Amersham Biotech (Freiburg)
Spannungsquelle Power Pack P25	Biometra (Göttingen)
Spektral BioPhotometer V1.32	Eppendorf (Hamburg)
Zellcounter CASY TT	Schärfe (Reutlingen)
Zentrifugen	Hettich (Tuttlingen)

### 2.1.11 Sonstiges

DNA-Marker (100 bp)	Invitrogen (Karlsruhe)
FITC-konjugierte Latexkugeln	Polyscience Inc. (Eppenheim)
Glasfiltermatten	PerkinElmer (Boston, USA)
Kulturplatten	NUNC (Wiesbaden)
Kulturröhrchen	Sarstedt (Nümbrecht)
Latexkugeln	Serva (Heidelberg)
MACS-Säulen	Miltenyi Biotec (Berg.-Gladbach)
Transwells	NUNC (Wiesbaden)

## 2.2 Zellbiologische Methoden

### 2.2.1 Isolierung humaner MNC aus peripherem Blut

Die Isolierung humaner MNC erfolgte über eine diskontinuierliche Dichtegradientenzentrifugation mittels Lymphozyten-Separationsmedium modifiziert nach der Methode von Boyum *et al.*<sup>111</sup>. Hierzu wurde zuerst das Vollblut gesunder Spender mit 10% (v/v) 3,8%iger Na-Citrat-Lösung versetzt und mit gleichen Teilen HBSS gemischt. Anschließend wurden in 50 ml Sarstedt-Röhrchen 40 ml dieser Lösung vorsichtig auf 10 ml Separationsmedium geschichtet und die Röhrchen für 35 min bei 400x g und Raumtemperatur ohne Bremse zentrifugiert. Der leukozytenfreie Plasmaüberstand wurde abgesaugt und die in der Interphase sedimentierten MNC mit einer sterilen Pasteurpipette geerntet und zweimal mit kaltem HBSS gewaschen (10 min, 400xg, 4°C). Abschließend wurden die MNC gründlich resuspendiert und die Zellzahl in einem Zellcounter (CASY TT; Schärfe, Reutlingen) bestimmt. Hierzu wurden 5 µl Zellsuspension mit 5 ml Zählflüssigkeit (Schärfe, Reutlingen) in einem Röhrchen vermischt und durch eine Kapillare in den Zellcounter aufgenommen. Der Zellcounter konnte anhand der unterschiedlichen Streulichtmuster die verwendeten Leukozytenpopulationen ihrer jeweiligen Zellgröße entsprechend diskriminieren und quantifizieren. Diese Vorgehensweise wurde standardmäßig bei allen untersuchten Leukozytenpopulationen und Tumorzellen zur Zellzahlbestimmung angewendet.

### 2.2.2 Auftrennung humaner MNC in Monozyten und Lymphozyten

Die weitere Auftrennung der isolierten MNC in Lymphozyten- und Monozytenfraktionen erfolgte mithilfe der Gegenstromzentrifugation modifiziert nach Contreras *et al.*<sup>112</sup> in einem Elutriator (JE-6B; Beckmann Instruments, München). Hierfür wurden die resuspendierten MNC auf eine Endkonzentration von  $5 \times 10^6$  Zellen/ml in Elutriationsmedium eingestellt und bei laufendem Rotor (3000 Upm bei 12°C) und einer Pumpgeschwindigkeit von 25 ml/min in die Trennkammer des Rotors eingeladen. Nach schrittweiser Steigerung der Pumpgeschwindigkeit auf bis zu 50 ml/min wurden die einzelnen in den MNC enthaltenen Zellpopulationen in Abhängigkeit von ihrem Volumen in einzelne Fraktionen aufgetrennt und nacheinander aus dem Elutriator ausgeschleust. Da Lymphozyten im Allgemeinen ein geringeres Volumen haben als Monozyten, wurden die Lymphozyten bereits bei einer Pumpgeschwindigkeit von 40 ml/min (kleine Lymphozyten) bzw. 45

ml/min (große Lymphozyten) ausgeladen, während die größeren Monozyten erst bei 50 ml/min ausgeschleust wurden. Die Zellzahl und die Reinheit der durch Elutriation aufgetrennten Lymphozyten- oder Monozytenfraktionen wurde anhand des Streulichtmusters im CASY TT bestimmt, bevor die Zellen weiterführend durch MACS Separations Kits aufgereinigt wurden.

### **2.2.3 Isolierung humaner CD3<sup>+</sup> T-Zellen mit dem MACS T Cell Isolation Kit**

Die Aufreinigung von CD3<sup>+</sup> T-Zellen erfolgte modifiziert nach Herstellerangaben mithilfe des MACS T Cell Isolation Kit. Hierbei wurden – anstelle von MNC – elutrierte Lymphozyten pro 10<sup>7</sup> eingesetzte Zellen in 40 µl MACS-Puffer zusammen mit 10 µl Biotin-Antikörper Cocktail resuspendiert und 10 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden pro 10<sup>7</sup> Zellen 30 µl MACS-Puffer und 20 µl anti-Biotin MicroBeads addiert und weitere 15 min bei 4°C inkubiert. Der Ansatz wurde zum Waschen mit dem 20fachen Volumen MACS-Puffer aufgefüllt und 10 min bei 400x g und 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde komplett abgenommen und die Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert. Die eigentliche magnetische Auftrennung wurde dann an einem autoMACS™ Separator (Miltenyi, Bergisch-Gladbach) durchgeführt. Bei Auswahl des Programms „Deplete“ wurden die nicht markierten angereicherten CD3<sup>+</sup> T-Zellen am Ausgang „neg1“ eluiert. Die Reinheit der resultierenden T-Zellpopulation wurde im Durchflusszytometer überprüft (CD3; CD19; CD56), bevor die Zellen in weiterführende Experimente eingesetzt wurden. Die Reinheit war in allen Experimenten höher als 98%.

### **2.2.4 Isolierung humaner CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen mit dem MACS naive T Cell Isolation Kit**

Die Isolierung CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> naiver T-Zellen wurde modifiziert nach Herstellerangaben mithilfe des MACS naive CD4<sup>+</sup> T Cell Isolation Kit durchgeführt. Die für dieses Kit verwendeten kleinen Lymphozyten sowie Puffer- und Antikörpermengen, die Inkubationszeiten und das autoMACS™ Programm sind mit dem Pan T Cell Isolation Kit identisch und deswegen hier nicht im Einzelnen aufgeführt (siehe 2.2.3). Die Reinheit der resultierenden T-Zellpopulation wurde im Durchflusszytometer überprüft (CD4; CD45RA; CD45RO), bevor die Zellen in weiterführende Experimente eingesetzt wurden. Die Reinheit war in allen Experimenten höher als 98%.

### **2.2.5 Isolierung humaner CD1c<sup>+</sup> BDC mit dem MACS CD1c (BDCA-1) DC Isolation Kit**

Zur Isolierung von CD1c<sup>+</sup> BDC wurde das MACS CD1c (BDCA-1) DC Isolation Kit verwendet. Das Herstellerprotokoll zur Isolierung von BDC direkt aus der MNC-Fraktion wurde auch hier modifiziert durchgeführt. Zu Beginn muss erwähnt werden, dass frisch isolierte BDC eine vergleichbare Größe und Morphologie aufweisen wie Monozyten. Außerdem ist eine Subpopulation von CD19<sup>+</sup> CD1c<sup>+</sup> B-Zellen im peripheren Blut beschrieben worden<sup>31</sup>. Aus diesem Grunde wurden in Vorexperimenten die MNC in einzelne Fraktionen im Elutriator aufgetrennt und die Zellen der verschiedenen Fraktionen in der Durchflusszytometrie auf Expression von CD1c analysiert. Erwartungsgemäß befanden sich einerseits in der Fraktion der kleinen Lymphozyten die CD1c<sup>+</sup> B-Zellen und andererseits in der Monozytenfraktion die CD1c<sup>+</sup> BDC. Die Zellen der übrigen Elutriatorfraktionen zeigten keine CD1c-Expression. Anhand dieser Eingrenzungen wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich die Monozytenfraktion und nicht die MNC-Fraktion als Ausgangspopulation des BDCA-1 DC Isolation Kit eingesetzt. Vergleichsanalysen zwischen

beiden Ausgangspopulationen zeigten zudem, dass das in der vorliegenden Arbeit modifizierte Protokoll eine identische Ausbeute CD1c<sup>+</sup> BDC bei erhöhter Reinheit ergab.

Zum Aufreinigen wurden 10<sup>8</sup> Zellen der Monozytenfraktion in 200 µl MACS-Puffer resuspendiert und mit je 100 µl FcR-Blockierungsreagenz, CD19 MicroBeads und CD1c Biotin-Antikörper für 15 min bei 4°C inkubiert. Hiernach wurde mit dem 20fachen Volumen MACS-Puffer aufgefüllt und 10 min bei 400x g und 4°C gewaschen, bevor die Zellen in 500 µl MACS-Puffer resuspendiert und auf eine magnetisierte LS-Säule gegeben wurden. Verbliebene CD19<sup>+</sup> B-Zellen und Zelltrümmer wurden auf der LS-Säule zurückgehalten, während Monozyten und BDC eluiert und erneut in 400 µl MACS-Puffer resuspendiert wurden. Nach Zugabe von 100 µl anti-Biotin MicroBeads wurde wieder für 15 min bei 4°C inkubiert, danach die Zellen im 20fachen Volumen MACS-Puffer gewaschen und in 500 µl resuspendiert. Die Zellsuspension wurde anschließend auf eine magnetisierte MS-Säule gegeben und dreimal mit je 0,5 ml MACS-Puffer gewaschen. Das Eluat konnte als Monozytenfraktion für weiterführende Experimente, beispielsweise zur Differenzierung konventioneller MoDC, verwendet werden (siehe 2.2.7). Nach Ablauf der gesamten Pufferlösung wurde die Säule entmagnetisiert und erneut mit 1 ml MACS-Puffer gewaschen und die CD1c<sup>+</sup> BDC eluiert. Um die Reinheit zu erhöhen, wurde das Eluat jedoch nicht direkt verwendet, sondern auf eine zweite magnetisierte MS-Säule gegeben und erneut dreimal mit je 0,5 ml MACS-Puffer gewaschen. Erst hiernach wurden die hochreinen CD1c<sup>+</sup> BDC von der wieder entmagnetisierten Säule gewaschen und für weiterführende Experimente mit 1x 10<sup>6</sup> Zellen/ml in das Kulturmedium R<sub>xx</sub>1 eingesetzt. Die Reinheit der CD1c<sup>+</sup> BDC (> 98%) wurde mithilfe der Durchflusszytometrie anhand von CD14-PE / CD1c-FITC Doppelmarkierungen kontrolliert. Zur Zellzahlbestimmung wurde der CASY TT verwendet.

### **2.2.6 Isolierung humaner CD56<sup>+</sup> NK-Zellen mit dem MACS NK Cell Isolation Kit II**

Die Isolierung CD56<sup>+</sup> NK-Zellen wurde nach modifizierten Vorgaben des Herstellerprotokolls mit dem MACS NK Cell Isolation Kit II durchgeführt. Anstelle der MNC-Fraktion wurde als Ausgangspopulation die Fraktion mit vornehmlich großen Lymphozyten verwendet, da in Vorexperimenten in der Durchflusszytometrie der Hauptanteil CD56<sup>+</sup> NK-Zellen in dieser Fraktion nachgewiesen werden konnte. Die einzelnen Arbeitsschritte wurden, wie bei dem Pan T Cell Isolation Kit beschrieben, durchgeführt (siehe 2.2.3) und sind deswegen hier nicht detailliert wiedergegeben. Die Reinheit der Zellpopulation wurde durch Immunfluoreszenzmarkierungen der Zellen (CD56; CD3; CD19) im Durchflusszytometer überprüft.

### **2.2.7 Differenzierung konventioneller dendritischer Zellen (MoDC)**

Um humane Monozyten *in vitro* zu konventionellen dendritischen Zellen (MoDC) differenzieren zu lassen, wurden 2x 10<sup>6</sup> Monozyten/ml R<sub>xx</sub>10 mit jeweils 500 U GM-CSF und IL-4 in Kulturplatten (NUNC, Wiesbaden) eingesetzt<sup>8</sup>. Nach jeweils zwei bis drei Tagen wurde die Hälfte des Mediums vorsichtig abgenommen; die darin befindlichen Zellen wurden sedimentiert, erneut in der vorher abgenommenen Menge R<sub>xx</sub>10 inklusive GM-CSF und IL-4 (je 500 U/ml) resuspendiert und zurück in die Kulturplatten gegeben. An Tag 5 bis Tag 7 waren die Monozyten zu unreifen MoDC differenziert und konnten für weiterführende Experimente direkt in der Kulturschale stimuliert werden.

Alternativ wurden die Zellen – beispielsweise für T-Zell-Kokulturen – geerntet, gezählt und erneut in Kulturplatten eingesetzt. In Vergleichstudien mit PFAPC (siehe 2.2.8) wurden die MoDC wie jeweils angezeigt an Tag 3 bis Tag 7 verwendet und zum Ernten für 10 bis 15 min bei 37°C in Akkutase inkubiert, bevor weiterführende Experimente mit diesen Zellen angesetzt wurden.

### **2.2.8 Generierung von PF-4-differenzierten Antigen-präsentierenden Zellen (PFAPC)**

Zur *in vitro*-Generierung von PF-4-differenzierten Antigen-präsentierenden Zellen (PFAPC) wurden  $2 \times 10^6$  Monozyten/ml  $R_{xx}10$  mit 500 U IL-4 und 4  $\mu$ M PF-4 in Kulturplatten (NUNC, Wiesbaden) eingesetzt. Nach jeweils zwei bis drei Tagen wurde die Hälfte des Mediums vorsichtig abgenommen, die darin befindlichen Zellen sedimentiert, erneut in der vorher abgenommenen Menge  $R_{xx}10$  inklusive IL-4 (500 U/ml), aber ohne PF-4, resuspendiert und zurück in die Kulturplatten gegeben. An Tag 3 bis Tag 7 wurden die differenzierten PFAPC entweder direkt stimuliert oder für weiterführende Experimente geerntet, gezählt und neu eingesetzt. Aufgrund der ausgeprägten Adhärenz dieser Zellen mussten diese hierbei für 10 bis 15 min bei 37°C mit Akkutase abgelöst, gewaschen und dann eingesetzt werden. Die Zellzahl wurde dabei mithilfe des CASY TT bestimmt.

### **2.2.9 Differenzierung von Makrophagen (M $\Phi$ )**

Um *in vitro* aus Monozyten als Vorläuferzellen verschiedene Makrophagen-(M $\Phi$ )-Subtypen differenzieren zu lassen, wurden  $2 \times 10^6$  Monozyten/ml  $R_{xx}10$  mit 500 U GM-CSF (GM-M $\Phi$ ) bzw. 500 U M-CSF (M-M $\Phi$ ) bzw. 4  $\mu$ M PF-4 (PF-M $\Phi$ ) für drei bis sieben Tage kultiviert. Nach jeweils zwei bis drei Tagen wurde die Hälfte des Mediums abgenommen und durch die gleiche Menge frisches  $R_{xx}10$  jeweils inklusive 500 U/ml GM-CSF bzw. 500 U/ml M-CSF ersetzt. PF-M $\Phi$  erhielten nur frisches Medium ohne Chemokin. An Tag 3 bis Tag 7 wurden die Zellen mit Akkutase geerntet (siehe oben), gezählt und für weiterführende Experimente eingesetzt.

### **2.2.10 Humane Tumorzelllinien K562 und T24**

Humane Tumorzellen wurden in Gewebekulturflaschen (Falcon; Becton Dickinson, Heidelberg) in  $R_{xx}10$  bei 37°C kultiviert und zweimal pro Woche passagiert. Bei adhärennten Zelllinien wurden die Zellen dazu mit Trypsin-EDTA (3 bis 5 min, 37°C) abgelöst und gewaschen. Nicht-adhärenente Zellen wurden direkt geerntet und die Zellzahl bestimmt. Jeweils  $3 \times 10^6$  Tumorzellen wurden dann in 12 ml  $R_{xx}10$  pro Kulturflasche eingesetzt und weiterkultiviert.

Bei den in dieser Arbeit verwendeten Zelllinien handelte es sich um die Leukämie-Zelllinie K562 sowie um die Blasentumor-Zelllinie T24. K562-Zellen sind gering differenzierte Erythroleukämiezellen mit hoher Suszeptibilität gegenüber *in vitro*-Aktivität von NK-Zellen. Tumorzellen der T24-Zelllinie zeigen den Phänotyp eines papillären, gering differenzierten Harnblasenkarzinoms. Sie gelten im Allgemeinen als vergleichsweise resistent gegen *in vitro*-Aktivität von NK-Zellen.

## 2.3 APC-Stimulation und Experimente zur Zellfunktion

Die verschiedenen in dieser Arbeit untersuchten Subtypen Antigen-präsentierender Zellen (APC) wurden in den gezeigten Experimenten mit einer Vielzahl von Aktivierungssignalen in unterschiedlichen Konzentrationen stimuliert. Die aktivierten APC wurden dabei entweder direkt analysiert oder für weiterführende funktionelle Experimente verwendet.

### 2.3.1 Stimulation von MoDC und PFAPC

MoDC und PFAPC wurden an Tag 3 bis Tag 7 des Differenzierungsprozesses stimuliert. Die in den Vergleichsstudien zwischen MoDC und PFAPC verwendeten Stimuli und die titrierten Konzentrationsbereiche sind im Folgenden aufgelistet. Die Stimuluskonzentration und die Dauer der Stimulation sind im Einzelnen den Abbildungen im Ergebnisteil zu entnehmen. Die Zellkonzentration betrug in allen Stimulationsansätzen  $1 \times 10^6$  Zellen/ml.

LPS:	1 - 100 ng/ml
Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub> :	10 - 1000 nM
Zymosan:	50 µg/ml
Flagellin:	1 - 100 ng/ml
R-848:	1 - 10 µM
CpG:	1 - 100 nM
MALP2:	10 - 1000 nM
poly (I:C):	5 - 500 µg/ml
logBCG:	1 -100 (MOI)

### 2.3.2 Stimulation von CD1c<sup>+</sup> BDC

Die CD1c<sup>+</sup> BDC wurden nach der Isolierung (siehe 2.2.5) in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in das Kulturmedium R<sub>xx</sub>1 eingesetzt. Um anschließend modulierende Effekte von PF-4 auf die Immunbiologie der CD1c<sup>+</sup> BDC zu untersuchen, wurden die BDC in den verschiedenen Experimenten mit LPS (2 µg/ml) + IFN $\gamma$  (2 ng/ml)  $\pm$  PF-4 (4 µM) oder mit BCG (MOI=2)  $\pm$  PF-4 (4 µM) ausgereift. Die jeweilige Stimuluskombination und die Stimulationsdauer sind den Abbildungen im Ergebnisteil zu entnehmen. Die Zellkonzentration betrug in allen experimentellen Versuchsansätzen  $1 \times 10^6$  Zellen/ml.

### 2.3.3 Phagozytose-Assay

Vergleichende Analysen zur unspezifischen Phagozytoseaktivität von MoDC und PFAPC im Verhältnis zu den durch PF-4 und GM-CSF generierten M $\Phi$ -Subtypen wurden mittels Durchflusszytometrie von PD Dr. F. Petersen (Laborgruppe Biochemische Immunologie, Forschungszentrum Borstel) nach der von Grage-Griebenow *et al.*<sup>113</sup> beschriebenen Methode angefertigt. Hierfür wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 300 µl CL-Medium resuspendiert und 60 min bei 37°C in einer 96-well-Mikrotiterplatte vorinkubiert. Danach wurden  $2 \times 10^6$  FITC-konjugierte monodisperse Latexkugeln (1,83 µm Durchmesser; Polyscience Inc., Eppelheim) in 10 µl CL-Medium zu den Ansätzen in der Mikrotiterplatte gegeben, anzenrifugiert (1 min, 300x g) und für weitere 30 min bei 37°C inkubiert. Die Zellen wurden geerntet, wobei die nicht phagozytierten Latexkugeln in einem Waschschrift (7 min, 400x g, 4°C) entfernt wurden. Die relative Menge an phagozytierten Latex-

kugeln wurde anschließend in einem Durchflusszytometer quantifiziert und die Messdaten als durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) angegeben.

#### 2.3.4 Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite

Vergleichende Analysen der Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite (engl.: *oxidative burst*) von MoDC und PFAPC gegenüber den PF-M $\phi$  bzw. GM-M $\phi$  wurden in einem Mikroplatten Lumino-meter (LB 96V; Berthold Detection Systems, Wildbad) durch Messung der Chemilumineszenz in Gegenwart von 90  $\mu\text{g/ml}$  Lucigenin (9,9'-bis-(N-methylacridiniumnitrat); Roche, Penzberg) durchgeführt<sup>113</sup>. Diese Untersuchungen wurden von PD Dr. F. Petersen (Laborgruppe Biochemische Immunologie, Forschungszentrum Borstel) durchgeführt. Hierzu wurden  $2 \times 10^5$  Zellen in 200  $\mu\text{l}$  CL-Medium – versetzt mit Lucigenin – in eine nicht-transparente 96-well Mikrotiterplatte (NUNC, Wiesbaden) überführt und 60 min bei 37°C vorinkubiert. Dann wurden die Zellen mit Latexkugeln (pro Ansatz  $7,5 \times 10^6$  Latexkugeln in 10  $\mu\text{l}$  CL-Medium) stimuliert und die Chemilumineszenz für weitere 60 min gemessen. Die Messwerte wurden als relative Lichteinheiten angegeben.

#### 2.3.5 Gemischte Leukozytenreaktion (MLR)

Die wie in 2.2.3 bzw. 2.2.4 beschrieben aufgereinigten CD3<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen wurden in den verschiedenen *in vitro*-Experimenten zur Induktion von antigenunabhängiger T-Zellproliferation und Zytokinproduktion mit unterschiedlichen heterologen APC-Subtypen kultiviert. Hierbei wurden die T-Zellen während der Dauer der APC-Differenzierung bzw. -Aktivierung mit  $2 \times 10^6$  Zellen/ml R<sub>xx</sub>10 in 6-well-Kulturplatten eingesetzt und zeitgleich mit den APC am Tag der Verwendung geerntet, gezählt und in den angegebenen APC/T-Zell-Verhältnissen in 96-well-Rundbodenplatten (NUNC, Wiesbaden) eingesetzt. Die Zellkonzentration wurde in allen Experimenten mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml als Gesamtzellzahl gewählt. An Tag 5 der Kokulturen wurde [<sup>3</sup>H]-markiertes Thymidin hinzugegeben (1  $\mu\text{Ci}/200 \mu\text{l}$ ) und für weitere 18 h inkubiert. Die Platten wurden anschließend bei -20°C eingefroren und die Zelllysate anschließend auf Glasfiltermatten (PerkinElmer; Boston, USA) geerntet. Die Menge des Einbaus der radioaktiven Nukleotide in die DNA proliferierender T-Zellen wurde in einem  $\beta$ -Counter 1205 Betaplate® (PerkinElmer; Boston, USA) gemessen. Zeitgleich wurden nicht radioaktiv-markierte Kulturüberstände von parallelen Ansätzen zur Zytokinbestimmung bei -20°C eingefroren.

#### 2.3.6 Antigenpräsentations-Assay (AG-Assay)

Die antigenabhängige APC-vermittelte Induktion von Proliferation und Zytokinproduktion CD3<sup>+</sup> bzw. CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen wurde *in vitro* in autologen Antigenpräsentations-Assays (AG-Assays) modifiziert nach Narendran *et al.*<sup>114</sup> bestimmt. Hierzu wurden die aufgereinigten T-Zellen mit den unterschiedlichen autologen APC-Subtypen in angezeigten Verhältnissen für fünf Tage in 96-well-Rundbodenplatten kokultiviert. Die Zellkonzentration wurde in allen Experimenten mit  $1 \times 10^6$  Zellen/ml als Gesamtzellzahl gewählt. Die zuvor durchgeführte Aktivierung bzw. Antigenbeladung der verschiedenen APC-Subtypen 18 h vor ihrer Verwendung erfolgte entweder mit Cholera-Toxin (10  $\mu\text{g/ml}$ ), Zymosan (50  $\mu\text{g/ml}$ ) oder mit PPD (10  $\mu\text{g/ml}$ ). Zusätzlich wurden die APC 1 h vor Verwendung mit dem Superantigen TSST-1 (10 ng/ml) inkubiert. An Tag 5 der Kokulturen wurde [<sup>3</sup>H]-markiertes Thymidin hinzugegeben (1  $\mu\text{Ci}/200 \mu\text{l}$ ) und weitere 18 h

inkubiert. Nach dem Gefrieraufschluss der Zellen bei  $-20^{\circ}\text{C}$  wurden die Lysate auf Glasfiltermatten (PerkinElmer; Boston, USA) geerntet und die Proliferationsrate in einem  $\beta$ -Counter 1205 Betaplate® (PerkinElmer; Boston, USA) gemessen. Zur Bestimmung der Zytokininduktion wurden die Überstände parallel angesetzter Kulturen eingefroren.

### 2.3.7 DC-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen (DAK-Assay)

Zur DC-vermittelten Induktion der *in vitro*-Aktivität von NK-Zellen (DAK-Assay; engl.: *dendritic cell-activated killer cell*) wurden die unter 2.2.6 isolierten NK-Zellen in 15 ml Sarstedt-Röhrchen in 1 ml Kryomedium resuspendiert und unverzüglich bei  $-70^{\circ}\text{C}$  kryokonserviert. Parallel dazu wurden autologe Monozyten drei Tage zu PFAPC und MoDC differenziert. 24 h vor Verwendung der autologen NK-Zellen (also an Tag 2 der APC-Differenzierung) wurden die NK-Zellen zum Auftauen in 10 ml warmem  $R_{xx}10$  suspendiert, gewaschen (10 min,  $400\times g$  bei Raumtemperatur) und mit  $1\times 10^6$  Zellen/ml in  $R_{xx}10$  bei  $37^{\circ}\text{C}$  wieder in Kultur genommen. An Tag 3 der APC-Differenzierung wurden die APC-Subpopulationen und die NK-Zellen geerntet, gezählt und gemeinsam im Verhältnis 1:1 ( $1\times 10^6$  Zellen/ml Gesamtzellzahl) in 24-well-Kulturplatten eingesetzt. Die APC/NK-Zell-Kokulturen wurden mit BCG (MOI=1 zur Gesamtzellzahl) stimuliert oder unstimuliert gelassen und für fünf Tage kultiviert. Die nunmehr aktivierten DAK-Zellen wurden zum angegebenen Zeitpunkt geerntet (die Kulturüberstände wurden zur Zytokinbestimmung eingefroren) und im CASY TT gezählt, bevor diese in angezeigten Ratios als Effektorzellen für 4 - 6h zu  $\text{Na}_2^{51}\text{Cr}]\text{O}_4$ -markierten T24- oder K562-Tumorzellen gegeben wurden. Die zytotoxische Aktivität der DAK-Zellen wurde anschließend anhand der Freisetzung von  $\text{Na}_2^{51}\text{Cr}]\text{O}_4$  in den Kulturüberstand mittels eines  $\gamma$ -Counters (LB2111; Berthold Detection Systems, Wildbad) errechnet.

## 2.4 Molekularbiologische Methoden

### 2.4.1 RNA Isolation

GesamtRNA aus humanen Primärzellen wurde mithilfe von NucleoSpin RNA II Filtereinheiten (Macherey&Nagel) extrahiert. Dabei wurden pro Säule maximal  $5\times 10^6$  Zellen in 350  $\mu\text{l}$  RA1 Puffer inklusive 1%  $\beta$ -Mercaptoethanol lysiert und das Lysat entweder direkt weiterverarbeitet oder bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Zu Beginn der Isolation wurde das Zelllysat in einer Tischzentrifuge (EBA 12R; Hettich, Tuttlingen) durch eine Homogenisierungssäule 1 min bei  $11.000\times g$  zentrifugiert und anschließend mit gleichem Volumen 70%igen Ethanol vermischt. Das Lysat-Ethanolgemisch wurde danach auf die Isolationssäule gegeben und 30 s bei  $8.000\times g$  zentrifugiert, bevor die gebundene RNA mit 350  $\mu\text{l}$  MDB-Puffer gewaschen wurde. Parallel wurde zur Degradation kontaminierender DNA die DNase I Reaktionslösung im DNase-Puffer angesetzt und die Filtermembran bei Raumtemperatur 15 min mit 95  $\mu\text{l}$  dieser Lösung inkubiert. Die DNase wurde dann durch 200  $\mu\text{l}$  RA2-Puffer inhibiert und die Säule 30 s bei  $8.000\times g$  gewaschen. Abschließend wurde nach zwei weiteren Waschläufen mit RA3-Puffer die an die Filtermembran gebundene RNA mit 30 bis 60  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$  eluiert. Ab diesem Punkt wurde die RNA bei  $-70^{\circ}\text{C}$  eingefroren oder zur weiteren Verarbeitung auf Eis gehalten. Für nachfolgende RT-PCR oder cDNA Microarray-Analysen wurde die Konzentration der isolierten gesamtRNA in den verschiedenen

Isolationsansätzen mithilfe eines Spektralphotometers (BioPhotometer; Eppendorf, Hamburg) bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Zudem wurde vor Verwendung der isolierten gesamt-RNA in weiterführenden Experimenten eine etwaige Kontamination der gesamtRNA durch verbliebene DNA ausgeschlossen. Zu diesem Zwecke wurden standardmäßig PCR-Reaktionen (siehe 2.4.3) mit Intron-umspannenden sequenzspezifischen Oligonukleotiden (Primern) durchgeführt und die Größe und Anzahl der entstandenen Amplifikate in Agarosegelen überprüft.

#### **2.4.2 cDNA Synthese**

Zur reversen Transkription (RT) der isolierten gesamtRNA in komplementäre cDNA wurden pro Ansatz 10 µl der jeweiligen RNA (200 ng/µl) mit 1 µl eines oligo dT<sub>12-18</sub>-Mixes (1:1:1) und 1 µl eines dNTP-Mixes (jedes Nukleotid 10 mM konzentriert) gemischt und 5 min bei 65°C inkubiert. Anschließend wurde der Reaktionsansatz schnell auf Eis abgekühlt und es wurden 4 µl 5x SuperScript II-Reaktionspuffer (Invitrogen; Leek, Niederlande), 1 µl RNase out Ribonuklease Inhibitor (Invitrogen; Leek, Niederlande) und 2 µl DTT (Invitrogen; Leek, Niederlande) addiert. Dieser Ansatz wurde 2 min bei 42°C inkubiert, danach mit 1 µl reverser Transkriptase SuperScript II (Invitrogen; Leek, Niederlande) gemischt und der gesamte Ansatz dann für 60 min bei 50°C inkubiert. Abschließend wurde die reverse Transkriptase bei 70°C für 15 min inaktiviert und die synthetisierte cDNA bei -20°C eingefroren.

#### **2.4.3 Polymerasekettenreaktion (PCR) und quantitative PCR**

Zum Nachweis der Expression von Kandidatengen wird im Allgemeinen das Verfahren der Polymerasekettenreaktion (PCR) verwendet. Hierbei wird das zu untersuchende Gen unter Zuhilfenahme von Primern und einer thermostabilen DNA-Polymerase in definierten Temperaturzyklen vervielfältigt. Das resultierende PCR-Amplifikat konnte dann in Agarosegelen nachgewiesen werden (siehe 2.4.4).

Eine Weiterentwicklung dieser standardisierten Methode insbesondere zur Quantifizierung regulierter Gene stellt die quantitative PCR dar. Auch bei dieser Methode werden sequenzspezifische Primer und definierte Temperaturzyklen verwendet, um Amplifikate zu vervielfältigen. Im Unterschied zu nicht-quantitativen Verfahren wird hierbei ein in DNA-Doppelstränge interkalierender Farbstoff (SYBR Green) zugegeben, der während der PCR zyklisch an einem definierten Temperaturpunkt (Aufnahmetemperatur) bei 530 nm Wellenlänge angeregt wird. Hierbei ist die Stärke des emittierten Signals direkt proportional zur Menge der amplifizierten Doppelstrang-DNA und kann im Verhältnis zu nicht-regulierten Haushaltsgenen und zwischen verschiedenen Stimulationsansätzen als x-fache Induktion berechnet werden. Zudem ermöglicht diese Methode bei paralleler Verwendung von geeigneten cDNA-Standards quantitative Aussagen über die exakte Kopienzahl der RNA-Transkripte.

Die quantitativen PCR-Experimente wurden in 10 µl Ansätzen mithilfe des LightCycler FastStart DNA Master<sup>PLUS</sup> SYBR Green I Kits (Roche, Penzberg) durchgeführt. Die Zusammensetzung eines einzelnen 10 µl Ansatzes in einer 20 µl Glaskapillare (Roche, Penzberg) ist in Tabelle 2.4.3.1 aufgeführt.

Tab. 2.4.3.1: Zusammensetzung eines quantitativen PCR-Ansatzes

Reagenz	Volumen ( $\mu$ l)
H <sub>2</sub> O, steril	4,5
SYBR Mix	2
Strang-Primer (100 $\mu$ M)	0,5
Anti-Strang-Primer (100 $\mu$ M)	0,5
cDNA (1:5 in Wasser verdünnt)	2,5

Die mit dem Reaktionsansatz befüllten Glaskapillaren wurden bei niedrigster Laufgeschwindigkeit 5 s an zentrifugiert, bevor sie in das LightCycler Instrument eingesetzt wurden. Aufgrund unterschiedlicher Anlagerungstemperaturen der Primer und verschiedener Aufnahmetemperaturen musste für jedes Primerpaar ein spezifisches PCR-Programm verwendet werden. Ein solches Programm findet sich in Tabelle 2.4.3.2. Die Auswertung der Experimente erfolgte mithilfe der LightCycler Software Version 3.5.3 (Roche, Penzberg).

Tab. 2.4.3.2: Auflistung der einzelnen Stufen einer quantitativen PCR-Reaktion

Schritt	PCR Zyklus	Temperatur ( $^{\circ}$ C)	Zeit (s)
1	Heißer Start	95	600
2	Denaturierung	95	10
3	Primer-Anlagerung	x	10
4	Amplifikation	72	1 pro 25 bp
5	Aufnahmetemperatur	x	1
6	Schmelzen	95	0
		63	30
		95	0
7	Wdh. der Schritte 2-6 (44x)	-	-
8	Abkühlen	40	30

Die Anlagerungstemperaturen und Messpunkte der verschiedenen Primerpaare für die konventionelle sowie für die quantitative PCR sind Tabelle 2.4.3.3 zu entnehmen.

Tab. 2.4.3.3: Sequenzen, Anlagerungs- und Aufnahmetemperaturen der verschiedenen Primerpaare und die Fragmentgröße der resultierenden Amplifikate für die konventionelle und quantitative PCR

Primer	Anlagerungs-temperatur ( $^{\circ}$ C)	Aufnahme-temperatur ( $^{\circ}$ C)	Fragment-größe (bp)	Strang-Primer	Anti-Strang-Primer
$\beta$ 2M	60-52*	82	368	5'-GCT GTG CTC GCG CTA CTC TC-3'	5'-GCG GCA TCT TCA AAC CTC CAT-3'
CXCR3b	55	-	90	5'-TGC CAG GCC TTT ACA CAG C-3'	5'-TCG GCG TCA TTT AGC ACT TG-3'
GAPDH	68-59*	87	443	5'-GTC ATC ATC TCC GCC CCT TCT GC-3'	5'-GAT GCC TGC TTC ACC ACC TTC TTG-3'
IFN $\gamma$	58	82	493	5'-ATG AAA TAT ACA AGT TAT ATC TTG GCT TT-3'	5'-GAT GCT CTT CGA CCT CGA AAC AGC AT-3'
MCP-2	57	75	303	5'-TGC TGA AGC TCA CAC CCT TGC-3'	5'-TGG TCC AGA TGC TTC ATG GAA-3'
TLR2	65-52*	80	91	5'-GAA GAA TCC TCC AAT CAG GCT TC-3'	5'-GCC CTG AGG GAA TGG AGT TT-3'
TLR5	65-52*	80	141	5'-CCA TAG ATT TTT CCT CCA ACC AAA TA-3'	5'-TCA TAC ATT TTC CCC AGT CCA CT-3'
TNF $\alpha$	62-52*	80	409	5'-GGC TCC AGG CGG TGCTTG TTC-3'	5'-AGA CCG CGA TGC GGC TGA TG-3'

\* die Anlagerungstemperatur wurde pro Zyklus um 0.5 $^{\circ}$ C bis auf die angegebene Zieltemperatur gesenkt

#### 2.4.4 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese dient der Auftrennung von DNA-Molekülen anhand ihrer jeweiligen Größe in einer Agarose-Matrix. Die negativ geladenen DNA-Moleküle wandern in einem elektrischen Feld zum positiven Pol, wobei kleine Moleküle aufgrund des geringeren Widerstandes in der Matrix schneller wandern als größere Moleküle. Die entstandenen DNA-Banden werden dann mithilfe von interkalierendem Ethidiumbromid (EtBr) unter UV-Licht (320 nm) sichtbar gemacht.

Zur Herstellung eines Agarosegels wurde die Agarose in einer Konzentration von 2% (w/v) in 1x TBE-Puffer durch Aufkochen gelöst und anschließend durch vorsichtiges Rühren auf ca. 60°C abgekühlt. Danach wurden 5 µl EtBr-Lösung (1 µg/ml) in 100 ml flüssige Agarose gemischt und das Gel gegossen. Nach dem Aushärten wurden die Proben aufgetragen (8 µl Probe + 2 µl Beladungspuffer) und für 45-90 min eine Spannung von 80-120 Volt angelegt. Die Dokumentation des Gels erfolgte mithilfe des ChemiDoc Geldokumentationssystem (BioRad, München) und der Quantity One 4.1.1 Software (BioRad, München).

#### 2.4.5 cDNA Microarray-Analysen

Die cDNA Microarray-Analysetechnik dient der Untersuchung von Genexpressionsmustern in Form von RNA-Transkriptionsprofilen (oftmals themenorientiert) verschiedener Zelltypen oder unterschiedlicher Stimulationsbedingungen. In den Untersuchungen zu dieser Arbeit wurde diese Technik eingesetzt, um einen Überblick über die induzierte Regulation von Genen verschiedener Subpopulationen von Antigen-präsentierenden Zellen bei Anwesenheit unterschiedlicher Differenzierungs- bzw. Aktivierungssignale zu erhalten. Die verwendeten themenorientierten cDNA Microarrays werden jeweils in den Abbildungen im Ergebnisteil benannt.

Zum Zwecke von cDNA Microarray-Analysen wurden die APC unterschiedlich differenziert oder aktiviert und die RNA zu definierten Zeitpunkten isoliert (wie jeweils angezeigt). Zur statistischen Absicherung der cDNA Microarray-Analysen wurde die RNA aus drei unabhängigen Experimenten vereinigt (jeweils in gleichen Teilen 0,2 - 1,0 µg RNA/Spender und Ansatz). Erst hiernach erfolgte das Umschreiben der vereinigten RNA in cDNA mittels reverser Transkription und die anschließende Amplifikation der cDNA mittels PCR (AmpoLabelling Kit L-03; SuperArray Bioscience, USA). Gleichzeitig zur Amplifikation wurde die cDNA durch Einbau von P<sup>33</sup>-dCTP-Nukleotiden (Hartmann-Analytik) radioaktiv markiert.

Vor der Hybridisierung der PCR-Amplifikate auf die Arraymembranen wurde die cDNA 2 min bei 95°C denaturiert. Nach 18 h Hybridisierung bei 60°C wurden die Membranen mehrfach gewaschen, in Szintillationsfolien (PerkinElmer; Wellesley, USA) blasenfrei eingeschweißt und für 120 h bei Raumtemperatur auf PhosphorImage-Belichtungsplatten (Molecular Dynamics; Sunnyvale, USA) aufgelegt. Das Einlesen der belichteten Platten erfolgte anschließend mithilfe eines PhosphorImager SI (Molecular Dynamics; Sunnyvale, USA) und der ImageQuant Software (Molecular Dynamics; Sunnyvale, USA). Die abschließende mathematische Kalkulation der Rohdaten (Grideinteilung, Hintergrundsubtraktion, Datennormalisierung) erfolgte mithilfe der Phoretix Array v3.11 Software von Nonlinear Dynamics (Newcastle upon Tyne, GB).

### 2.4.6 RNase-Protektions-Assay

Die RNase-Protektions-Assays (RPA) wurden mittels RiboQuant™ Ribonuklease Protection-Assays (Becton Dickinson, Heidelberg) von PD Dr. T. Laskay (Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität zu Lübeck) nach den Vorgaben des Herstellers durchgeführt. Zur Synthese einer radioaktiv-markierten Anti-Strang-RNA-Sonde wurde ein Reaktionsgemisch (10 µl) bestehend aus 100 µCi [ $\alpha$ -<sup>33</sup>P] UTP (3000 Ci/mmol), UTP (6,1 mM), GTP, ATP, CTP (jedes Nukleotid jeweils 275 µM), DTT (10 mM), 40 U RNase-Inhibitor (Becton Dickinson, Heidelberg), 1x Transkriptionspuffer (Becton Dickinson, Heidelberg), 20 U T7 RNA-Polymerase sowie TLR1-10 kodierende, linealisierte Plasmide (kloniert von PD Dr. Tamas Laskay) zusammengegeben. Nach Inkubation des Reaktionsansatzes für 1 h bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von 2U DNase (Becton Dickinson, Heidelberg) abgestoppt. Die markierten Sonden wurden mittels Phenol/Chloroform extrahiert und in Ethanol gefällt. Die luftgetrockneten Anti-Strang-RNA-Sonden wurden in Hybridisierungspuffer gelöst und danach mit jeweils  $7 \times 10^6$  cpm zu den RNA-Proben gegeben. Die RNA-Proben wurden anschließend 3 min bei 90°C denaturiert und weitere 18 h bei 56°C hybridisiert. Einzelsträngige RNA wurde abschließend mittels 200 ng/ml RNase A und 600 U/ml RNase T1 (Becton Dickinson, Heidelberg) verdaut. Die RNase-geschützten Sonden konnten dann wie oben beschrieben extrahiert, gefällt und mittels denaturierender Harnstoff-Gelelektrophorese aufgetrennt werden. Die Gele wurden auf Phosphorimage-Belichtungsplatten (Molecular Dynamics; Sunnyvale, USA) aufgelegt, und das Einlesen der belichteten Platten erfolgte mithilfe eines Phosphorimager SI (Molecular Dynamics; Sunnyvale, USA) und der Image Quant Software (Molecular Dynamics; Sunnyvale, USA). Auch die abschließende mathematische Kalkulation der Rohdaten (Hintergrundsubtraktion, Datennormalisierung) erfolgte mithilfe der ImageQuant Software.

## 2.5 Biochemische Methoden

### 2.5.1 Konventionelle ELISA

Die quantitative Bestimmung der Konzentration von Zytokinen in den Kulturüberständen wurde unter anderem mithilfe von konventionellen ELISA verschiedener Hersteller durchgeführt. In Tabelle 2.5.1 sind die benutzten ELISA zusammenfassend aufgelistet. Die Durchführung wurde nach Herstellerprotokoll praktiziert und die Absorptionmessung der entwickelten ELISA erfolgte in einem ELX 800 Photometer (Biotek-Instruments; Winooski, USA) bei einer Wellenlänge von 450 nm mithilfe der Analysesoftware Mikrotek 2000 (Mikrotek; Overath).

Tab. 2.5.1: Übersicht über die verwendeten humanen ELISA und die jeweiligen Hersteller

Zytokin	Hersteller	Zytokin	Hersteller	Zytokin	Hersteller
IFN $\gamma$	eBioscience	IL-8	Pharmingen	MDC	R&D
IL-1 $\beta$	R&D	IL-10	eBioscience	MIF	R&D
IL-2	eBioscience	IL-12	eBioscience	MIP-1 $\alpha$	R&D
IL-4	eBioscience	IL-13	BenderMedSystems	MIP-1 $\beta$	R&D
IL-5	eBioscience	IP-10	Pharmingen	RANTES	R&D
IL-6	Dr. H. Gallati	MCP-1	R&D	TNF $\alpha$	eBioscience

Die Zytokinbestimmungen für IL-1 $\beta$  und IL-6 wurden von Dr. Martin Ernst (Immunzell-Analytik, Forschungszentrum Borstel) durchgeführt.

### 2.5.2 Multi-Zytokin ELISA

Zusätzlich zu oben genannten konventionellen ELISA wurden Multi-Zytokin ELISA zur Zytokinquantifizierung eingesetzt. Der Vorteil dieses Systems ist, dass eine Reihe verschiedener Zytokine (engl.: *cytokine panel*) simultan analysiert werden und somit das Volumen der jeweiligen Versuchsansätze reduziert werden kann. Bei den hier gezeigten Untersuchungen wurden Kulturüberstände aktivierter T-Zellen teilweise mithilfe des Human Bio-Plex T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-panel Multiplex-Assay (BioRad, München) simultan nach IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12p70, IL-13, GM-CSF, IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  analysiert. Des Weiteren wurden aufgrund geringer Zellausbeuten teilweise auch die Überstände aktivierter BDC mithilfe des Beadlyte®Human Multi-Cytokine Detection System 2 (Biomol, Hamburg) simultan nach IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 und TNF $\alpha$  analysiert. Die Durchführung und Messung der Multi-Zytokin Kits erfolgte nach Vorgaben der Herstellerprotokolle und mithilfe eines Bio-Plex System (Biorad, München) und der Manager Software 4.0 (Biorad, München).

### 2.5.3 Western-blot-Analysen

Die Untersuchungen zur intrazellulären Signalweiterleitung erfolgten unter anderem mittels Western-blot-Analysen in der Laborgruppe Angeborene Immunität (Forschungszentrum Borstel) durch PD Dr. H. Heine. Hierzu wurden die Zellen zunächst in Western-blot-Lysepuffer lysiert und der Proteingehalt mithilfe von RC-DC-Protein-Assays (Biorad, München) im Photometer bestimmt. Anschließend wurden die Proteinlysate für 5 min bei 95°C denaturiert und in gleichen Mengen auf NuPage Novex high-performance-Gele (Invitrogen; Leek, Niederlande) aufgetragen. Die Proteine wurden dann für 1 h bei 200 Volt unter reduzierenden Bedingungen (NuPage-Antioxidant; Invitrogen, Karlsruhe) in NuPage MOPS SDS-Puffer (Invitrogen; Leek, Niederlande) in einer Novex Mini-Cell (Invitrogen; Leek, Niederlande) aufgetrennt. Anschließend wurden die aufgetrennten Proteine auf PVDF-Membranen (Millipore, Schwalbach) übertragen und immunchemisch nachgewiesen. Hierzu erfolgte zunächst der Elektrotransfer der Proteine in einer Novex Mini-Cell (Invitrogen; Leek, Niederlande) nach Herstellerangaben in Transferpuffer für 1 bis 2 h bei 30 Volt. Anschließend wurden die transferierten Proteine mithilfe der in Tabelle 2.1.6 aufgelisteten Primär- und Sekundärantikörper immunchemisch detektiert. Hierzu wurden die PVDF-Membranen nach dem Transfer in 1x PBS gewaschen, danach 1 h in Blockpuffer (Odyssey Li-Cor; Lincoln, USA) bei Raumtemperatur geblockt und anschließend für 18 h bei 4°C mit den Primärantikörpern inkubiert. Nach mehrmaligem Waschen der Membran in T/PBS (0,1 % (v/v) Tween in 1x PBS) wurde für 1 h bei Raumtemperatur der Sekundärantikörper zur Membran gegeben. Erneut wurde die Membran mehrmals in T/PBS gewaschen, bevor sie mithilfe eines Scanners von Odyssey Li-Cor (Lincoln, USA) und der Odyssey Software v1.2 (Lincoln, USA) ausgewertet wurden.

#### 2.5.4 Immunfluoreszenzmarkierung für die Durchflusszytometrie

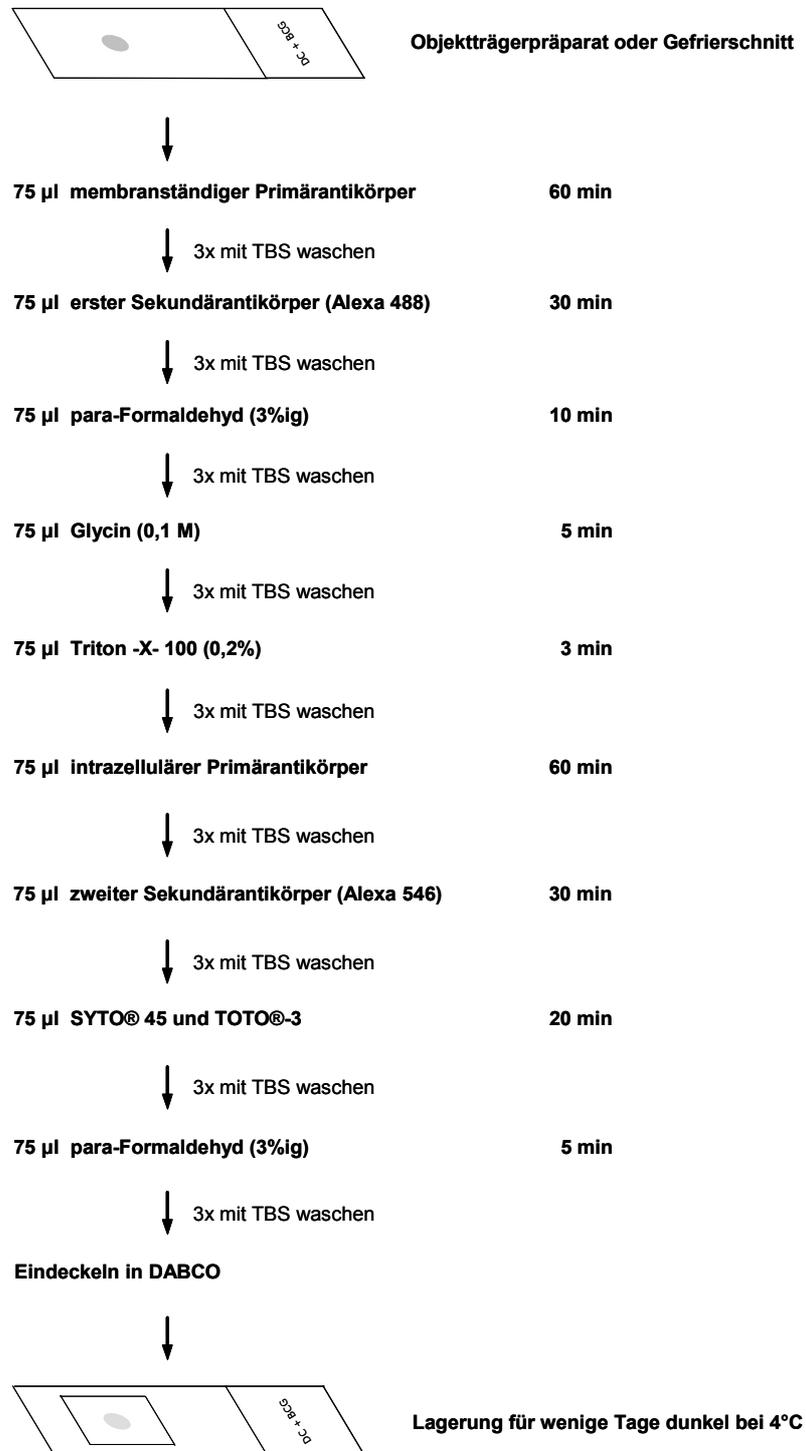
Um die verschiedenen APC-Subpopulationen immunphänotypisch zu charakterisieren, wurde die Expression diverser Oberflächenantigene in der Durchflusszytometrie analysiert. Hierzu wurden pro Färbeansatz 0,2 bis  $0,5 \times 10^6$  Zellen in Kunststoffröhrchen (Falcon Tubes; Becton Dickinson, Heidelberg) überführt und mit Azid-PBS gewaschen (5 min, 1200 Upm, 4°C). Danach wurde das Zellsediment in einer Azid-PBS-Lösung mit 3% Humanserum (v/v) zusammen mit FITC- oder PE-konjugierten monoklonalen Antikörpern resuspendiert und für 15 min bei 4°C inkubiert. Die Konzentration der in den jeweiligen Färbungen eingesetzten Antikörper ist Tabelle 2.1.4 zu entnehmen. Anschließend wurden die Zellen erneut in Azid-PBS gewaschen und das Zellpellet in 150 µl Azid-PBS resuspendiert. Bei nicht direkt konjugierten Primärantikörpern wurde in diesem Volumen für 15 min mit 1,5 µl FITC- oder PE-konjugierten Ziege  $\alpha$ -Maus-Antikörpern eine Sekundärfärbung durchgeführt, die Zellen erneut gewaschen und wieder in 150 µl resuspendiert. Zur abschließenden Fixierung der Antikörper an die spezifischen Epitope wurde das gleiche Volumen 3%iges para-Formaldehyd unter Schütteln hinzugegeben und der Ansatz innerhalb von fünf Tagen in einem Durchflusszytometer (FACS Calibur; Becton Dickinson, Heidelberg) gemessen. Die Spezifität der Bindung der monoklonalen Antikörper wurde im Vergleich zu unspezifischen Isotypen als Negativkontrolle überprüft. Die Analyse und Quantifizierung der Expression von Oberflächenantigenen erfolgte mithilfe der WinMDI 2.8 Software (J. Trotter; Scripps Institute, USA).

#### 2.5.5 Immunzytochemische Färbetechnik für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie

Der Nachweis von  $\text{IFN}\gamma$  und verschiedenen Oberflächenantigenen auf Objektträgerpräparaten humaner MoDC und auf Gefrierschnitten kryokonservierter Gewebebiopsien von Blasen-tumorpatienten erfolgte mithilfe immunzytochemischer Färbetechniken. Hierzu wurden humane MoDC bzw. PFAPC an Tag 5 bis Tag 7 ihrer Differenzierung mit BCG (MOI=1) bzw. mit BCG (MOI=1) in Kombination mit IL-12, IL-15 sowie IL-18 (jeweils 10 ng/ml) aktiviert bzw. verblieben unstimuliert. Nach 18 h Ausreifung wurden die Zellen geerntet, mit eiskaltem PBS gewaschen und in einer Konzentration von  $1 \times 10^6$  Zellen/ml in eiskaltem PBS gründlich suspendiert. Direkt im Anschluss wurden von den Zellen Objektträgerpräparate angefertigt, indem die Zellen in einer Zentrifuge (Cytospin 2; Shandon, GB) bei 200 Upm für 2 min auf Objektträger zentrifugiert wurden. Die Objektträgerpräparate wurden weitere 18 h bei Raumtemperatur getrocknet, bevor mit der eigentlichen immunzytochemischen Färbung begonnen wurde. Zum Zwecke eines *in vivo*-Nachweises von  $\text{C209}^+ \text{IFN}\gamma^+$  DC in Gewebebiopsien von Blasen-tumorpatienten wurden von den Gewebeproben mithilfe eines Mikrotom CM3000 (Leica, Bensheim) ultradünne Gefrierschnitte (max. 5 µm Stärke) auf Objektträgern angefertigt. Die Gefrierschnitte wurden entweder bei -70 C eingefroren oder zur direkten Verwendung für 30 min bei Raumtemperatur getrocknet, bevor mit der immunzytochemischen Färbung begonnen wurde.

Der exakte Ablauf der immunzytochemischen Färbeprozedur ist für Objektträgerpräparate und Gefrierschnitte identisch und in den einzelnen Arbeitsschritten schematisch in Abbildung 2.5.5 gezeigt. Die verwendeten Primär- und Sekundärantikörper sind bei den jeweiligen Abbildungen angezeigt und die Verdünnungen sind der Tabelle 2.1.5 zu entnehmen. Die mikroskopischen

Aufnahmen wurden mithilfe eines konfokalen Laserscanning-Mikroskop TCS SP (Leica, Bensheim) angefertigt und elektronisch in IrfanView (Version 3.92) und AdobePhotoshop (6.0) ausgewertet und weiterbearbeitet.



**Abb. 2.5.5:** Schematischer Ablauf der immunzytochemischen Färbungen für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie

## 3 Ergebnisse

Die vorliegende Arbeit befasst sich mit der Interaktion des inflammatorischen Thrombozytengenerierten Chemokins Plättchenfaktor 4 (PF-4) mit Antigen-präsentierenden Zellen. Die Daten beschreiben die durch PF-4 induzierten Effekte auf die Differenzierung von Antigen-präsentierenden Zellen aus monozytären Vorläufern, einschließlich der hieraus resultierenden funktionellen Auswirkungen auf die Polarisierung von T-Zellantworten. Zum besseren Vergleich der in dieser Arbeit gezeigten Experimente wurden die PF-4-differenzierten Antigen-präsentierenden Zellen in allen Versuchsansätzen grundsätzlich den bereits ausführlich charakterisierten GM-CSF/IL-4-differenzierten konventionellen DC (MoDC) gegenübergestellt. In einem weiteren Abschnitt wurden ferner immunmodulierende Effekte von PF-4 auf terminal differenzierte dendritische Zellen des peripheren Blutes (BDC) unter entzündlichen Bedingungen untersucht.

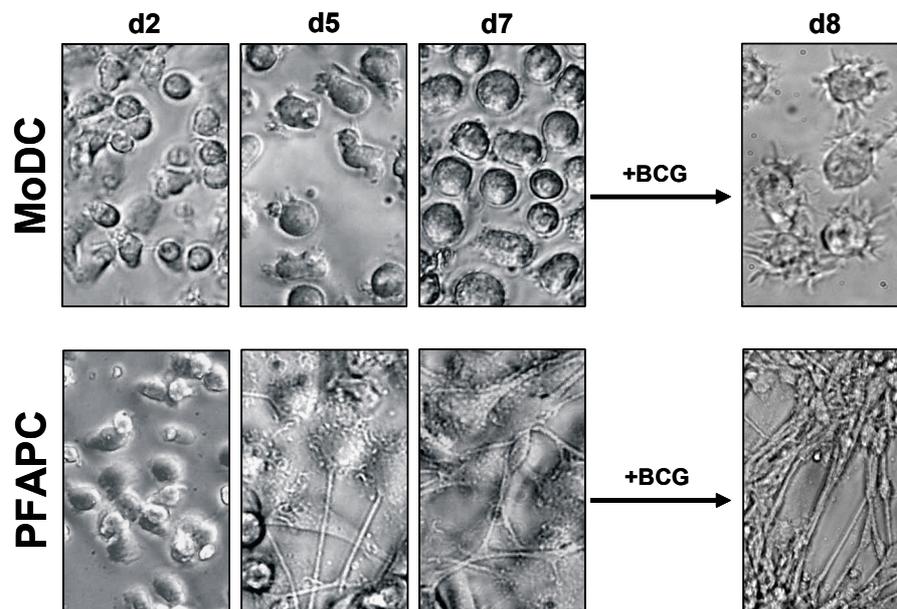
### 3.1 Plättchenfaktor 4-differenzierte Antigen-präsentierende Zellen

In vorangegangenen Arbeiten aus unserer Laborgruppe konnte gezeigt werden, dass PF-4 in Kombination mit IL-4 die Differenzierung von Monozyten zu Antigen-präsentierenden Zellen (PFAPC) induziert<sup>107</sup>. Diese Zellen sind in der Durchflusszytometrie durch einen spezifischen Phänotyp im Vergleich zu GM-CSF/IL-4-differenzierten MoDC oder den GM-CSF- bzw. PF-4-generierten Makrophagentypen (GM-M $\Phi$  bzw. PF-M $\Phi$ ) charakterisiert. Neben der Durchflusszytometrie stellt die Beurteilung von zellmorphologischen Veränderungen nach wie vor einen bedeutenden Parameter bei der Bewertung von Differenzierungsvorgängen Antigen-präsentierender Zellen (APC) dar.

#### 3.1.1 Morphologische Charakteristika von PFAPC

Anknüpfend an die vorangegangene initiale Phänotypisierung der PFAPC sind in Abbildung 3.1.1 mittels Phasenkontrast-Mikroskopie die morphologischen Veränderungen der GM-CSF/IL-4- bzw. PF-4/IL-4-differenzierten Monozyten dokumentiert. Hierbei wurden zusätzlich zu der sieben Tage währenden Differenzierungsphase auch die durch mikrobielle Ausreifung induzierten morphologischen Veränderungen einbezogen. Abbildung 3.1.1 (obere Reihe) zeigt im zeitlichen Verlauf die für MoDC typische Morphologie. Die Zellen waren bis zum zweiten Tag adhärent, lösten sich nachfolgend jedoch überwiegend ab und zeigten sich morphologisch einheitlich abgerundet. Nach Aktivierung durch *Mykobakterium bovis Bacillus-Calmette-Guérin* (BCG) wurden MoDC wiederum adhärent und bildeten deutlich erkennbare Dendriten aus. Im Gegensatz dazu blieben PFAPC während der gesamten Differenzierungsperiode stark adhärent und bildeten zudem ein komplexes Zellgeflecht mit ausgeprägten Pseudopodien (Abbildung 3.1.1, untere Reihe). Allgemein erschien die Zellmorphologie außerordentlich uneinheitlich. Nach Stimulation erzeugten PFAPC Zellhaufen, die durch lange Zellausläufer untereinander verbunden blieben. Sowohl MoDC als auch PFAPC zeigten nicht die typischen Veränderungen apoptotischer Monozyten, wie eine Verringerung des Zellvolumens oder eine granuläre Zellstruktur. Dieser

Befund wurde anhand von Zellzahlbestimmungen gestützt, da MoDC und PFAPC nach Differenzierung in vergleichbaren Zellzahlen vorlagen (Daten nicht gezeigt).



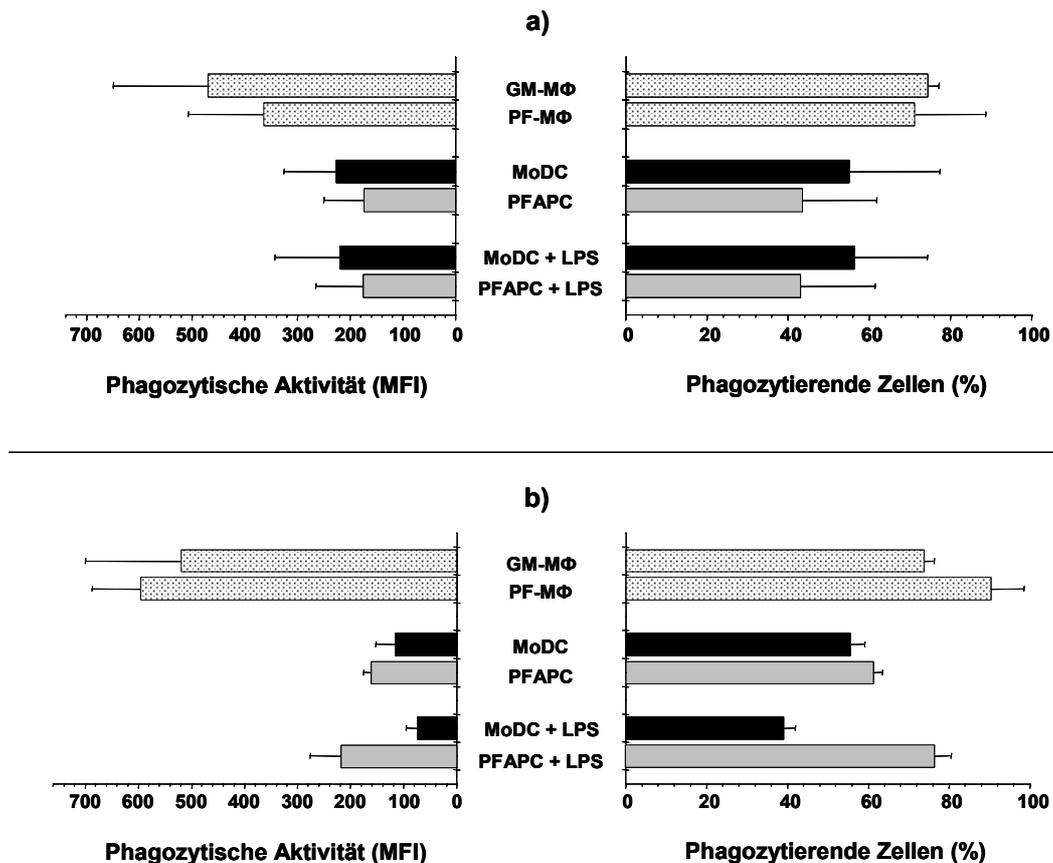
**Abbildung 3.1.1:** Zellmorphologische Veränderungen von MoDC und PFAPC während der Differenzierungsperiode. Monozyten wurden durch je 500 U/ml GM-CSF und IL-4 (MoDC) oder 4  $\mu$ M PF-4 und 500 U/ml IL-4 (PFAPC) über sieben Tage differenziert und zusätzlich an Tag 7 mit BCG (MOI=1) für 24h stimuliert. Phasenkontrast-mikroskopische Fotografien wurden bei 40facher bzw. 25facher Vergrößerung (unten ganz rechts) aufgenommen.

Scheuerer *et al.*<sup>97</sup> haben gezeigt, dass die alleinige Applikation von PF-4 innerhalb von drei Tagen die Differenzierung von Monozyten zu PF-M $\Phi$  induziert. Anhand der in Abb. 3.1.1 gezeigten Zellmorphologie kann jedoch nicht beurteilt werden, ob PFAPC diesen PF-M $\Phi$  ähneln, also eher Makrophagencharakter besitzen, oder ob diese Zellen eher dendritischen Zellen vergleichbar sind oder auch einen Mischtyp aus beiden Zelltypen (Dendrophagen) darstellen.

### 3.1.2 Phagozytoseaktivität von PFAPC

Um abschätzen zu können, ob PFAPC eher M $\Phi$  oder MoDC zuzuordnen sind, wurde in einer ersten funktionellen Analyse die Phagozytoseaktivität von PFAPC untersucht. Die Aufnahme exogenen Materials stellt eine wesentliche Funktion unreifer MoDC, aber insbesondere auch von M $\Phi$  dar. Die unspezifische Phagozytose von Latexkugeln durch PFAPC wurde hierbei zu einem frühen Zeitpunkt (Tag 3) und zu einem späten Zeitpunkt (Tag 7) der Differenzierung in Relation zu den MoDC, GM-M $\Phi$  und den PF-M $\Phi$  untersucht. Diese Zeitpunkte wurden gewählt, da *in vitro* generierte M $\Phi$  im Allgemeinen über einen Zeitraum von drei Tagen differenzieren. Konventionelle MoDC werden dagegen über sieben Tage differenziert, so dass dieser Zeitpunkt ebenfalls in die Untersuchungen mit einbezogen wurde. Zusätzlich wurden sowohl die MoDC als auch die PFAPC phagozytoseunabhängig durch Lipopolysaccharid (LPS) für 24 h vor Verwendung im Phagozytose-Assay ausgereift. Es ist bekannt, dass die Phagozytoseaktivität stimulierter MoDC nachlässt, da diese Zellen nach Aktivierung im Gegensatz zu M $\Phi$  vornehmlich Antigen-präsentierende Funktionen übernehmen<sup>12</sup>. In Abbildung 3.1.2 ist die Phagozytoseaktivität der einzelnen Zelltypen an Tag 3 (a) und an Tag 7 (b) der Differenzierung gezeigt. Diese Experimente

zur Phagozytoseaktivität wurden von PD Dr. F. Petersen (Biochemische Immunologie, Forschungszentrum Borstel) durchgeführt.



**Abbildung 3.1.2: Phagozytoseleistung unterschiedlicher Makrophagen und APC.** Die Phagozytoseaktivität und der relative Anteil phagozytierender Zellen von GM-MΦ (500 U/ml GM-CSF) und PF-MΦ (4 μM PF-4) im Vergleich zu MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) und PFAPC (4 μM PF-4 + 500 U/ml IL-4) wurde durchflusszytometrisch an Tag 3 (a) und Tag 7 (b) der Differenzierung analysiert. MoDC und PFAPC wurden zusätzlich an Tag 2 und Tag 6 der Differenzierung für 24 h mit 10 ng/ml LPS aktiviert bzw. unbehandelt gelassen. Dieses Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

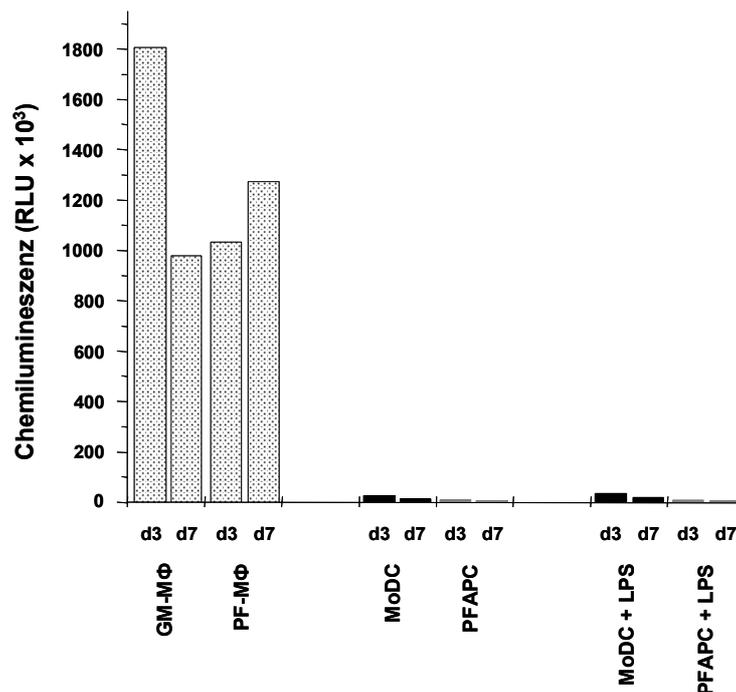
Wie in Abbildung 3.1.2 dargestellt zeigte sich, dass MoDC und PFAPC sowohl an Tag 3 als auch an Tag 7 der Differenzierung vergleichbare Phagozytoseaktivität aufwiesen, wobei auch der Anteil phagozytierender Zellen vergleichbar blieb. Im Gegensatz zu den parallel differenzierten MΦ war die Aktivität jedoch sowohl für MoDC als auch PFAPC zu beiden Zeitpunkten deutlich geringer. Die LPS-induzierte Ausreifung von MoDC und PFAPC hatte an Tag 3 keinen signifikanten Effekt, während ausgereifte MoDC an Tag 7 wie erwartet einen deutlichen Rückgang der Phagozytoseaktivität aufwiesen. Im Gegensatz zu den MoDC resultierte die Ausreifung von PFAPC durch LPS tendenziell in einer Steigerung der Phagozytoserate.

### 3.1.3 Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite durch PFAPC

Anhand der Fähigkeit zur Phagozytose ließen sich die untersuchten Zelltypen funktionell nicht eindeutig zuordnen. Zwar konnten zwischen ausgereiften MoDC und PFAPC unterschiedliche Phagozytoseeigenschaften identifiziert werden, eine funktionelle Unterscheidung zu den jeweiligen MΦ war soweit allerdings nicht möglich, da sowohl MΦ als auch APC Phagozytose-

aktivität zeigten. Um PFAPC weiterführend funktionell zu charakterisieren wurde deshalb die für M $\Phi$  spezifische Fähigkeit zur Produktion von Sauerstoffradikalen untersucht. Die Synthese von Sauerstoffradikalen ist für M $\Phi$  von besonderer Bedeutung, da diese Zellen der angeborenen Immunität nach Aktivierung primär die Eliminierung endozytierter Pathogene zur Aufgabe haben. DC sind zur Radikalbildung metabolisch nicht in der Lage, da diese Zellen nach Pathogenaufnahme vornehmlich Antigen-präsentierende Aufgaben übernehmen.

Abbildung 3.1.3 zeigt die Produktion von Sauerstoffradikalen durch MoDC und PFAPC im Vergleich zu GM-M $\Phi$  und PF-M $\Phi$ , gemessen in einem Chemilumineszenz-Assay. Diese Experimente wurden von PD Dr. F. Petersen (Biochemische Immunologie, Forschungszentrum Borstel) durchgeführt. Die gezeigten Daten offenbaren deutliche funktionelle Unterschiede zwischen GM-M $\Phi$  und PF-M $\Phi$  auf der einen und MoDC sowie PFAPC auf der anderen Seite. Beide Makrophagentypen produzierten erwartungsgemäß substanzielle Mengen radikalischer Sauerstoffmetabolite an beiden Differenzierungszeitpunkten. MoDC ebenso wie PFAPC waren jedoch sogar nach LPS-Stimulation hierzu nicht befähigt und sind dadurch von Makrophagen klar zu unterscheiden. Aufgrund dieses funktionellen Unterschiedes wurden die Makrophagen aus den nachfolgenden Analysen ausgeklammert.



**Abbildung 3.1.3: Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite durch verschiedene Makrophagen und APC.** Die Freisetzung von Sauerstoffradikalen durch MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) und PFAPC (4  $\mu$ M PF-4 + 500 U/ml IL-4) wurde im Vergleich zu GM-M $\Phi$  (500 U/ml GM-CSF) und PF-M $\Phi$  (4  $\mu$ M PF-4) an Tag 3 und Tag 7 der Differenzierung gemessen und ist in relativen Lichteinheiten (RLU) dargestellt. MoDC und PFAPC wurden zusätzlich an Tag 2 und Tag 6 der Differenzierung für 24 h mit 10 ng/ml LPS aktiviert bzw. unbehandelt gelassen. Dieses Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

Dieser Befund konnte mithilfe der bereits oben erwähnten initialen Phänotypisierungen der PFAPC und MoDC im Vergleich zu den jeweiligen Makrophagen gestützt werden<sup>107</sup>. Bereits bei diesen initialen durchflusszytometrischen Experimenten deutete sich an, dass PFAPC nicht dem

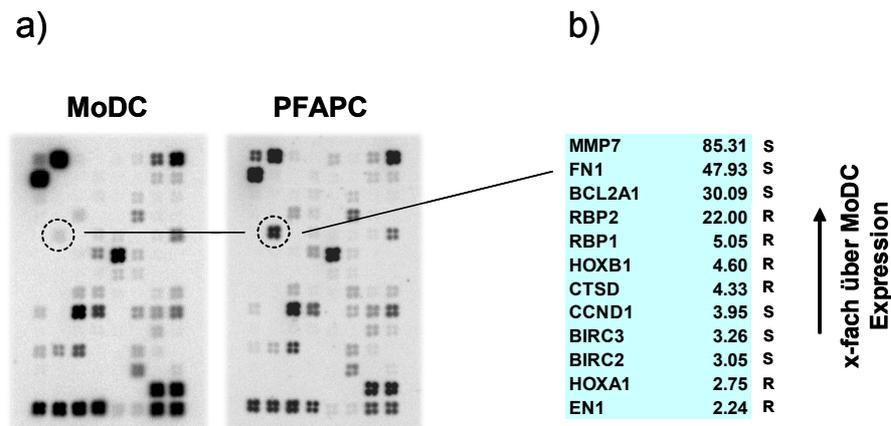
typischen Phänotyp von klassischen Makrophagen entsprechen, denn PFAPC waren bereits nach kurzer *in vitro*-Differenzierung negativ für CD14 bei gleichzeitiger Induktion des charakteristischen DC-Markers CD209. Des Weiteren wurden bei diesen Analysen jedoch auch Unterschiede zu MoDC aufgezeigt. So exprimierten PFAPC im Gegensatz zu MoDC zwar kein CD1a, dafür jedoch zu frühen Differenzierungszeitpunkten konstitutiv den DC-Aktivierungsmarker CD83 und in großen Mengen CD86. Diese Oberflächenmoleküle sind üblicherweise auf unreifen MoDC nicht bzw. nur schwach exprimiert.

### 3.1.4 Analysen des konstitutiven Aktivierungsstatus von PFAPC

Die Expression von CD83 und CD86 gilt als Indiz für eine vollständige Ausreifung von DC und damit einhergehend werden Transkriptionsfaktoren wie NF $\kappa$ B durch Phosphorylierung aktiviert. Die Translokation von aktiviertem NF $\kappa$ B in den Zellkern der DC induziert anschließend unter anderem die Transkription inflammatorischer Zytokine und ist somit für die Initiierung von Immunantworten von großer Bedeutung.

#### 3.1.4.1 PFAPC sind ohne mikrobielle Stimulation auf molekularer Ebene voraktiviert

Aufgrund der konstitutiven Expression von CD83 und CD86 auf unstimulierten PFAPC sollte mithilfe von cDNA Microarray-Analysen ein umfassender Überblick über das RNA-Transkriptionsprofil dieser Zellen in Bezug auf die Induktion von Genen, die bei Signaltransduktionen involviert sind, hergestellt werden. Es sollte untersucht werden, durch welchen Aktivierungsstatus unstimulierte PFAPC auf molekularer Ebene charakterisiert sind. Bei allen in dieser Arbeit gezeigten Microarray-Analysen wurden Zellen nach drei Tagen Differenzierung verwendet, da PFAPC zu diesem Zeitpunkt ein hohes immunstimulatorisches Potenzial besaßen und zudem transient CD83 exprimierten. Außerdem wurden den PFAPC konventionelle MoDC gegenübergestellt, da zur weiterführenden Charakterisierung der PFAPC etwaige immunbiologische Differenzen zwischen diesen beiden Zellpopulationen herausgestellt werden sollten. In Abbildung 3.1.4.1 a sind die Arraymembranen der unstimulierten MoDC neben denen der PFAPC dargestellt. Fibronectin 1 (FN1) ist exemplarisch zur Verdeutlichung der unterschiedlichen Signalintensitäten durch Kreise hervorgehoben. In Abbildung 3.1.4.1 b ist eine Auswahl der regulierten Gene als x-fach über das Niveau von MoDC gezeigt. Eine vollständige Auflistung der zwischen MoDC und PFAPC unterschiedlich regulierten Gene befindet sich im Anhang in Tabelle A.1. Darüber hinaus ist im Anhang in Tabelle A.2 eine Gruppierung der einzelnen Gene in die jeweiligen Stoffwechselfade dargestellt. Die Abbildung 3.1.4.1 zeigt, dass generell die mRNA einer Reihe von Signaltransduktionsgenen in PFAPC vielfach über das Niveau von MoDC induziert war. Es muss an dieser Stelle betont werden, dass die PFAPC hierbei nicht durch weitere Stimuli aktiviert wurden.



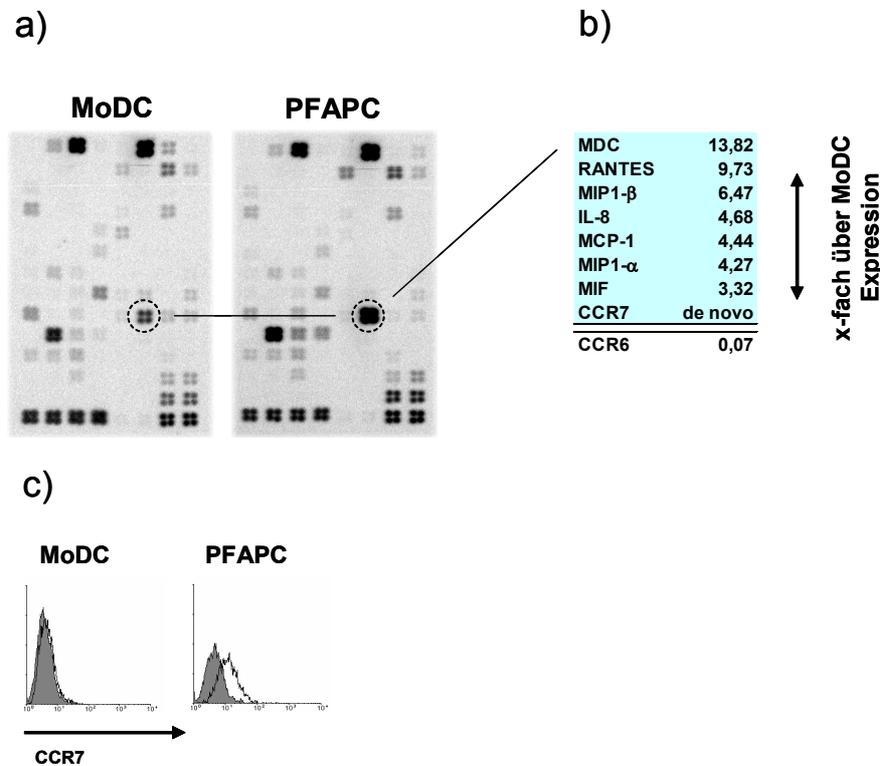
**Abbildung 3.1.4.1: Microarray-Analyse des mRNA-Transkriptionsprofils von Genen der Signaltransduktionswege in unstimulierten PFAPC und MoDC.** Die RNA von unstimulierten PFAPC (4  $\mu$ M PF-4 + 500 U/ml IL-4) und MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) dreier unabhängiger Spender wurde jeweils an Tag 3 der Differenzierung isoliert, direkt vor der radioaktiven Markierung mittels [ $^{33}$ P] vereinigt und auf die Membranen (*Human Signal Transduction PathwayFinder Gene Array*; Superarray) hybridisiert. In (a) sind die Arraymembranen nach der Hybridisierung gezeigt. (b) Darstellung der gegen das Haushaltsgen (PP1A) normalisierten Genregulation in PFAPC als x-fach reguliert in Relation zu MoDC. Die unterschiedliche Regulation von Fibronectin 1 (FN1) ist exemplarisch durch Kreise hervorgehoben. Mit S gekennzeichnete Gene sind im Überleben-Stoffwechselweg gruppiert; mit R markierte Gene gehören zum Retinolsäure-Stoffwechsel.

Zusammengefasst zeigen diese Daten eine Induktion diverser Signaltransduktionsgene und geben damit einen deutlichen Hinweis auf eine ausgeprägte konstitutive Aktivierung von PFAPC auf molekularer Ebene, wobei die in PFAPC induzierten Gene vorwiegend dem Überleben- und dem Retinolsäure-Stoffwechselweg zuzuordnen waren<sup>115,116</sup>. Im Gegensatz dazu waren die Gene des typisch proinflammatorischen NF $\kappa$ B-Signalweges weder in PFAPC noch in MoDC induziert.

### 3.1.4.2 PFAPC exprimieren konstitutiv eine Reihe inflammatorischer Chemokine

Nachdem in PFAPC auf molekularer Ebene an Tag 3 der Differenzierung eine konstitutive Expression verschiedener Stoffwechselwege festgestellt werden konnte, sollte anhand einer weiteren cDNA Microarray-Analyse ein Überblick über das zu diesem Zeitpunkt von unstimulierten PFAPC induzierte inflammatorische Zytokinprofil hergestellt werden. Wie in Abbildung 3.1.4.2 dargestellt, war tatsächlich eine Vielzahl inflammatorischer Mediatoren in PFAPC auf mRNA-Ebene exprimiert. Von besonderem Interesse sind hierbei MDC/CCL22 (13,8fach über mRNA-Expressionsniveau von MoDC), RANTES/CCL5 (9,7fach über MoDC), MIP-1 $\alpha$ /CCL3 (4,3fach über MoDC) und MIP-1 $\beta$ /CCL4 (6,5fach über MoDC), IL-8/CXCL8 (4,7fach über MoDC), MCP-1/CCL2 (4,4fach über MoDC) und MIF (3,3fach über MoDC). Im Anhang findet sich in Tabelle A.3 eine vollständige Auflistung der unterschiedlich regulierten Gene. Interessant war auch die konstitutive Induktion von CCR7-mRNA in PFAPC. Dieser Rezeptor ist auf MoDC typischerweise erst nach bakterieller Ausreifung exprimiert, da die Chemokinrezeptorachsen ELC/CCR7 bzw. SLC/CCR7 die Wanderung antigenbeladener, reifer DC durch afferente Lymphgefäße in Richtung Lymphknoten dirigieren<sup>24</sup>. Auf der anderen Seite war die Transkription

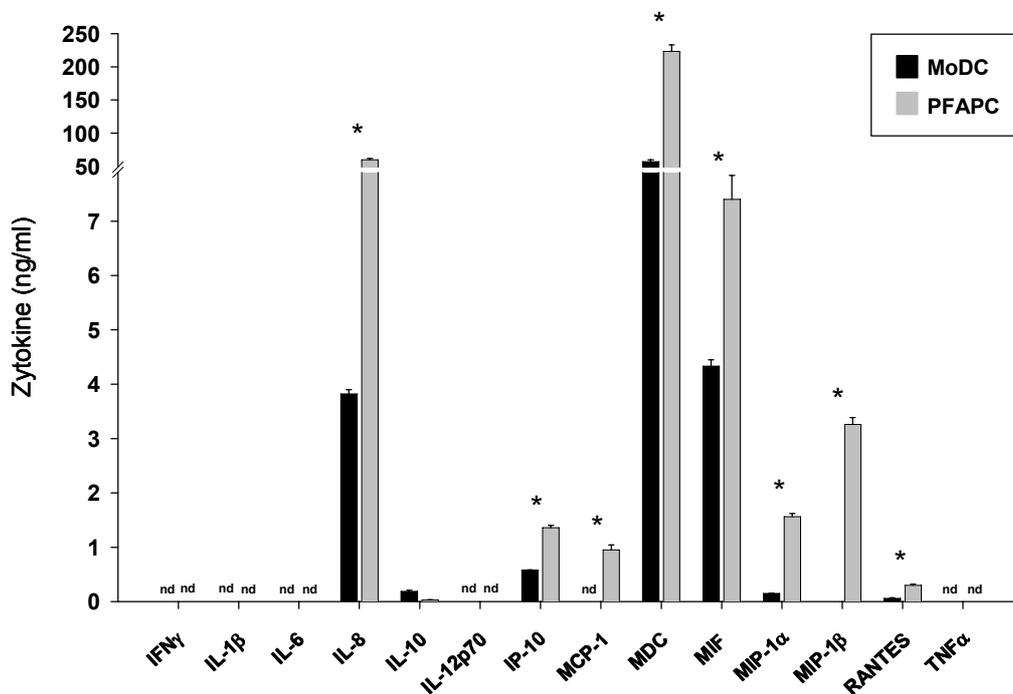
von CCR6 in PFAPC weitestgehend runterreguliert. CCR6 ist ein spezifischer Rezeptor für inflammatorisches MIP-3 $\alpha$ . Dieser Rezeptor ist üblicherweise auf unstimulierten MoDC exprimiert und wird erst nach vollständiger Ausreifung herabreguliert<sup>117</sup>. In Abbildung 3.1.4.2 c ist darüber hinaus gezeigt, dass die konstitutive Expression von CCR7 auf PFAPC an Tag 3 der Differenzierung auch auf Proteinebene in der Durchflusszytometrie bestätigt werden konnte.



**Abbildung 3.1.4.2: Microarray-Analyse des mRNA-Transkriptionsprofils inflammatorischer Zytokine und dazugehöriger Rezeptoren in unstimulierten PFAPC und MoDC.** Die RNA von unstimulierten PFAPC (4  $\mu$ M PF-4 + 500 U/ml IL-4) und MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) dreier unabhängiger Spender wurde jeweils an Tag 3 der Differenzierung isoliert, direkt vor der radioaktiven Markierung mittels [<sup>33</sup>P] vereinigt und auf die Membranen (*Human Inflammatory Cytokines & Receptors Gene Array*; Superarray) hybridisiert. Neben den Membranen (a) erfolgt die Darstellung der gegen das Haushaltsgen (PPIA) normalisierten Genregulation in PFAPC als x-fach reguliert in Relation zu MoDC (b). Die unterschiedliche Regulation von MDC ist exemplarisch durch Kreise hervorgehoben. (c) Durchflusszytometrische Analyse der konstitutiven Expression von CCR7 auf MoDC und PFAPC an Tag 3 der Differenzierung. Die offenen Histogramme stellen die spezifische Färbung dar; grau hinterlegte Histogramme stellen die Isotyp-Kontrolle dar.

Um die mithilfe der cDNA Microarray-Analysen gewonnenen Hinweise bezüglich des konstitutiven mRNA-Transkriptionsprofils inflammatorischer Chemokine von PFAPC an Tag 3 der Differenzierung zu bestätigen, wurden umfangreiche Zytokinmessungen mittels ELISA-Technik durchgeführt. Eine zusammenfassende Darstellung der so erhaltenen Messdaten ist in Abbildung 3.1.4.3 gezeigt. Wie aufgrund der Microarray-Analysen erwartet, waren weder in den Zellkulturüberständen unstimulierter MoDC noch bei unstimulierten PFAPC die typisch proinflammatorischen oder T<sub>H</sub>1-polarisierenden Zytokine IFN $\gamma$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12p70 oder TNF $\alpha$  nachweisbar. Auf der anderen Seite, wiederum wie aufgrund der Microarray-Daten erwartet, produzierten PFAPC konstitutiv erhebliche Mengen der inflammatorischen Chemokine MDC (223,5 ng/ml), RANTES (300 pg/ml), MIP-1 $\alpha$  (1,56 ng/ml), MIP-1 $\beta$  (3,26 ng/ml), IL-8 (59,98 ng/ml), MCP-1 (950 pg/ml), MIF (7,4 ng/ml)

und IP-10 (1,36 ng/ml). Diese Chemokine wurden von MoDC entweder nicht oder in wesentlich geringeren Mengen sezerniert.



**Abbildung 3.1.4.3: Konstitutive Produktion inflammatorischer Zytokine durch PFAPC und MoDC.** Zellkulturüberstände von unstimulierten PFAPC (4  $\mu$ M PF-4 + 500 U/ml IL-4) und MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) wurden an Tag 3 der Differenzierung für ELISA-Messungen verwendet. Das Experiment wurde achtmal durchgeführt; dargestellt sind repräsentative Messwerte als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikates. Die statistische Signifikanz ( $p$ -Wert < 0,05) der unterschiedlichen Zytokinproduktion zwischen MoDC und PFAPC wurde mithilfe des Student t-Test bestätigt und ist in der Abbildung jeweils durch \* angezeigt.

An dieser Stelle kann zusammengefasst werden, dass PF-4 in Kombination mit IL-4 die Differenzierung von Monozyten in Antigen-präsentierende Zellen induziert, die phänotypisch und funktionell jedoch nicht als Makrophagen zu bewerten sind. Obwohl PFAPC insbesondere nach Ausreifung sehr hohe Phagozytoseaktivität aufwiesen, konnten PFAPC genau wie MoDC keine reaktiven Sauerstoffmetabolite synthetisieren. Des Weiteren konnte mithilfe von cDNA Microarray-Analysen und verifizierenden ELISA-Messungen eine spezifische Aktivierung von PFAPC kombiniert mit der Induktion eines charakteristischen inflammatorischen Chemokinprofils an Tag 3 der Differenzierung nachgewiesen werden. Die konstitutive Aktivierung von PFAPC war hierbei bereits ohne Induktion durch mikrobielle Stimuli vorhanden.

### 3.1.5 Aktivierbarkeit von PFAPC durch mikrobielle Stimulation

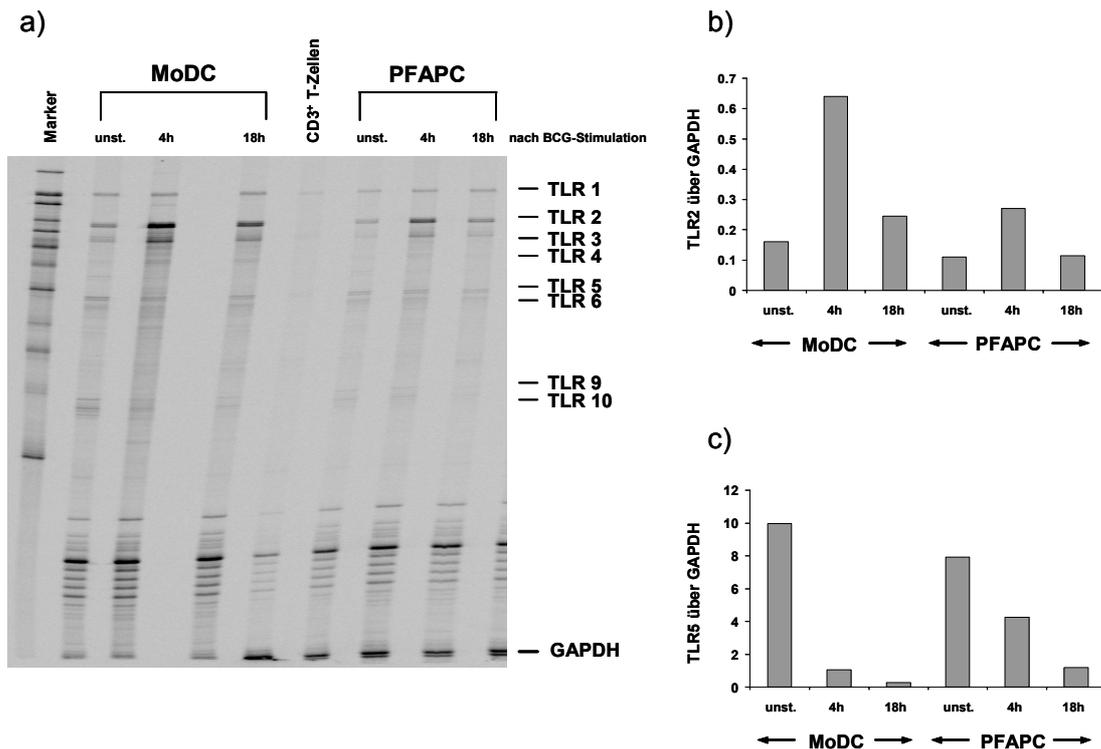
Eine wesentliche Aufgabe von in der Peripherie patrouillierenden DC ist die Erkennung und Prozessierung von mikrobiellen Pathogenen. DC sind aus diesem Grund mit keimbahnkodierten Mustererkennungsrezeptoren, wie beispielsweise den *toll-like*-Rezeptoren (TLR) ausgerüstet. Die Aktivierung von TLR induziert ein spezifisches Ausreifungsprogramm in den DC, damit nachfolgende Immunantworten ausgelöst und gesteuert werden können. Aus diesem Grund wird das

exprimierte Repertoire an TLR sowie in funktionellen Studien auch die Aktivierbarkeit von PFAPC durch mikrobielle Interaktion wieder im Vergleich zu MoDC analysiert.

#### 3.1.5.1 PFAPC und MoDC exprimieren ein identisches Repertoire von TLR-mRNA

Die Effizienz sowie das Spektrum der Erkennung von Pathogenen durch APC ist an das exprimierte Repertoire der verschiedenen TLR-Moleküle gekoppelt. Deshalb wurde in RNase-Protektions-Assays (RPA) die Expression von TLR-Molekülen in PFAPC untersucht. Diese RPA-Analysen wurden von PD Dr. T. Laskay (Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Universität zu Lübeck) durchgeführt. Mithilfe dieser Experimente sollte geklärt werden, ob PFAPC durch Expression dieser Rezeptoren das Potenzial zur TLR-vermittelten Pathogenerkennung besitzen und ob Unterschiede zum Expressionsmuster von MoDC bestehen. Zusätzlich wurden die APC in einer Zeitkinetik mit BCG-Mykobakterien für 4 h bzw. 18 h aktiviert, um Hinweise auf eine Regulation der TLR-Expression während der zellulären Ausreifung zu erhalten.

In Abbildung 3.1.5.1 a ist ein RPA mit Hybridisierungssonden gegen mRNA von humanen TLR1-10 dargestellt. PFAPC exprimierten konstitutiv ein identisches Repertoire an TLR-mRNA im Vergleich zu MoDC an Tag 5 der Differenzierung. Nachweisbar waren TLR1 bis TLR6 sowie eine schwache Expression von TLR9 und TLR10. Als Negativkontrolle wurden hochaufgereinigte CD3<sup>+</sup> T-Zellen verwendet, welche keine Signale lieferten. Der Nachweis von RNA-Signalen für TLR7 und TLR8 war aufgrund methodischer Limitierung des RPA nicht möglich. Zudem ist anzumerken, dass myeloide MoDC bekanntermaßen kein funktionelles TLR9 exprimieren. Die schwachen RNA-Signale für diesen *toll-like*-Rezeptor in PFAPC und MoDC sind daher möglicherweise artifiziell. Interessanterweise wurde TLR2, der hauptsächlich bei der Erkennung von BCG beteiligte TLR, nach Aktivierung durch diese Bakterien innerhalb von 4 h sowohl in MoDC als auch in PFAPC induziert. Diese induzierte Regulation war jedoch in MoDC deutlicher ausgeprägt als in PFAPC. Zum späteren Stimulationszeitpunkt (18 h nach Aktivierung) wurde die Expression von TLR2-mRNA in beiden Zelltypen wieder auf das Ausgangsniveau unstimulierter Zellen herabreguliert. Die übrigen bei der Erkennung von BCG nicht relevanten TLR wurden dahingegen während der Ausreifung kontinuierlich herabreguliert. TLR3 bildete hierbei jedoch eine Ausnahme, da die mRNA dieses Rezeptors vergleichbar zu TLR2 transient induziert wurde. Das Bandenprofil für die verschiedenen TLR während der Ausreifung ist in Teil a) der Abbildung 3.1.5.1 dargestellt. Des Weiteren zeigt Abbildung 3.1.5.1 eine quantitative PCR der Regulation von TLR2 (b) und TLR5 (c) zur Verifizierung der mittels RPA erzielten Ergebnisse. Anhand der quantitativen PCR konnten die Ergebnisse des RPA sowohl in Bezug auf die konstitutive Expression als auch für die BCG-induzierte Regulation der TLR bestätigt werden.



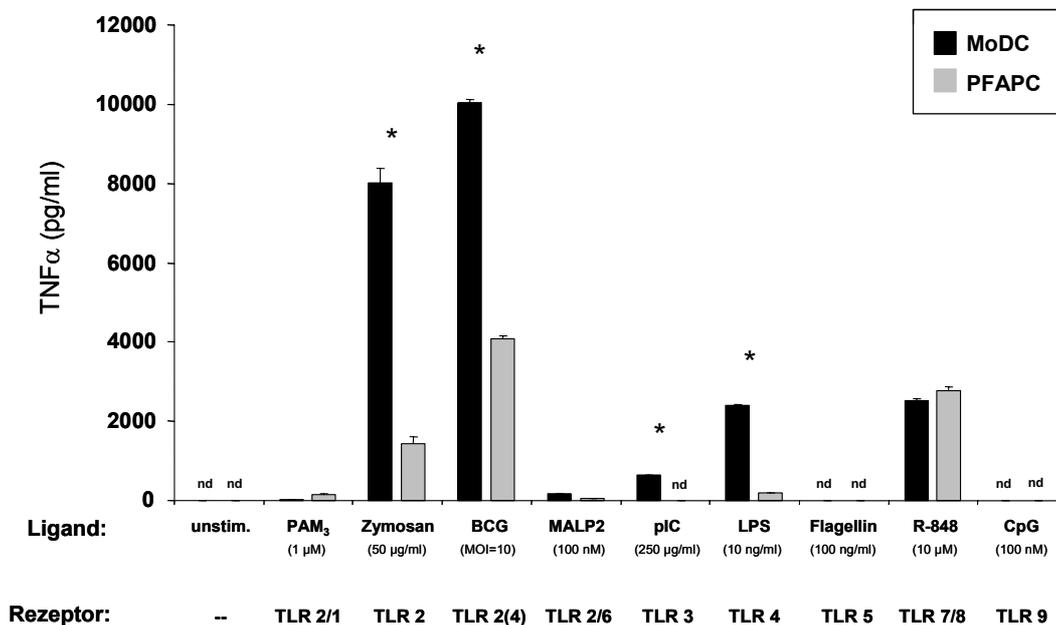
**Abbildung 3.1.5.1: TLR-Expressionsanalyse in PFAPC und MoDC.** (a) RNAse-Protektions-Assay (RPA) zur Analyse der konstitutiven und induzierten Expression von TLR1-10 mRNA in MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) und PFAPC (4  $\mu$ M PF-4 + 500 U/ml IL-4) an Tag 6 der Differenzierung. Die Zellen wurden an Tag 5 entweder direkt verwendet oder für weitere 4 h bzw. 18 h durch BCG (MOI=1) aktiviert. Als Negativkontrolle wurde die RNA von CD3<sup>+</sup> MACS-aufgereinigten T-Zellen verwendet. Die Expression von TLR2 (b) und TLR5 (c) wurde zudem konstitutiv sowie 4 h und 18 h nach BCG-Stimulation mittels quantitativer PCR zur Verifizierung des RPA analysiert. In RPA sowie quantitativer PCR wurde die RNA von 3 unterschiedlichen Spendern vor Versuchsdurchführung vereinigt.

Nachdem anhand der vorangegangenen Expressionsanalysen gezeigt werden konnte, dass PFAPC genau wie MoDC ein typisch myeloides Spektrum an TLR-Molekülen exprimierten, sollte hierauf aufbauend das inflammatorische Potenzial dieser Zellen nach TLR-induzierter Aktivierung untersucht werden.

### 3.1.5.2 PFAPC sezernieren nach TLR-Ligation geringe Mengen $TNF\alpha$

Die Aktivierbarkeit durch mikrobielle Komponenten ist ein entscheidender Parameter bei der Beurteilung von DC-spezifischen Funktionen und war somit wichtiger Gegenstand der hier vorgestellten vergleichenden Charakterisierung von PFAPC und MoDC. MoDC produzieren im Allgemeinen nach mikrobieller Aktivierung substantielle Mengen proinflammatorischer Zytokine. Aus diesem Grund wurde als klassisches proinflammatorisches Zytokin  $TNF\alpha$  als funktioneller Parameter für die Aktivierbarkeit von PFAPC ausgewählt. Stimuliert wurden PFAPC ebenso wie MoDC hierbei TLR-abhängig durch eine Reihe unterschiedlicher Pathogen-assoziiertes molekularer Muster (PAMP) in verschiedenen Konzentrationsbereichen. Mithilfe dieser funktionellen Assays sollte geklärt werden, ob PFAPC prinzipiell vergleichbar zu MoDC durch mikrobielle Stimuli aktivierbar sind. Des Weiteren sollte untersucht werden, ob PFAPC und MoDC aufgrund unterschiedlicher Sekretion von  $TNF\alpha$  verschiedenartig auf die Aktivierung einzelner TLR

reagieren. Zusätzlich wurde durch Titrationen der verschiedenen Stimuli auch die Sensitivität von PFAPC bei der Wahrnehmung bakterieller Signale im Vergleich zu MoDC geprüft (Daten nicht gezeigt). In Abbildung 3.1.5.2 ist das inflammatorische Potenzial von PFAPC im Vergleich zu MoDC in Bezug auf die Sezernierung von  $\text{TNF}\alpha$  nach 18 h Stimulation mit verschiedenen mikrobiellen Strukturmotiven in ihren jeweils optimalen Konzentrationen gezeigt. Es zeigte sich, dass PFAPC im Vergleich zu MoDC generell mit sehr geringer Produktion von proinflammatorischem  $\text{TNF}\alpha$  auf die verschiedenen mikrobiellen Stimuli reagierten. Hierbei waren  $\text{PAM}_3$ , MALP2, Flagellin und CpG in beiden Zelltypen schwache  $\text{TNF}\alpha$ -Induktoren. Durch Zymosan, BCG, pIC und LPS ließen sich dagegen substantielle Mengen  $\text{TNF}\alpha$  nur in MoDC, nicht aber in PFAPC induzieren. Hervorzuheben bleibt, dass nur bei Stimulation durch R-848<sup>109;110</sup> vergleichbare Mengen  $\text{TNF}\alpha$  sowohl in MoDC als auch in PFAPC induziert wurden. Interessanterweise wiesen beide Zelltypen keine Unterschiede in der Sensitivität gegenüber den einzelnen Stimuli auf (Daten nicht gezeigt). Die jeweilige Konzentration der entsprechenden Stimuli, die eine maximale Freisetzung von  $\text{TNF}\alpha$  vermittelte, war für MoDC und PFAPC identisch. Da BCG-Mykobakterien für beide Zelltypen als die potentesten Induktoren von  $\text{TNF}\alpha$  identifiziert werden konnten, wie in Abbildung 3.1.5.2 zu erkennen, fanden diese in den weiterführenden Aktivierungsstudien von PFAPC und MoDC Verwendung.

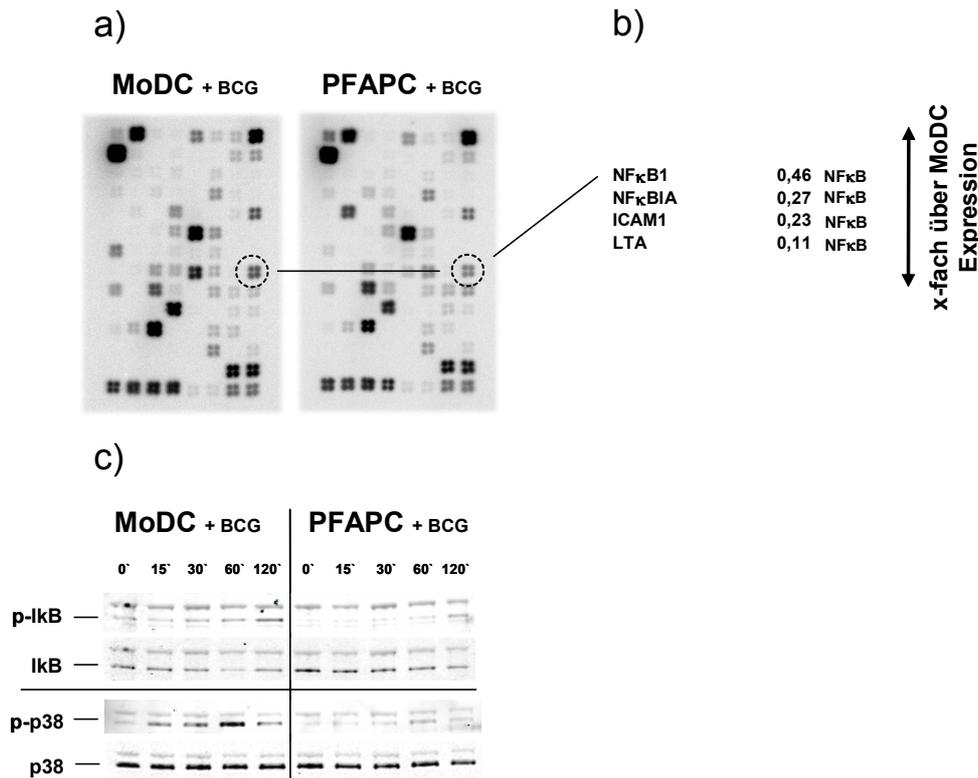


**Abbildung 3.1.5.2: Sezernierung von proinflammatorischem  $\text{TNF}\alpha$  nach Stimulation von MoDC und PFAPC mit verschiedenen TLR-Liganden.** PFAPC (4  $\mu\text{M}$  PF-4 + 500 U/ml IL-4) und MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) wurden an Tag 3 der Differenzierung für 18 h mit verschiedenen TLR-Liganden in optimalen Konzentrationen stimuliert und die Zellkulturüberstände anschließend zur Zytokinbestimmung verwendet. Das Experiment wurde fünfmal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt; dargestellt sind repräsentative Messwerte als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikates. Die statistische Signifikanz (p-Wert < 0,05) der unterschiedlichen Produktion von  $\text{TNF}\alpha$  zwischen MoDC und PFAPC wurde mithilfe des Student t-Test bestätigt und ist in der Abbildung jeweils durch \* angezeigt.

### 3.1.5.3 Die BCG-induzierte Signalweiterleitung ist in PFAPC vermindert

Anhand der experimentellen Untersuchungen in 3.1.5.1 und 3.1.5.2 konnte zwar gezeigt werden, dass PFAPC und MoDC ein identisches Repertoire von TLR-mRNA exprimieren, die TLR-abhängige Aktivierung von PFAPC jedoch generell in einer schwachen  $\text{TNF}\alpha$ -Induktion resultiert. Im nachfolgend dargestellten cDNA Microarray-Experiment sollte daran anknüpfend geklärt werden, ob die in PFAPC reduzierte Produktion von  $\text{TNF}\alpha$  durch eine von MoDC abweichende intrazelluläre Weiterleitung der TLR-aktivierenden Signale zustande kommt. Hierzu wurden die bis zum Tag 3 differenzierten PFAPC und MoDC für 8 h mit BCG (MOI=10) aktiviert und das mRNA-Transkriptionsprofil von Genen der Signaltransduktionskaskaden mithilfe von themenorientierten Microarrays umfassend untersucht. Es fanden bei diesen Analysen wieder die bereits unter Punkt 3.1.4.1 eingeführten Signaltransduktionsarrays Anwendung. Bevor die eigentlichen Hybridisierungen beginnen konnten, mussten jedoch Kontrollexperimente mittels quantitativer PCR durchgeführt werden (Daten nicht gezeigt). Aus mehreren Gründen waren diese Vorexperimente von Bedeutung: Erstens sollte durch Verwendung von  $\text{TNF}\alpha$ -spezifischen PCR-Primern gezeigt werden, dass die Integrität der isolierten gesamtRNA für quantitative PCR und somit auch für Microarray-Analysen ausreichend ist, zweitens wurde die korrekte Ausreifung von PFAPC und MoDC bestätigt, wobei mittels quantitativer PCR wie erwartet die Induktion von  $\text{TNF}\alpha$  auch auf RNA-Ebene in MoDC deutlicher ausgeprägt war als in PFAPC und drittens konnte durch Verwendung von Intron-umspannenden PCR-Primern in nachgeschalteten Agarosegelen eine Kontamination der gesamtRNA durch genomische DNA ausgeschlossen werden. Erst nachdem diese Parameter bestätigt werden konnten, wurden die Hybridisierungen durchgeführt.

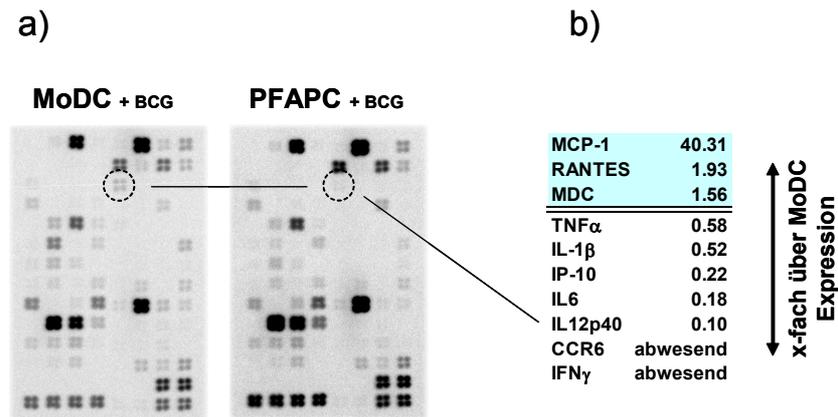
Gezeigt ist in Abbildung 3.1.5.3 eine Auswahl von Genen, die nach Aktivierung von PFAPC durch BCG (MOI=10) in Relation zu MoDC unterschiedlich reguliert waren. Aus Gründen der Übersichtlichkeit sind hier nur die regulierten Gene des  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Stoffwechselweges gezeigt. Die vollständige Auflistung der zwischen stimulierten PFAPC und MoDC unterschiedlich regulierten Gene findet sich im Anhang in Tabelle A.4. Erkennbar ist in Abbildung 3.1.5.3 a und b, dass PFAPC im Vergleich zu MoDC nach Aktivierung mehrere Gene des  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Stoffwechselweges nur schwach heraufreguliert hatten. Diese verminderte Induktion der typisch proinflammatorischen,  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -zugehörigen Signalwege konnte zusätzlich zu den Microarray-Analysen auf RNA-Ebene auch auf Proteinniveau im Western-blot bestätigt werden. Abbildung 3.1.5.3 c zeigt die Phosphorylierung von  $\text{I}\kappa\text{B}$  und p38 im zeitlichen Verlauf nach Aktivierung von PFAPC und MoDC durch BCG. Während MoDC im Verlauf der Stimulation eine deutliche Phosphorylierung sowohl von  $\text{I}\kappa\text{B}$  als auch von p38 aufwies, wurden diese Proteine in PFAPC in einem weitaus geringeren Maß phosphoryliert. In Bezug auf die Zeitkinetik der Phosphorylierung konnten dagegen keine Unterschiede zwischen PFAPC und MoDC aufgezeigt werden. Der Phosphorylierungsgrad von p- $\text{I}\kappa\text{B}$  erreichte in PFAPC wie in MoDC nach jeweils 120 min und der von p-p38 nach 60 min Aktivierung das Maximum.



**Abbildung 3.1.5.3: Microarray-Analyse des mRNA-Transkriptionsprofils von Genen der Signaltransduktionswege in BCG-stimulierten PFAPC und MoDC.** PFAPC (4  $\mu$ M PF-4 + 500 U/ml IL-4) und MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) wurden an Tag 3 der Differenzierung für 8 h mit BCG (MOI=10) stimuliert. Die RNA dreier unabhängiger Spender wurde isoliert, direkt vor der radioaktiven Markierung mittels [ $^{33}$ P] vereinigt und auf die Membranen (*Human Signal Transduction Pathway-Finder Gene Array*; Superarray) hybridisiert. Neben den Membranen (a) erfolgt die Darstellung der gegen das Haushaltsgen (PPIA) normalisierten Genregulation in aktivierten PFAPC als x-fach reguliert in Relation zu aktivierten MoDC (b). Die unterschiedliche Regulation von NFκB1 ist exemplarisch durch Kreise hervorgehoben. In (c) ist ein Western-blot von Zelllysaten von Tag 3 differenzierten MoDC und PFAPC gezeigt. Die Zellen wurden hierfür in einer Zeitkinetik mit BCG (MOI=10) stimuliert und zu angezeigten Zeitpunkten lysiert. Gezeigt ist die Phosphorylierung von IκB und p38 im zeitlichen Verlauf nach Aktivierung der Zellen. Die gleichmäßige Beladung der Geltaschen wird durch p38 angedeutet.

#### 3.1.5.4 Aktivierte PFAPC produzieren ein spezifisches Profil $T_H2$ -assoziierter inflammatorischer Chemokine

Unter Punkt 3.1.5.2 und 3.1.5.3 wurde gezeigt, dass PFAPC im Vergleich zu MoDC nach Stimulation mit unterschiedlichen TLR-Liganden nur geringe Mengen  $TNF\alpha$  produzierten. Ferner wurde gezeigt, dass in diesen Zellen nach Aktivierung proinflammatorische Transkriptionsfaktoren nur schwach induziert waren. Mithilfe der nachfolgenden Microarray-Analyse sollte konsequenterweise ein Gesamtüberblick über das durch mikrobielle Aktivierung induzierte inflammatorische Zytokinprofil gewonnen werden. Es sollte aufgezeigt werden, ob aktivierte PFAPC prinzipiell schwächer auf aktivierende Signale reagieren oder ob qualitativ unterschiedliche Zytokinprofile induziert werden. Um dieser Frage nachzugehen, wurde eine Analyse des induzierten Zytokinprofils mittels *Human Inflammatory Cytokines & Receptors Gene Arrays* (Superarray) durchgeführt. In Abbildung 3.1.5.4 ist das Profil inflammatorischer Zytokine von PFAPC im Vergleich zu MoDC nach 8 h Aktivierung durch BCG auf mRNA-Ebene gezeigt.

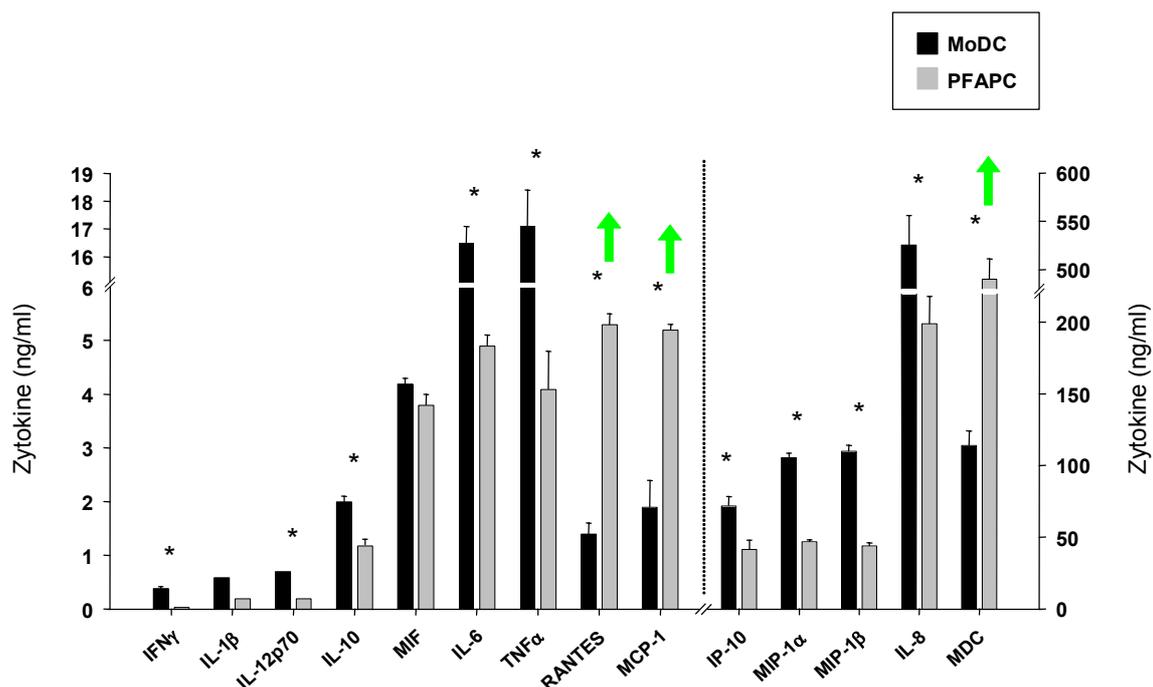


**Abbildung 3.1.5.4:** Microarray-Analyse des mRNA-Transkriptionsprofils inflammatorischer Zytokine und dazugehöriger Rezeptoren in BCG-stimulierten PFAPC und MoDC. PFAPC (4  $\mu$ M PF-4 + 500 U/ml IL-4) und MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) wurden an Tag 3 der Differenzierung für 8 h mit BCG (MOI=10) stimuliert. Die RNA dreier unabhängiger Spender wurde isoliert, direkt vor der radioaktiven Markierung mittels [ $^{33}$ P] vereinigt und auf die Membranen (*Human Inflammatory Cytokines & Receptors Gene Array*; Superarray) hybridisiert. Neben den Membranen (a) erfolgt die Darstellung der gegen das Haushaltsgen (PPIA) normalisierten Genregulation in aktivierten PFAPC als x-fach reguliert in Relation zu aktivierten MoDC (b). Die unterschiedliche Regulation von IL-12p40 ist exemplarisch durch Kreise hervorgehoben.

Exemplarisch ist die unterschiedliche Regulation von IL-12p40 durch Kreise hervorgehoben. Auch in dieser Abbildung werden nur einige ausgewählte Zytokine gezeigt. Eine komplette Auflistung der in PFAPC und MoDC unterschiedlich regulierten Zytokine ist im Anhang als Tabelle A.5 dargestellt. Anhand von Abbildung 3.1.5.4 kann gezeigt werden, dass MoDC nach Stimulation mit BCG ausnahmslos das erwartete Muster an Zytokinen induzierten. Die mRNA für proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  sowie MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  wurde deutlich *de novo* induziert. Zudem wurde erwartungsgemäß CCR7 *de novo* exprimiert und CCR6 herabreguliert. Daneben lieferten stimulierte MoDC deutliche Signale für die T<sub>H</sub>1-polarisierenden Zytokine IL-12p40, IP-10 sowie interessanterweise IFN $\gamma$ . Von diesem typischerweise ausschließlich von lymphoiden Zellen produzierten T<sub>H</sub>1-Leitzytokin ist in der Literatur bisher nichts über die Produktion auch in humanen, myeloiden dendritischen Zellen bekannt. Auf diesen Aspekt wird in Abschnitt 3.3 ausführlich eingegangen.

Im Gegensatz zu MoDC war in PFAPC die Induktion von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  verhältnismäßig schwach ausgeprägt. Die verringerte TNF $\alpha$ -Sekretion in PFAPC nach BCG-Stimulation konnte bereits auf Proteinebene (siehe Abb. 3.1.5.2) und mittels quantitativer PCR (Daten nicht gezeigt) nachgewiesen werden. Des Weiteren waren die T<sub>H</sub>1-polarisierenden Zytokine IL-12p40, IP-10 und insbesondere IFN $\gamma$  in PFAPC sehr schwach oder gar nicht durch BCG induzierbar. Tatsächlich wird anhand der Abbildung 3.1.5.4 allerdings auch verdeutlicht, dass aktivierte PFAPC nicht grundsätzlich mit einer verringerten Induktion von inflammatorischen Mediatoren reagieren. Vielmehr zeigten PFAPC auf mRNA-Ebene ein spezifisches Profil an inflammatorischen Chemokinen. Im Einzelnen wurde die mRNA von MCP-1, RANTES und MDC in PFAPC verstärkt exprimiert.

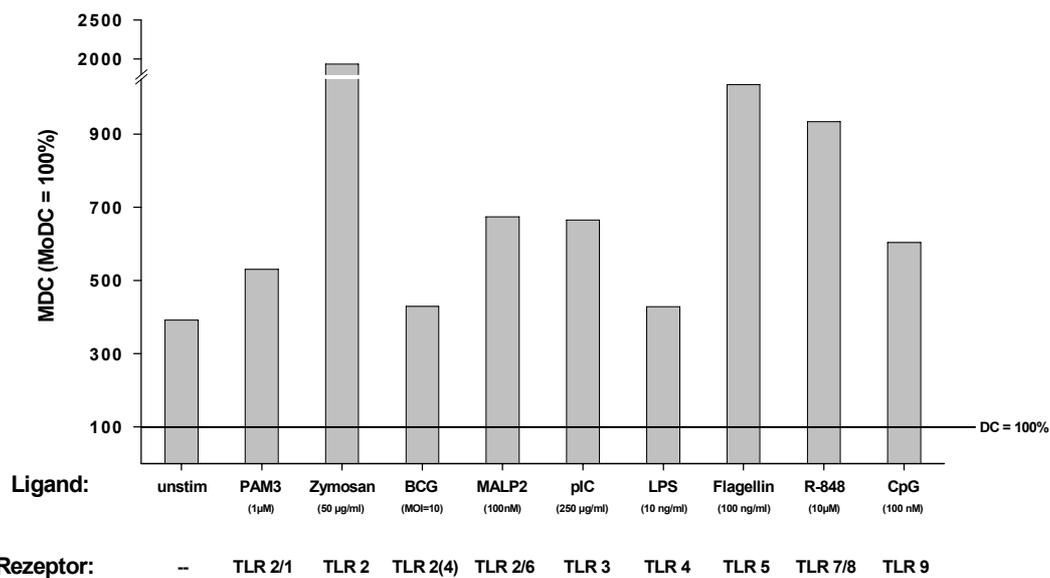
Konsequenterweise wurden in einem weiteren Analyseschritt die Befunde aus den Microarray-Analysen auf Proteinebene überprüft. Abbildung 3.1.5.5 verifiziert ausnahmslos die mittels cDNA Microarrays generierten Daten. So konnte anhand der dargestellten umfangreichen ELISA-Messungen bestätigt werden, dass proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6, MIP-1 $\alpha$  und - $\beta$  sowie TNF $\alpha$  von PFAPC tatsächlich auch auf Proteinebene in einem wesentlich geringeren Umfang freigesetzt wurden als von MoDC. Auch die T<sub>H</sub>1-polarisierenden Zytokine IL-12p70 und IP-10 waren in PFAPC nur schwach exprimiert. Des Weiteren wurde auch das allgemein als anti-inflammatorisch geltende Zytokin IL-10 von PFAPC signifikant schwächer produziert als von MoDC. Interessanterweise wurde tatsächlich auf Proteinebene das lymphoide T<sub>H</sub>1-Zytokin IFN $\gamma$  in den Zellkulturüberständen nachgewiesen. Allerdings wurde dieses Zytokin auch hier von MoDC in sehr viel höheren Mengen freigesetzt als durch PFAPC. Demgegenüber erzeugten durch BCG aktivierte PFAPC höhere Mengen der präferenziell T<sub>H</sub>2-assoziierten inflammatorischen Chemokine MCP-1 und MDC. Auch das T-Zell- und DC-aktive Chemokin RANTES wurde von PFAPC sehr viel stärker als von MoDC sezerniert. Als Schlussfolgerung bleibt demnach festzuhalten, dass PFAPC nicht generell mit verminderter Zytokininduktion auf BCG reagierten, sondern dass vielmehr ein spezifisches, T<sub>H</sub>2-assoziiertes Chemokinprofil von diesen Zellen produziert wurde.



**Abbildung 3.1.5.5: BCG-induzierte Sekretion inflammatorischer Zytokine durch PFAPC und MoDC.** PFAPC (4  $\mu$ M PF-4 + 500 U/ml IL-4) und MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) wurden an Tag 3 der Differenzierung für 18 h mit BCG (MOI=10) stimuliert. Der Zytokingehalt in den Kulturüberständen wurde anschließend mittels ELISA gemessen. Das Experiment wurde achtmal durchgeführt; dargestellt sind repräsentative Messwerte als Mittelwerte  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikates. Die statistische Signifikanz ( $p$ -Wert < 0,05) der unterschiedlichen Zytokinproduktion zwischen MoDC und PFAPC wurde mithilfe des Student t-Test bestätigt und ist in der Abbildung jeweils durch \* angezeigt.

Bisher konnte gezeigt werden, dass PFAPC nach Aktivierung mit BCG ein spezifisches, von MoDC unterscheidbares inflammatorisches Chemokinprofil induzierten. Hierbei war das inflammatorische T<sub>H</sub>2-Chemokin MDC besonders auffallend, da es in einigen Experimenten bis in den

$\mu\text{g}$ -Bereich in Überständen von BCG-stimulierten PFAPC nachweisbar war. Im Folgenden sollte geklärt werden, ob aktivierte PFAPC dieses Chemokin generell nach TLR-Ligation in bedeutenden Mengen produzieren. Abbildung 3.1.5.6 zeigt zu diesem Zwecke die Ergebnisse von Zytokinmessungen mittels MDC-ELISA analog zu den bereits unter 3.1.5.2 eingeführten Titrationsexperimenten der verschiedenen TLR-Liganden. Die Darstellung der MDC-Produktion durch PFAPC erfolgt in dieser Abbildung zur verbesserten Übersicht in Relation zur Syntheserate von identisch stimulierten MoDC. In dieser Abbildung wird verdeutlicht, dass PFAPC hierbei sowohl konstitutiv als auch nach Aktivierung durch die verwendeten TLR-Liganden ein Vielfaches mehr an MDC als die vergleichsweise aktivierten MoDC produzierten.



**Abbildung 3.1.5.6: Sezernierung von MDC nach Stimulation von MoDC und PFAPC mit verschiedenen TLR-Liganden.** PFAPC (4  $\mu\text{M}$  PF-4 + 500 U/ml IL-4) und MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) wurden an Tag 3 der Differenzierung für 18 h mit verschiedenen TLR-Liganden in optimalen Konzentrationen stimuliert und die Zellkulturüberstände anschließend zur Zytokinbestimmung verwendet. Die Produktion von MDC durch MoDC wurde auf 100% gesetzt und ins Verhältnis zur Produktion durch PFAPC gebracht. Das Experiment wurde fünfmal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt;

Die dargestellten Untersuchungen zeigen somit, dass mikrobiell stimulierte PFAPC zwar geringe Mengen proinflammatorischer und  $T_H1$ -polarisierender Zytokine wie  $\text{TNF}\alpha$  oder IL-12p70 sezernierten und auch die Induktion von  $\text{NF}\kappa\text{B}$ -Genen in diesen Zellen vermindert war. Diese Zellen reagierten jedoch nicht generell schwächer, sondern erzeugten vielmehr sowohl konstitutiv als auch nach Stimulation ein spezifisches, inflammatorisches Chemokinprofil. In diesem Zusammenhang sind insbesondere RANTES sowie die  $T_H2$ -assoziierten Chemokine MCP-1 und MDC zu nennen.

### 3.1.6 Lymphostimulatorisches Potenzial von PFAPC

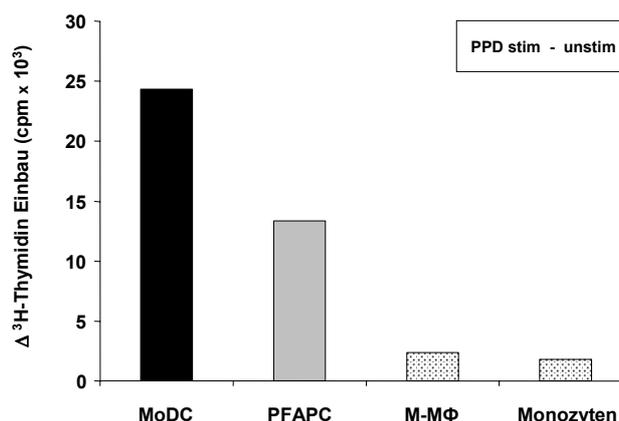
Die Effizienz der T-Zellaktivierung induziert durch Antigen-präsentierende Zellen ist ein charakteristisches Merkmal bei der Bewertung des lymphostimulatorischen Potenzials dieser Zellen. In vorangegangenen *in vitro*-Studien konnte in diesem Kontext gezeigt werden, dass PFAPC an Tag 3 der Differenzierung in heterologen gemischten Leukozytenreaktionen (MLR) ein in etwa ver-

gleichbares lymphostimulatorisches Potenzial besaßen wie MoDC. Demgegenüber war jedoch die Induktion von lymphozytärem  $\text{IFN}\gamma$  in PFAPC/Lymphozyten-Kokulturen im Vergleich zu MoDC konsistent vermindert<sup>107</sup>.

Anknüpfend an die oben genannten initialen Studien rückte in den nachfolgend gezeigten funktionellen Experimenten zunächst die antigenabhängige Aktivierbarkeit  $\text{CD4}^+ \text{CD45RA}^+$  naiver T-Zellen durch PFAPC in den Fokus der Analysen. Die nachhaltige Induktion naiver T-Zellproliferation ist eine einzigartige Fähigkeit von DC als professionelle APC und unterscheidet diesen Zelltyp funktionell von nicht-professionell Antigen-präsentierenden Zellen wie Makrophagen oder Monozyten. In nachfolgenden Untersuchungen sollte daher zunächst geklärt werden, ob PFAPC durch Induktion naiver T-Zellproliferation auf funktioneller Ebene zusammen mit MoDC als professionelle APC eingestuft werden können. Ferner sollte in den darauf folgenden Kapiteln das resultierende Zytokinprofil im Hinblick auf  $\text{T}_\text{H}1/\text{T}_\text{H}2$ -Polarisierung von durch PFAPC bzw. MoDC aktivierten T-Effektorzellen analysiert werden. Diese Untersuchungen basierten auf der Hypothese, dass die bisher aufgezeigten Unterschiede zwischen PFAPC und MoDC auch in einer unterschiedlichen Polarisierung von T-Zellantworten resultieren könnte.

### 3.1.6.1 PFAPC induzieren als professionelle APC die antigenabhängige Proliferation naiver T-Zellen

Abbildung 3.1.6.1 zeigt die PFAPC-vermittelte Induktion naiver T-Zellproliferation im Vergleich zu MoDC, Makrophagen sowie Monozyten in einem autologen Antigenpräsentations-Assay. Während MoDC und PFAPC durch Präsentation von PPD-Antigenen eine substantielle Proliferation in  $\text{CD4}^+ \text{CD45RA}^+$  naiven T-Zellen induzieren konnten, waren Makrophagen oder Monozyten demgegenüber dazu nicht in der Lage. Aufgrund dieser Ergebnisse können PFAPC funktionell von Makrophagen und Monozyten unterschieden und in einer Reihe mit MoDC als professionelle APC gestellt werden.

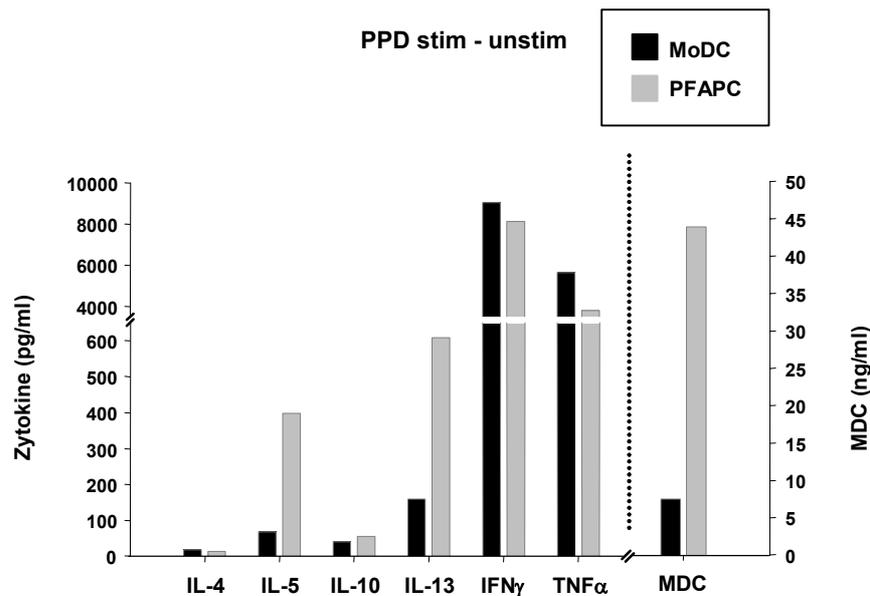


**Abbildung 3.1.6.1:** Antigenpräsentations-Assay aus Kokulturen autologer  $\text{CD4}^+ \text{CD45RA}^+$  naiver T-Zellen mit verschiedenen APC. Monozyten wurden direkt 18 h mit PPD-Antigenen beladen und eingesetzt; MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4), PFAPC (4  $\mu\text{M}$  PF-4 + 500 U/ml IL-4) und M-MΦ (500 U/ml M-CSF) wurden drei Tage differenziert und erst danach 18 h mit PPD-Antigenen beladen und verwendet. Nach 5 Tagen Kokultur wurde die induzierte T-Zellproliferation durch Messung der Einbaurate von radioaktiv markierten  $^3\text{H}$ -Thymidinnukleotiden bestimmt. Die verschiedenen APC-Subtypen eines Spenders mit negativem PPD-Status wurden dabei im Verhältnis 1:10 mit den T-Zellen eingesetzt. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment von drei durchgeführten Experimenten.

### 3.1.6.2 PFAPC verschieben das Zytokinprofil unterschiedlich aktivierter T-Zellen in Richtung $T_H2$

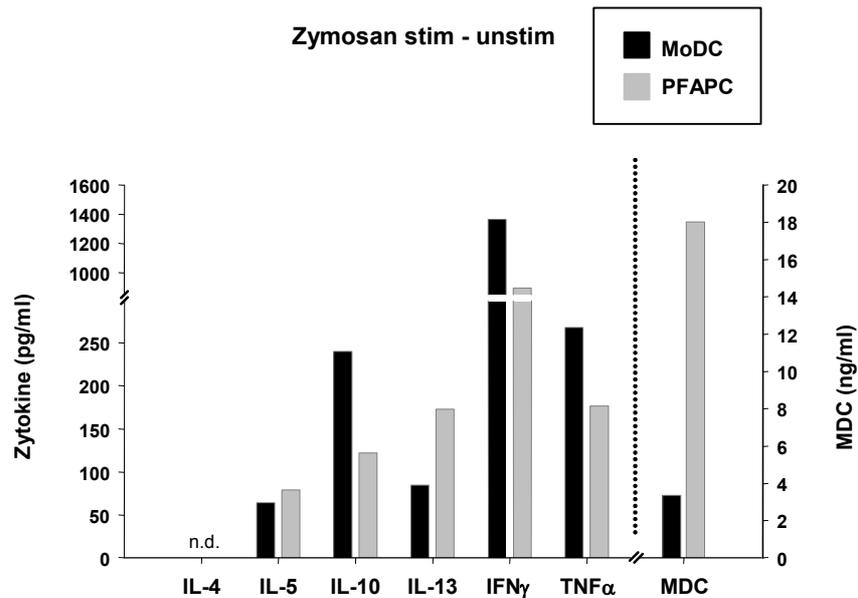
Nachdem PFAPC funktionell als professionelle APC eingestuft werden konnten, sollten in weiterführenden Untersuchungen die Zytokinprofile der jeweils durch MoDC oder PFAPC aktivierten, unterschiedlichen T-Zellpopulationen charakterisiert werden. Es ist bekannt, dass  $T_H1$ -differenzierte  $CD3^+$  T-Gedächtniszellen hauptsächlich  $IFN\gamma$  freisetzen, wohingegen eine  $T_H2$ -Polarisierung durch substanzielle Sekretion von IL-4, IL-5 sowie IL-13 bei gleichzeitiger Verminderung der  $IFN\gamma$ -Produktion gekennzeichnet ist. Wie bereits in Abbildung 3.1.5.5 gezeigt, produzierten PFAPC präferenziell  $T_H2$ -assoziierte Chemokine wie MCP-1 und MDC, während gleichzeitig  $T_H1$ -polarisierende Zytokine wie IL-12p70 und IP-10 nur schwach induziert waren. Ziel der nachfolgenden Experimente war es daher aufzuzeigen, ob die Produktion eines PFAPC-spezifischen Chemokinprofils auch funktionelle Auswirkungen auf die Reaktivierung bzw. Differenzierung von  $CD3^+$  T-Gedächtniszellen oder  $CD4^+ CD45RA^+$  naiven T-Zellen hat.

In einer ersten Versuchsreihe wurde in autologen Antigenpräsentations-Assays zunächst die Kapazität von PFAPC untersucht, bereits  $T_H1$ -polarisierte T-Gedächtniszellen zu restimulieren. Hierzu wurden  $CD3^+$  T-Zellen eines Spenders mit positivem PPD-Status isoliert und mit PPD-beladenen PFAPC bzw. MoDC kokultiviert. Die antigeninduzierte Reaktivierung von  $T_H1$ -polarisierten Gedächtniszellen resultiert üblicherweise in der Produktion großer Mengen  $IFN\gamma$ . Daher wurde dieser experimentelle Aufbau verwendet, um zu untersuchen, ob PFAPC bereits stark  $T_H1$ -vorpolarisierte Immunantworten modulieren können. In Abbildung 3.1.6.2 ist das Zytokinprofil der durch PFAPC bzw. MoDC aktivierten  $CD3^+$  T-Zellen gezeigt. Es ist deutlich zu erkennen, dass die Reaktivierung der  $CD3^+$  T-Zellen durch PPD-beladene MoDC in einer starken  $T_H1$ -Ausrichtung des Zytokinprofils resultierte. Es konnten demgemäß in diesen Versuchsansätzen große Mengen  $IFN\gamma$  (9,0 ng/ml) und  $TNF\alpha$  (5,6 ng/ml) bei minimaler Induktion der klassischen  $T_H2$  Zytokine IL-5 (68 pg/ml) und IL-13 (159 pg/ml) nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu wurden durch PPD-beladene PFAPC zwar auch substanzielle Mengen  $IFN\gamma$  (8,1 ng/ml) sowie  $TNF\alpha$  (3,8 ng/ml) induziert, gleichzeitig jedoch auch deutlich mehr IL-5 (398 pg/ml) und IL-13 (608 pg/ml). Das anti-inflammatorische Zytokin IL-10 war erwartungsgemäß in den Ansätzen nur minimal induziert. Ein weiterer interessanter Hinweis konnte anhand der Messung von MDC in den APC/T-Zell-Kokulturen erbracht werden. Der obigen Argumentation folgend, wurde in den PFAPC/T-Zell-Kokulturen im Vergleich zu den MoDC-Kokulturen tatsächlich auch ein Vielfaches des  $T_H2$ -assoziierten Chemokins MDC (43,9 ng/ml zu 7,5 ng/ml) gemessen.



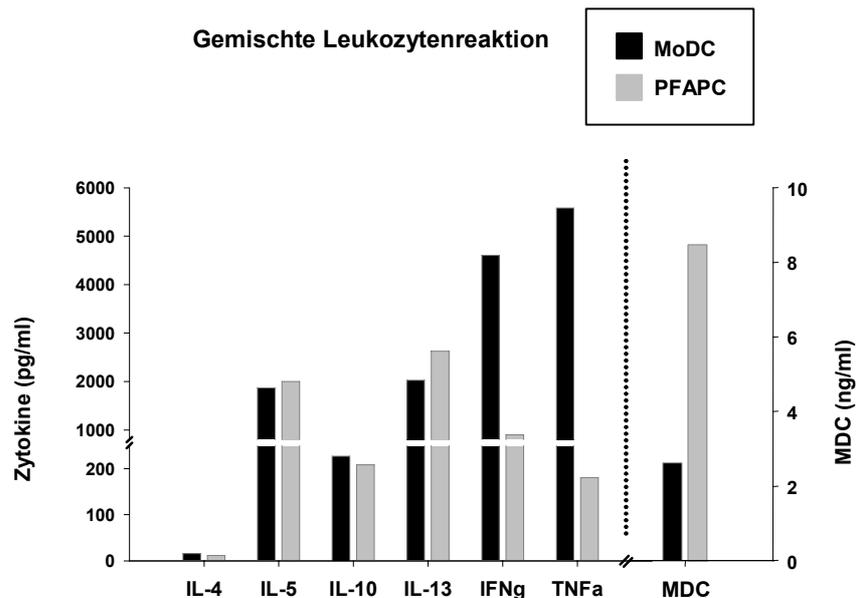
**Abbildung 3.1.6.2:**  $T_H1/T_H2$ -Zytokinprofil von reaktivierten  $CD3^+$  T-Zellen in einem autologen Antigenpräsentations-Assay mit MoDC und PFAPC. MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) und PFAPC (4  $\mu$ M PF-4 + 500 U/ml IL-4) eines PPD<sup>+</sup> Spenders wurden drei Tage differenziert und anschließend 18 h mit PPD-Antigenen (10  $\mu$ g/ml) beladen und mit T-Zellen im Verhältnis 1:10 (APC/T-Zellen) eingesetzt. Nach fünf Tagen Kokultur wurde das induzierte Zytokinprofil mittels Multiplex- bzw. konventionellen ELISA charakterisiert. Dieses Experiment wurde mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Anknüpfend an die in Abbildung 3.1.6.2 dargestellte Datenlage, sollte im nachfolgenden Antigenpräsentations-Assay aufgeklärt werden, ob PFAPC die Aktivierung und Polarisierung  $CD4^+$   $CD45RA^+$  naiver T-Zellen induzieren und ob das dabei resultierende Zytokinprofil von konventionellen MoDC unterscheidbar ist. Abbildung 3.1.6.3 zeigt hierzu die Ergebnisse eines Antigenpräsentations-Assays mit Zymosan-stimulierten APC in Kokultur mit  $CD4^+$   $CD45RA^+$  naiven T-Zellen. Der Abbildung ist zu entnehmen, dass PFAPC im Vergleich zu MoDC auch in diesem experimentellen Versuchsaufbau eine Verschiebung des Zytokinprofils in Richtung  $T_H2$  verursachen. Es konnte im Vergleich zu MoDC eine verminderte  $IFN\gamma$ -Produktion bei gleichzeitig verstärkter Sekretion der  $T_H2$  Zytokine IL-5 und IL-13 in den PFAPC/T-Zell-Kokulturen festgestellt werden. Zudem konnte auch in diesem Versuchsaufbau ein Vielfaches an MDC in den PFAPC/T-Zell-Kokulturen nachgewiesen werden. Vergleichbare Ergebnisse wurden in parallel durchgeführten Experimenten mit Cholera-Toxin stimulierten APC/T-Zell-Kokulturen erzielt (Daten nicht gezeigt). Auch in diesen Experimenten induzierten PFAPC präferenziell die Differenzierung naiver T-Zellen in Richtung  $T_H2$ .



**Abbildung 3.1.6.3:** T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Zytokinprofil von aktivierten CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> T-Zellen in einem autologen Antigenpräsentations-Assay mit MoDC und PFAPC. MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) und PFAPC (4  $\mu$ M PF-4 + 500 U/ml IL-4) wurden drei Tage differenziert und anschließend 18 h mit Zymosan aktiviert und im Verhältnis 1:10 (APC/T-Zellen) eingesetzt. Zusätzlich wurden die APC 1 h vor Verwendung mit Superantigen TSST-1 beladen. Nach fünf Tagen Kokultur wurde das induzierte Zytokinprofil mittels Multiplex- bzw. konventionellen ELISA charakterisiert. Dieses Experiment wurde mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

In einer abschließenden Versuchsreihe sollte in gemischten Leukozytenreaktionen (MLR) die Fähigkeit von PFAPC untersucht werden, antigenunabhängig naive T-Zellen zu polarisieren. In Abbildung 3.1.6.4 ist das Zytokinprofil von heterologen CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> naiven T-Zellen nach fünf Tagen Kokultur mit unstimulierten PFAPC bzw. MoDC dargestellt. Auch in diesen experimentellen Versuchsreihen war eine durch PFAPC induzierte Verschiebung des Verhältnisses von T<sub>H</sub>1- zu T<sub>H</sub>2-Zytokinen nachweisbar. PFAPC-differenzierte T-Zellen produzierten im Vergleich zu MoDC-kokultivierten T-Zellen deutlich weniger IFN $\gamma$  (0,9 ng/ml zu 4,6 ng/ml) bei konstanter bzw. tendenziell erhöhter Produktion von IL-5 (2,0 ng/ml zu 1,8 ng/ml) und IL-13 (2,6 ng/ml zu 2,0 ng/ml). Zudem wird in Abbildung 3.1.6.4 gezeigt, dass auch in heterologen MLR deutlich mehr T<sub>H</sub>2-assoziiertes MDC in PFAPC/T-Zell-Kokulturen nachweisbar war als vergleichsweise in den MoDC-Kokulturen.



**Abbildung 3.1.6.4:**  $T_H1/T_H2$ -Zytokinprofil in gemischter Leukozytenreaktion mit  $CD4^+$   $CD45RA^+$  naiven T-Zellen in Kokultur mit PFAPC und MoDC. Heterologe MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) und PFAPC (4  $\mu$ M PF-4 + 500 U/ml IL-4) wurden drei Tage differenziert und im Verhältnis 1:10 (APC/T-Zellen) eingesetzt. Nach fünf Tagen Kokultur wurde das induzierte Zytokinprofil mittels Multiplex- bzw. konventionellen ELISA charakterisiert. Dieses Experiment wurde fünfmal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

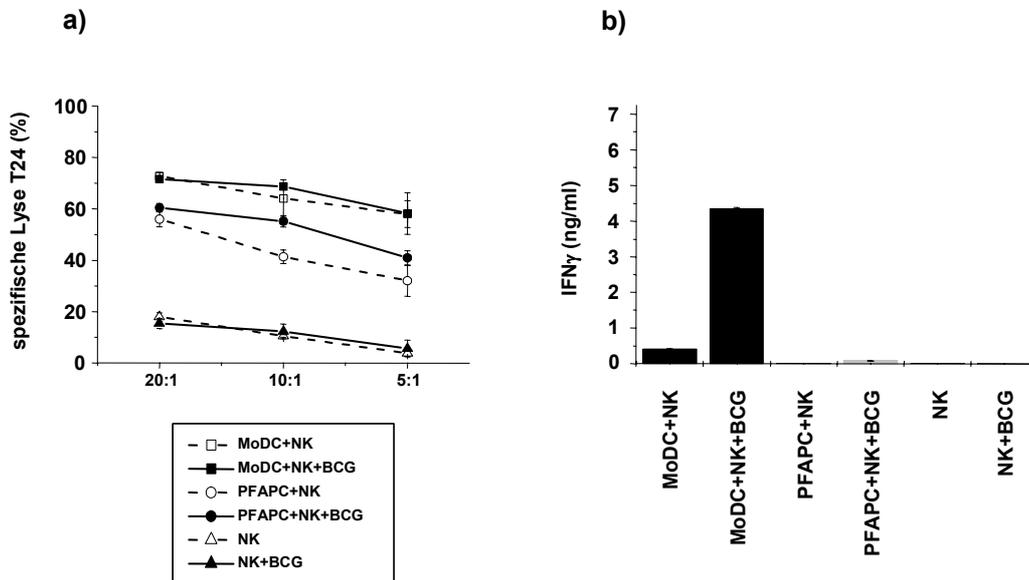
Zusammenfassend lässt sich für Kapitel 3.1.6 schlussfolgern, dass PFAPC ähnlich wie MoDC substantielle Proliferation naiver T-Zellen induzieren konnten und diese Zellen somit als professionell Antigen-präsentierende Zellen funktionell von Makrophagen oder Monozyten zu unterscheiden sind. Außerdem wurde in verschiedenen Versuchsreihen mit unterschiedlichen T-Zellpopulationen eine Verschiebung des T-Zell-generierten Zytokinprofils in Richtung  $T_H2$  nachgewiesen. PFAPC-aktivierte T-Zellen zeichneten sich hierbei durch eine verminderte Induktion von IFN $\gamma$  bei gleichzeitig konstanter bis tendenziell erhöhter IL-5- und IL-13-Produktion aus. IL-10 als antiinflammatorisches Zytokin blieb hierbei weitestgehend unbeeinflusst.

### 3.1.7 Interaktion von PFAPC mit Zellen der angeborenen Immunität

Dendritische Zellen stellen ein essentielles funktionelles Bindeglied zwischen angeborener und adaptiver Immunität dar. Dies bedeutet nach neueren Erkenntnissen auch, dass DC neben der Modulation von T-Zellfunktionen, in umgekehrter Richtung zu frühen Zeitpunkten einer Inflammation, mit Zellen der angeborenen Immunität wie beispielsweise NK-Zellen interagieren können<sup>4</sup>. Aufgrund dessen wurde die Fähigkeit von DC, auf die Immunbiologie von NK-Zellen Einfluss zu nehmen, in die Vergleichsanalysen dieser Arbeit mit einbezogen. Es sollte geklärt werden, ob auch PFAPC die für MoDC beschriebene Fähigkeit zur Aktivierung von NK-Zellen aufweisen.

Es ist bekannt, dass die *in vitro*-Interaktion von DC mit NK-Zellen zu einer Aktivierung der NK-Zellen führt<sup>118</sup>. Diese DC-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen (DAK-Zellen) erhöht deren *in vitro*-Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen<sup>118</sup>. Aus diesem Grund wurden Tag 3 differenzierte PFAPC oder MoDC mit autologen NK-Zellen kokultiviert und das stimulatorische Potenzial der Antigen-präsentierenden Zellen anschließend anhand der anti-tumoralen NK-Zytotoxizität gegen T24- und

K562-Tumorzellen gemessen. Ziel der Untersuchung war es aufzuzeigen, ob PFAPC die Aktivierung von NK-Zellen zu DAK-Zellen induzieren und ob andererseits immunbiologische Unterschiede zu den durch konventionelle MoDC induzierten DAK-Zellen festzustellen sind. In Abbildung 3.1.7 a ist ein Zytotoxizitäts-Assay von PFAPC- und MoDC-induzierten DAK-Zellen gegen T24-Zellen gezeigt.



**Abbildung 3.1.7: DC-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen (DAK-Zellen) in Zytotoxizitäts-Assay gegen T24-Tumorzellen.** (a) MoDC (je 500 U/ml GM-CSF + IL-4) und PFAPC (4  $\mu$ M PF-4 + 500 U/ml IL-4) wurden an Tag 3 der Differenzierung geerntet und im Verhältnis 1:1 für weitere fünf Tage mit autologen NK-Zellen kokultiviert. Die APC wurden zu Beginn der Kokultur mit BCG (MOI=1 zur Gesamtzellzahl) stimuliert (gefüllte Symbole) oder unbehandelt gelassen (offene Symbole). Nach fünf Tagen Kokultur wurden die DAK-Zellen geerntet und für 4 h - 6 h mit  $^{51}$ Chrom-markierten T24-Tumorzellen in angegebenen Verhältnissen kokultiviert. Die Zytotoxizität wurde anhand der  $^{51}$ Chromfreisetzung bestimmt. (b) Die Sekretion von IFN $\gamma$  in die APC/NK-Kokulturen wurde parallel mittels ELISA gemessen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen.

T24-Zellen zeichnen sich durch ausgeprägte Resistenz gegenüber unstimulierten NK-Zellen aus, was in Abbildung 3.1.7 a anhand der sehr geringen zytolytischen Aktivität der aufgereinigten NK-Zellen bestätigt werden konnte. Hingegen wurde die NK-Aktivität in Kokultur durch Interaktion sowohl mit PFAPC als auch mit MoDC massiv gesteigert. Die DAK-Aktivität konnte noch zusätzlich durch die BCG-induzierte Aktivierung der APC erhöht werden. Die Ergebnisse in Zytotoxizitäts-Assays waren bei Verwendung von K562-Tumorzellen grundsätzlich vergleichbar (Daten nicht gezeigt). Allerdings waren in diesen Experimenten die Lyseaktivitäten der DAK-Zellen, aufgrund der leichten Lysierbarkeit von K562-Zellen, in allen Ansätzen erhöht. Im Gegensatz zu der in Abbildung 3.1.7 a durch PFAPC und MoDC gezeigten durchaus vergleichbaren Induktion von NK-Zytotoxizität konnten jedoch deutliche Unterschiede bei der Induktion des typischen NK-Zell-Zytokins IFN $\gamma$  festgestellt werden. In Abbildung 3.1.7 b wird gezeigt, dass MoDC insbesondere nach Stimulation mit BCG substantielle Mengen dieses T $_H$ 1-Zytokins induzierten bzw. produzierten, wohingegen in Kokulturen von PFAPC mit NK-Zellen dieses Zytokin nur in minimalen Mengen freigesetzt wurde. Somit wird deutlich, dass PFAPC zwar die Aktivierung von NK-Zellen zu funktionellen Killer-Zellen einleiten können, gleichzeitig wird jedoch erneut auch in dieser Ver-

suchsreihe gezeigt, dass andere Funktionen, wie die Induktion des  $T_H1$ -polarisierenden Zytokins  $IFN\gamma$ , durch PFAPC wesentlich geringer ist.

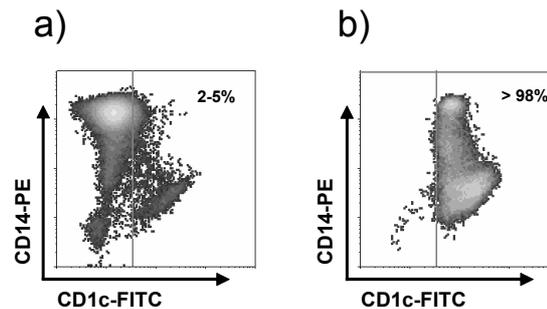
Die in diesem Abschnitt gezeigten experimentellen Daten zeigen zweifelsfrei, dass das inflammatorische Plättchenchemokin PF-4 in Kombination mit IL-4 innerhalb weniger Tage die *in vitro*-Differenzierung humaner Monozyten in professionell Antigen-präsentierende Zellen induziert. PFAPC waren dabei in mehrfacher Hinsicht auf funktioneller Ebene von Makrophagen zu unterscheiden. Microarray-Analysen der RNA-Transkriptionsprofile konnten zeigen, dass PFAPC konstitutiv aktiviert vorlagen und diese Zellen zudem, insbesondere nach mikrobieller Aktivierung, ein spezifisches  $T_H2$ -assoziiertes Zytokinprofil erzeugten. Die Interaktion von PFAPC mit adaptiven wie auch mit angeborenen Immunzellen resultierte in substanzieller Aktivierung dieser Zellen. Zeitgleich wurden  $T_H1$ -polarisierende Zytokine wie IL-12p70 oder  $IFN\gamma$  in vergleichsweise geringen Mengen induziert bzw. produziert. Demgegenüber resultierte die Aktivierung verschiedener T-Zellpopulationen konsistent in einer Verschiebung des Zytokinprofils in Richtung  $T_H2$ .

### 3.2 PF-4-vermittelte Modulation der Immunbiologie *ex vivo* isolierter BDC

In diesem Abschnitt werden die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zu modulierenden Effekten von PF-4 auf die Immunbiologie von terminal differenzierten, *ex vivo* isolierten  $CD1c^+$  BDC vorgestellt. Ergänzend zu den unter 3.1 gezeigten Daten von PF-4-induzierten Langzeiteffekten in Bezug auf die Differenzierung und Aktivierbarkeit von DC-Vorläufern und den Auswirkungen auf nachfolgende Immunantworten, sollte in diesem Teilprojekt zusätzlich die Interaktion von Thrombozyten und BDC unter traumatischen Bedingungen simuliert werden. Hierbei standen PF-4-vermittelte, immunmodulierende Kurzzeiteffekte sowohl auf unstimulierte BDC als auch im Zusammenhang mit einer gleichzeitigen Aktivierung dieser Zellen durch TLR-Ligation im Vordergrund. Des Weiteren wurden auch in diesem Abschnitt etwaige funktionelle Konsequenzen der PF-4-vermittelten Modulation von BDC auf nachfolgende T-Zellinteraktionen einbezogen.

#### 3.2.1 Isolierung von $CD1c^+$ BDC

$CD1c^+$  BDC stellen *in vivo* im peripheren Blut einen äußerst seltenen Zelltypus dar<sup>31</sup>. Zur Reinheitsprüfung wurde deshalb das aufwendige Anreicherungsprotokoll für diese Zellen in der Durchflusszytometrie kontrolliert. In Abbildung 3.2.1 ist zunächst die Verteilung von Zellen nach Doppelmarkierung mit Antikörpern gegen  $CD1c$  bzw.  $CD14$  und nachfolgender Analyse in der Durchflusszytometrie dargestellt. Hierbei ist in Abbildung 3.2.1 a das Ergebnis einer Markierung der Monozytenfraktion (siehe Punkt 2.2.2 und 2.2.5) vor Aufreinigung und in Abbildung 3.2.1 b nach Durchführung des Anreicherungsprotokolls gezeigt. Während vor der Aufreinigung der überwiegende Anteil der Monozytenfraktion wie erwartet deutlich  $CD14^+$  exprimierte und sich nur eine kleine Population (2-5% der Gesamtzellzahl) von  $CD1c^+$  darstellen ließ, fanden sich im Anschluss an die Zellseparation  $CD1c^+$  BDC mit einer Reinheit von über 98% im Eluat der Säule.

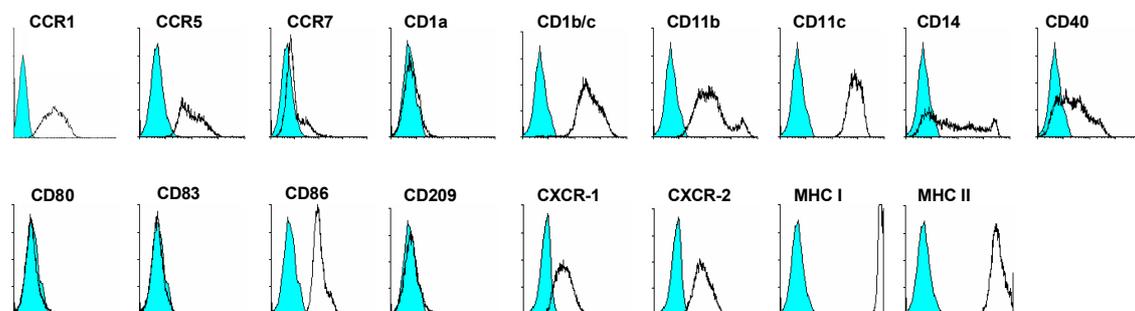


**Abbildung 3.2.1: Reinheitskontrolle des CD1c<sup>+</sup> BDC-Aufreinigungsprotokolls.** CD1c<sup>+</sup> BDC wurden nach Elutriation in der Monozytenfraktion (a) sowie nach Aufreinigung (b) durch das CD1c (BDCA-1) BDC Isolation Kit (Miltenyi) mit Antikörpern gegen CD1c (FITC) bzw. CD14 (PE) immunfluoreszenzmarkiert. Die Reinheit der eingesetzten BDC war in allen Experimenten höher als 98%.

### 3.2.2 Phänotypisierung aufgereinigter CD1c<sup>+</sup> BDC

CD1c<sup>+</sup> BDC wurden erstmals im Jahr 2000 von Dzionek *et al.*<sup>31</sup> als eine eigenständige Subpopulation innerhalb der CD11c<sup>+</sup> myeloiden BDC hervorgehoben. In jener Studie wurden die Zellen jedoch nur initial phänotypisiert. Darüber hinaus wurden diese Zellen in neuerer Zeit in weiteren phänotypischen und funktionellen Studien ansatzweise charakterisiert<sup>36;119-121</sup>. Im Rahmen der in dieser Arbeit simulierten Interaktion zwischen CD1c<sup>+</sup> BDC mit Thrombozyten war, zwecks Einschätzung modulierender Eigenschaften von Thrombozyten auf die Immunbiologie CD1c<sup>+</sup> BDC, eine umfassende phänotypische Charakterisierung dieser neuartigen, bisher nur unzureichend charakterisierten Zellen sinnvoll. Hierbei war neben der Expression typischer DC-Marker insbesondere das Profil exprimierter Chemokinrezeptoren von Bedeutung, da aktivierte Thrombozyten unter inflammatorischen Bedingungen neben PF-4 zusätzlich eine große Bandbreite immunmodulierender Mediatoren sezernieren können.

Abbildung 3.2.2.1 zeigt die Ergebnisse der Analyse der Expression verschiedener Oberflächenmoleküle auf CD1c<sup>+</sup> BDC in der Durchflusszytometrie. Die Zellen zeigten neben deutlicher Expression von CD1b/c den typischen Phänotyp unreifer, myeloider DC (CD11b<sup>++</sup> CD11c<sup>++</sup> CD80<sup>-</sup> CD83<sup>-</sup> CD86<sup>+</sup> MHC II<sup>+++</sup>). Die Zellpopulation wies des Weiteren eine heterogene Expression des Monozyten/Makrophagen-Markers CD14 auf, während die MoDC-assoziierten Oberflächenmoleküle CD1a und CD209 (DC-SIGN) nicht exprimiert waren. Zusätzlich waren die Chemokinrezeptoren CCR1 und CCR5 sowie CXCR1 und CXCR2 deutlich exprimiert.

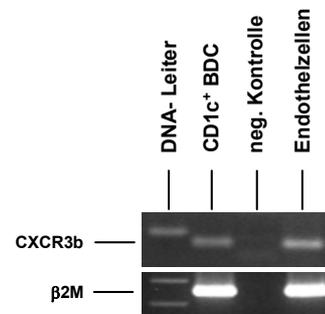


**Abbildung 3.2.2.1: Phänotyp von frisch isolierten CD1c<sup>+</sup> BDC.** CD1c<sup>+</sup> BDC wurden direkt im Anschluss an die Aufreinigungsprozedur durchflusszytometrisch charakterisiert. Offene Histogramme zeigen die jeweilige spezifische Antikörperfärbung im Vergleich zur unspezifischen Isotyp-Kontrolle (grau) an. Die verwendeten Antikörper und die eingesetzten Konzentrationen sind in Tabelle 2.1.4 detailliert aufgeführt.

Zudem wurde kürzlich auch *in vivo* eine Spleißvariante von CXCR3 beschrieben, die als CXCR3b einen funktionellen Rezeptor für PF-4 darstellt<sup>122</sup>. Aus diesem Grund war die Expression dieser Rezeptorvariante in CD1c<sup>+</sup> BDC für die in diesem Projekt untersuchten immunmodulierenden Fähigkeiten von PF-4 von fundamentaler Bedeutung. In Abbildung 3.2.2.2 ist gezeigt, dass in CD1c<sup>+</sup> BDC die mRNA des PF-4-spezifischen Rezeptors CXCR3b exprimiert wurde.

**Abbildung 3.2.2.2:**

**Expression der PF-4-spezifischen Rezeptorvariante CXCR3b in CD1c<sup>+</sup> BDC.** cDNA von CD1c<sup>+</sup> BDC oder Endothelzellen wurde durch Verwendung sequenzspezifischer Primer für CXCR3b und  $\beta$ 2M mittels PCR (45 Zyklen) amplifiziert. Die resultierenden Amplifikate wurden hiernach in Agarose-Gelen aufgetrennt und die korrekte Größe des Fragments im Gel in Relation zur DNA-Leiter (100 bp Leiter; Invitrogen) beurteilt. Dieses Experiment wurde fünfmal mit identischen Ergebnissen wiederholt.



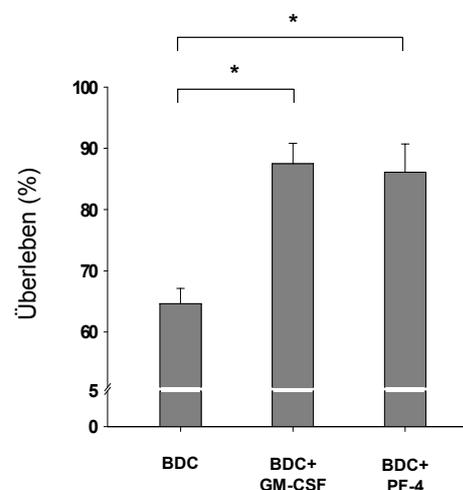
### 3.2.3 PF-4-vermittelte Verlängerung des Überlebens *in vitro* kultivierter von CD1c<sup>+</sup> BDC

Im Anschluss an die oben dargestellten phänotypischen Charakterisierungen und den Nachweis der Expression des beschriebenen PF-4-Rezeptors CXCR3b wurde untersucht, ob PF-4 Einfluss auf das Überleben von CD1c<sup>+</sup> BDC hat. Bereits durch Kohrgruber *et al.* konnte gezeigt werden, dass GM-CSF die spontane Apoptose von 72 h *in vitro* kultivierten CD11c<sup>+</sup> BDC inhibiert<sup>26</sup>. Darüber hinaus wurde gezeigt, dass PF-4 ähnlich wie GM-CSF eine anti-apoptotische Wirkung auf *in vitro* kultivierte Monozyten aufweist<sup>97</sup>.

Somit stellte sich im Rahmen dieser Arbeit die Frage, ob das inflammatorische Plättchenchemokin PF-4 das Überleben von BDC während der *in vitro*-Kultur verlängern kann. In Abbildung 3.2.3 ist die Überlebensrate von CD1c<sup>+</sup> BDC nach 18 h *in vitro*-Kultur mit GM-CSF oder PF-4 im Vergleich zur Mediumkontrolle gezeigt. Sowohl PF-4 als auch GM-CSF inhibierten gleichermaßen signifikant die spontan-induzierte Apoptose von *in vitro* kultivierten CD1c<sup>+</sup> BDC.

**Abbildung 3.2.3:**

**Effekte von PF-4 auf das Überleben *in vitro* kultivierter CD1c<sup>+</sup> BDC.** Frisch isolierte BDC wurden in Medium (R<sub>xx</sub>1) oder in Medium versetzt mit GM-CSF (250 U/ml) oder mit PF-4 (4  $\mu$ M) eingesetzt und für 18 h kultiviert. Die anschließende Zellzahlbestimmung erfolgte in einem CASY TT. Die statistische Signifikanz der unterschiedlichen Zellzahlen (p-Wert < 0,05) wurde mittels Student t-Test bestätigt und ist in der Abbildung durch \* markiert. Dieses Experiment wurde viermal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt. Die Messwerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikates dargestellt.

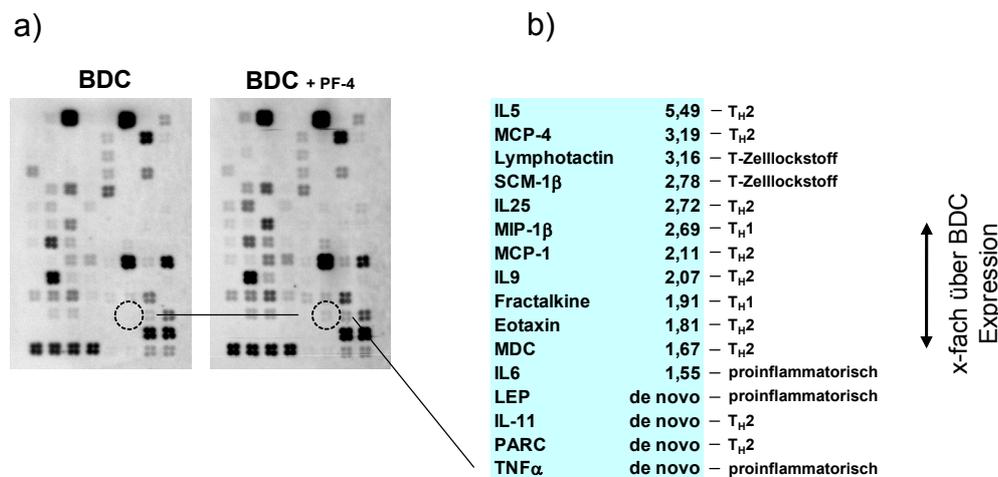


### 3.2.4 Immunmodulierende Effekte von PF-4 auf CD1c<sup>+</sup> BDC

In diesem Kapitel sollte geklärt werden, ob PF-4 modulierende Effekte auf die Immunbiologie von CD1c<sup>+</sup> BDC *in vitro* auslösen kann. Um etwaige Effekte auf das immunstimulatorische Potenzial von CD1c<sup>+</sup> BDC möglichst umfassend charakterisieren zu können, wurden abermals zuerst themenorientierte cDNA Microarray-Analysen angewendet. Hierbei kamen erneut die bereits unter 3.1.4.2 eingeführten Microarrays (*Human Inflammatory Cytokines & Receptor Gene Arrays*; Superarray) zum Einsatz. Es sollte analysiert werden, ob PF-4 an sich Einfluss auf das inflammatorische Potenzial von BDC nehmen kann. Hieran anknüpfend sollte untersucht werden, ob PF-4 bei kombinierter Stimulation mit LPS oder BCG auch ein modulierendes Potenzial während der TLR-induzierten Ausreifung dieser Zellen ausüben kann.

#### 3.2.4.1 PF-4 induziert eine Vielzahl inflammatorischer Zytokine in BDC

In einem ersten Experiment sollte der Aktivierungsstatus von BDC nach alleiniger Applikation von PF-4 analysiert werden. Abbildung 3.2.4.1 verdeutlicht die massive Induktion eines breiten inflammatorischen Zytokinprofils in PF-4-aktivierten BDC. In dieser Abbildung ist eine Auswahl an regulierten Genen gezeigt. Die vollständige Auflistung der durch PF-4 induzierten mRNA-Transkripte ist im Anhang als Tabelle A.6 gezeigt. Die *de novo*-Induktion von TNF $\alpha$  ist in der Abbildung 3.2.4.1 exemplarisch hervorgehoben.



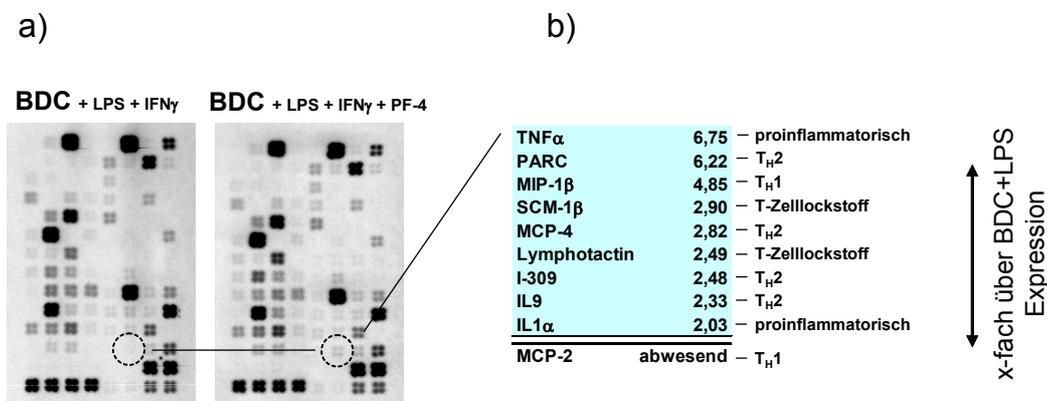
**Abbildung 3.2.4.1: Microarray-Analyse des mRNA-Transkriptionsprofils inflammatorischer Zytokine und der dazugehörigen Rezeptoren in CD1c<sup>+</sup> BDC.** Frisch isolierte BDC wurden 18 h in R<sub>xx</sub>1 oder in R<sub>xx</sub>1 versetzt mit PF-4 (4  $\mu$ M) kultiviert. Die RNA von 3 unabhängigen Spendern wurde isoliert, direkt vor der radioaktiven Markierung mittels [<sup>33</sup>P] vereinigt und auf die Membranen (*Human Inflammatory Cytokines & Receptors Gene Array*; Superarray) hybridisiert. Neben den Membranen (a) erfolgt die Darstellung der gegen das Haushaltsgen (PPIA) normalisierten Genregulation in PF-4-stimulierten BDC als x-fach reguliert in Relation zu unstimulierten BDC. Die unterschiedliche Regulation von TNF $\alpha$  ist exemplarisch durch Kreise hervorgehoben.

Eine Vielzahl von proinflammatorischen, T-Zell-aktivierenden sowie diverse T<sub>H</sub>2-assoziierte Zytokine wurden in PF-4-aktivierten BDC nach 18 h *in vitro*-Kultur auf mRNA-Ebene induziert. An dieser Stelle muss darauf hingewiesen werden, dass CD1c<sup>+</sup> BDC prinzipiell im Verlauf von *in vitro*-Kulturen spontan ausreifen. Diese Spontanausreifung war teilweise anhand der Induktion von proinflammatorischen Zytokinen (siehe Tabelle 3.2.4.3) oder phänotypisch durch Induktion des DC-spezifischen Aktivierungsmarkers CD83 (siehe Abbildung 3.2.4.4) nachweisbar. Dennoch

konnte mithilfe dieser Microarray-Experimente gezeigt werden, dass PF-4 in BDC auf mRNA-Ebene die Heraufregulation proinflammatorischer Zytokine wie IL-6, MIP-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  oder auch die T<sub>H</sub>2-assoziierten Chemokine MCP-1 und MDC bewirkt.

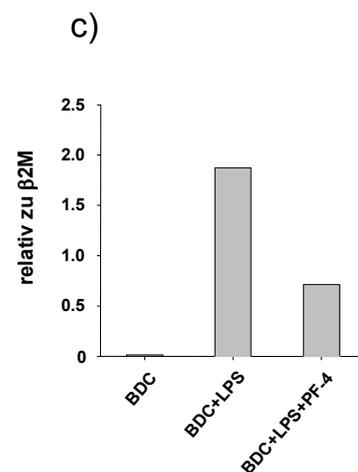
### 3.2.4.2 Die LPS-induzierte Produktion inflammatorischer Mediatoren durch BDC wird durch PF-4 moduliert

In einem nächsten Schritt wurde, zusätzlich zu den in 3.2.4.1 dargestellten aktivierenden Eigenschaften von PF-4, der Einfluss von PF-4 auf das inflammatorische Potenzial von TLR-aktivierten BDC untersucht. Es galt nachzuweisen, ob die LPS+IFN $\gamma$ -induzierten Ausreifungsprozesse in BDC in Anwesenheit von PF-4 moduliert werden. Auch in dieser Versuchsreihe wurden zunächst die inflammatorischen Zytokine und Rezeptoren in themenorientierten cDNA Microarray-Analysen auf mRNA-Ebene untersucht, um so einen umfassenden Überblick zu ermöglichen.



**Abbildung 3.2.4.2:**

**Analyse des mRNA-Transkriptionsprofils inflammatorischer Zytokine und der dazugehörigen Rezeptoren in aktivierten CD1c<sup>+</sup> BDC.** Frisch isolierte BDC wurden in R<sub>xx</sub>1 eingesetzt und 18 h mit LPS (2 $\mu$ g/ml) + IFN $\gamma$  (2 ng/ml) oder mit LPS (2  $\mu$ g/ml) + IFN $\gamma$  (2 ng/ml) + PF-4 (4  $\mu$ M) aktiviert. Die RNA von 3 unabhängigen Spendern wurde isoliert, direkt vor der radioaktiven Markierung mittels [<sup>33</sup>P] vereinigt und auf die Membranen (*Human Inflammatory Cytokines & Receptors Gene Array*; Superarray) hybridisiert. Neben den Membranen (a) erfolgt die Darstellung der gegen das Haushaltsgen (PPIA) normalisierten Genregulation in LPS+IFN $\gamma$ -stimulierten BDC als x-fach reguliert in Relation zu LPS+IFN $\gamma$ +PF-4-stimulierten BDC. In c) ist exemplarisch die Regulation der relativen mRNA-Expression von MCP-2 in unstimulierten sowie LPS + IFN $\gamma$ - oder LPS + IFN $\gamma$  + PF-4-aktivierten BDC gezeigt.



In Abbildung 3.2.4.2 ist gezeigt, dass PF-4 einen generell aktivierenden Einfluss auf LPS-stimulierte BDC ausübte. Verschiedene T-Zell-aktivierende oder proinflammatorische Zytokine, beispielsweise IL-1 $\alpha$  und TNF $\alpha$ , aber auch einige T<sub>H</sub>2-assoziierte Chemokine wie PARC und I-309 wurden durch PF-4, zusätzlich zur Ausreifung durch LPS+IFN $\gamma$ , induziert. Die verstärkte Induktion von TNF $\alpha$ -mRNA ist exemplarisch hervorgehoben. MCP-2 wurde demgegenüber zwar durch LPS allein induziert, bei kombinierter Stimulation mit LPS und PF-4 jedoch herabreguliert. Diese PF-4-vermittelte Inhibition von MCP-2 konnte sowohl durch Auswertung der Arraymembranen (3.2.4.2

a und b) als auch mittels quantitativer PCR (3.2.4.2 c) bestätigt werden. Die vollständige Auflistung der unterschiedlich regulierten Gene ist im Anhang als Tabelle A.7 zu finden.

In einem nächsten Schritt wurde die Konzentration einiger ausgewählter Zytokine auf Proteinebene mittels ELISA in den Überständen von BDC bestimmt (Tabelle 3.2.4.3). Dabei wurde deutlich, dass PF-4 allein bereits die Sekretion proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  in CD1c<sup>+</sup> BDC induzierte. Des Weiteren wurden in PF-4-aktivierten BDC inflammatorische Chemokine wie RANTES sowie insbesondere IL-8 und MDC auf Proteinebene massiv induziert. Die TLR-abhängige Ausreifung der BDC mittels LPS+IFN $\gamma$  resultierte erwartungsgemäß in der Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-6 und TNF $\alpha$  sowie in geringen Mengen von IL-12p70. Auch die inflammatorischen Chemokine IL-8, MDC und RANTES konnten durch LPS induziert werden. Mit Ausnahme von IL-12p70 wurde durch PF-4 oder durch LPS in BDC ein ver-

**Tab. 3.2.4.3: Induzierbarkeit inflammatorischer Zytokine und Chemokine in CD1c<sup>+</sup> BDC.** Frisch isolierte BDC wurden 18 h durch PF-4 (4  $\mu$ M) oder durch LPS (2  $\mu$ g/ml) + IFN $\gamma$  (2 ng/ml) oder durch Kombination aller drei Stimuli aktiviert. Die Quantifizierung der sezernierten Zytokine erfolgte mithilfe von Multiplex- bzw. konventionellen ELISA. Das Experiment wurde viermal mit vergleichbaren Ergebnissen durchgeführt.

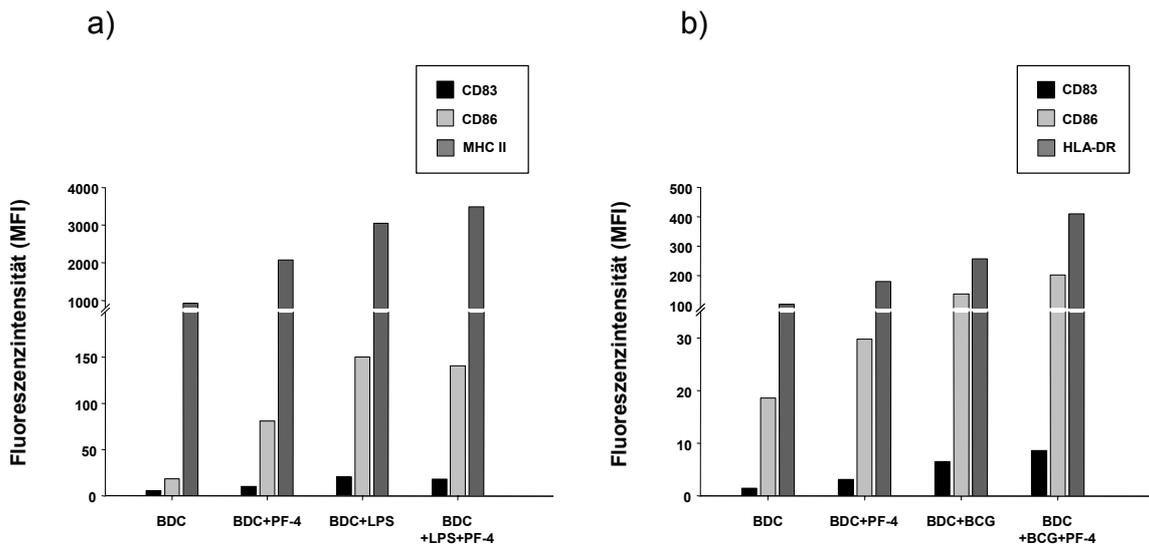
		<b>BDC</b>	<b>BDC + PF-4</b>	<b>BDC + LPS</b>	<b>BDC + LPS + PF-4</b>
↑ Zytokine (pg/ml) ↓	<b>IL-1<math>\beta</math></b>	<b>358</b>	<b>752</b>	<b>1.710</b>	<b>2.336</b>
	<b>IL-6</b>	<b>1.087</b>	<b>1.110</b>	<b>19.971</b>	<b>18.178</b>
	<b>IL-8</b>	<b>24.300</b>	<b>74.500</b>	<b>146.900</b>	<b>229.500</b>
	<b>IL-10</b>	<b>208</b>	<b>251</b>	<b>185</b>	<b>225</b>
	<b>IL-12</b>	<b>n.d.</b>	<b>n.d.</b>	<b>149</b>	<b>30</b>
	<b>MDC</b>	<b>71.800</b>	<b>277.300</b>	<b>91.000</b>	<b>115.700</b>
	<b>RANTES</b>	<b>50</b>	<b>888</b>	<b>919</b>	<b>3.060</b>
	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>99</b>	<b>1.196</b>	<b>2.164</b>	<b>12.574</b>

gleichbares Zytokinprofil induziert. Die Kombination von LPS+IFN $\gamma$  mit PF-4 verstärkte das inflammatorische Potenzial der Zellen. Wie aufgrund der Microarray-Analysen bereits vermutet, wurde TNF $\alpha$  durch kombiniert stimulierte BDC in sehr viel höheren Mengen freigesetzt als durch LPS+IFN $\gamma$  allein (12,57 ng/ml gegenüber 2,16 ng/ml). PF-4 steigerte außerdem die bereits durch LPS+IFN $\gamma$  induzierte Produktion von IL-1 $\beta$ , IL-8, MDC sowie RANTES. Interessanterweise wurde die LPS-induzierte Sezernierung von IL-12p70 auf geringem Niveau durch PF-4 inhibiert, während anti-inflammatorisches IL-10 grundsätzlich unbeeinflusst blieb. Es bleibt festzuhalten, dass PF-4 allein einerseits ein Spektrum inflammatorischer Zytokine in BDC induzierte und andererseits die Sekretion von LPS-induzierten Zytokinen weiter verstärken konnte.

Nachdem aufgezeigt werden konnte, dass PF-4 das inflammatorische Zytokinprofil von BDC moduliert, sollten in weiterführenden Untersuchungen auch phänotypische Veränderungen der Zellen bei Interaktion mit PF-4 einbezogen werden. Hierbei standen typische Oberflächenantigene von DC wie Antigen-präsentierende MHC II-Komplexe oder kostimulierendes CD86 sowie der spezifische DC-Aktivierungsmarker CD83 im Fokus der Analysen. Anhand dieser Untersu-

chungen sollte untersucht werden, ob PF-4 neben der Induktion von inflammatorischen Mediatoren in diesen Zellen auch funktionelle, bei T-Zellinteraktionen bedeutsame Oberflächenmoleküle moduliert. Hierzu wurden wieder die Effekte von PF-4 allein wie auch in Kombination mit verschiedenen TLR-Liganden getestet.

In Abbildung 3.2.4.4 a ist die Expression der genannten Oberflächenantigene nach Aktivierung durch PF-4, LPS+IFN $\gamma$  oder in Kombination gezeigt. In einem weiteren Versuchsaufbau (3.2.4.4 b) wurden anstelle TLR4-aktivierender Lipopolysaccharide zusätzlich TLR2-aktiverende BCG-Mykobakterien verwendet.



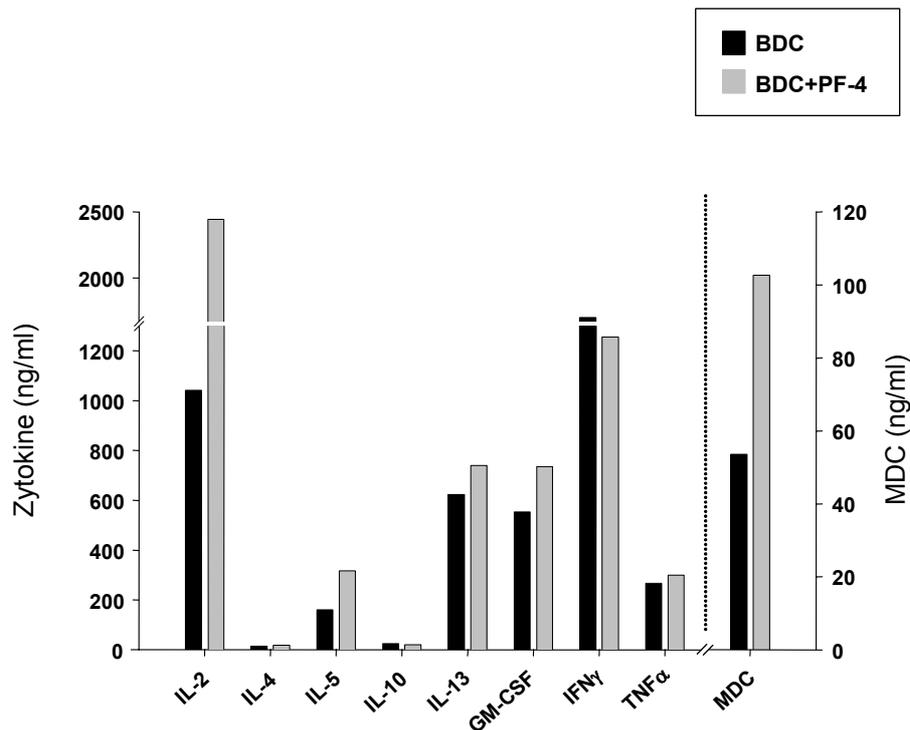
**Abbildung 3.2.4.4: Veränderung des Phänotyps von BDC nach Aktivierung durch PF-4 oder in Kombination mit TLR-Ligation.** (a) Frisch isolierte BDC wurden 18 h mit PF-4 (4  $\mu$ M), LPS (2  $\mu$ g/ml) + IFN $\gamma$  (2 ng/ml), in Kombination beider Stimuli aktiviert oder unbehandelt gelassen. (b) Frisch isolierte BDC wurden 18 h mit PF-4 (4 $\mu$ M), BCG (MOI=2), in Kombination beider Stimuli ausgereift oder unbehandelt gelassen. Die Expression angezeigter Oberflächenmoleküle erfolgt in beiden Teilabbildungen als durchschnittliche Fluoreszenzintensität (MFI) in Relation zu unspezifischen Isotyp-Kontrollen. Gezeigt ist ein repräsentatives Experiment aus drei Wiederholungen.

Wie aus Abbildung 3.2.4.4 ersichtlich ist, war anhand der Induktion von CD83 nach 18 h *in vitro*-Kultur eine phänotypische Spontanaktivierung der BDC nachweisbar. Allerdings konnte durch PF-4 bei den hier untersuchten DC-Markern, über diese spontane Induktion hinaus, eine deutliche Heraufregulation dieser Oberflächenantigene nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde bei diesen Experimenten auch deutlich, dass PF-4 die Expression von MHC II bzw. HLA-DR (eine der Isoformen von MHC II) auf BDC deutlich verstärkt. In früheren Studien bezüglich PF-4-induzierter Differenzierungsvorgänge in Monozyten wurde demgegenüber gezeigt, dass PF-4 die Expression von HLA-DR, während der Differenzierung dieser Zellen in Makrophagen, massiv herunterreguliert<sup>97</sup>. Bezogen auf dieses essenzielle T-Zell-aktivierende Molekül scheint es somit grundsätzlich unterschiedliche PF-4-vermittelte Effekte, je nach Differenzierungsgrad der betroffenen Zelltypen (Monozyten oder BDC) oder der während der Interaktion anwesenden Zytokine (PF-4 allein oder in Kombination mit IL-4) zu geben. Außerdem wird in der Abbildung 3.2.4.4 verdeutlicht, dass BDC erwartungsgemäß nach Stimulation mit LPS+IFN $\gamma$  (a) oder BCG (b) phänotypisch durch Induktion von CD83, CD86 und MHC II-Komplexen nachhaltig ausgereift wurden. Interessanterweise wurde durch gleichzeitige Applikation der TLR-Liganden und PF-4 der Aktivie-

rungsgrad der BDC tendenziell noch weiter verstärkt. Dies war besonders eindrucksvoll anhand der verstärkten Expression von MHC II-Molekülen sichtbar.

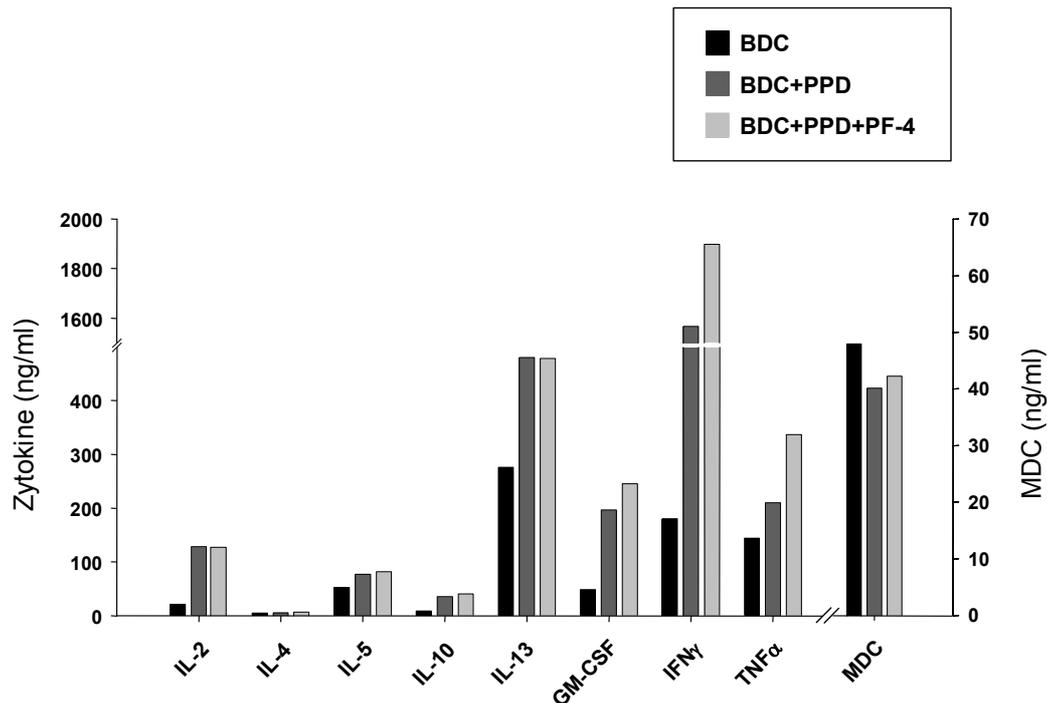
### **3.2.5 Modulation der BDC-vermittelten Stimulation von Lymphozyten durch PF-4**

In Abschnitt 3.2.4 konnte gezeigt werden, dass PF-4 die Immunbiologie von CD1c<sup>+</sup> BDC moduliert. Sowohl die PF-4-induzierte Zytokinsekretion als auch die phänotypische Aktivierung dieser Zellen ließen dabei Auswirkungen auf nachfolgende T-Zellantworten vermuten. In einem abschließenden Themenkomplex sollten daher funktionelle Konsequenzen der aufgedeckten Modulation von CD1c<sup>+</sup> BDC durch PF-4 untersucht werden. Es sollte geklärt werden, ob PF-4 auf diesem Wege auf die Nachhaltigkeit und Qualität der BDC-vermittelten Aktivierung von verschiedenen T-Zellpopulationen Einfluss nehmen kann. Ein wesentlicher funktioneller Parameter zur Beurteilung des lymphostimulatorischen Potenzials von DC stellt die gemischte Leukozytenreaktion (MLR) dar. In MLR-Experimenten wird die funktionelle Kapazität von DC durch die antigenunabhängige Induktion von Proliferation heterologer T-Zellen bewertet. Im Verlauf dieser Untersuchungen konnten jedoch keine signifikanten Unterschiede zwischen unstimulierten BDC und PF-4- bzw. LPS-aktivierten BDC bezüglich der Induktion von T-Zellproliferation aufgezeigt werden (Daten nicht gezeigt). Zusätzlich zu diesen Experimenten wurde in einer weiteren Versuchsreihe das resultierende Zytokinprofil von heterologen T-Zellen untersucht. Es stellte sich dabei heraus (siehe Abbildung 3.2.5.1), dass PF-4 durch Interaktion mit BDC eine generelle Erhöhung der Sekretionsrate von T-Zellzytokinen induzierte. Tendenziell wurden in dem gezeigten Experiment zwar erneut IL-5 und IL-13 leicht erhöht und IFN $\gamma$  dabei inhibiert. Diese Modulation durch PF-4 war jedoch in diesem Ausmaß nicht konsistent über die Experimente reproduzierbar, zumal gleichzeitig die Produktion des T-Zell-aktivierenden und präferenziell T<sub>H</sub>1-polarisierenden Leitzytokins IL-2 durch PF-4-behandelte BDC sehr deutlich gesteigert wurde. In diesen BDC/T-Zell-Kokulturen konnte dessen ungeachtet erneut die massive Induktion von MDC in PF-4-behandelten BDC nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.2.5.1:**  $T_H1/T_H2$ -Zytokinprofil von  $CD4^+ CD45RA^+$  naiven T-Zellen in Kokultur mit heterologen BDC in gemischter Leukozytenreaktion. Frisch isolierte BDC wurden 18 h mit PF-4 ( $4\mu M$ ) aktiviert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die BDC mit heterologen  $CD4^+ CD45RA^+$  naiven T-Zellen im Verhältnis 1:10 (BDC/T-Zellen) für weitere fünf Tage kokultiviert. Das induzierte Zytokinprofil wurde anschließend mittels Multiplex- bzw. konventionellen ELISA bestimmt. Dieses Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

In einem abschließenden Versuchsansatz sollte in autologen Antigenpräsentations-Assays außerdem die antigenabhängige Reaktivierung von vorpolarisierten  $T_H1$ -Gedächtniszellen durch PPD-beladene BDC untersucht werden. Ziel dieser Experimente war es aufzuklären, ob PF-4 über die Modulation von  $CD1c^+$  BDC die Ausrichtung von stark vorpolarisierten adaptiven Immunzellen beeinflussen kann. In der Abbildung 3.2.5.2 wird verdeutlicht, dass die Beladung von BDC mit PPD-Antigenen wie erwartet insbesondere die Sekretion substanzieller Mengen IL-2 und  $IFN\gamma$  in T-Gedächtniszellen anregte. Wurden BDC jedoch simultan mit PPD-Antigenen und PF-4 aktiviert, resultierte dies in einer weiteren deutlichen Steigerung der  $IFN\gamma$ - und  $TNF\alpha$ -Produktion in diesen Kokulturen. Andere Zytokine wie IL-2, IL-5 oder IL-13 blieben hiervon weitestgehend unbeeinflusst. Interessanterweise wurde die vorher in BDC beobachtete PF-4-vermittelte Induktion von MDC bei Kombination von PF-4 mit PPD-Antigenen vollständig inhibiert.



**Abbildung 3.2.5.2:**  $T_H1/T_H2$ -Zytokinprofil von  $CD3^+$  T-Gedächtniszellen in Kokultur mit autologen BDC. Frisch isolierte BDC wurden 18 h mit PPD-Antigenen (10  $\mu$ g/ml) oder PPD-Antigenen (10  $\mu$ g/ml) + PF-4 (4  $\mu$ M) aktiviert oder unbehandelt gelassen. Anschließend wurden die BDC mit autologen  $CD3^+$  T-Gedächtniszellen eines PPD $^+$  Spenders im Verhältnis 1:10 (BDC/T-Zellen) für weitere fünf Tage kokultiviert. Das induzierte Zytokinprofil wurde anschließend mittels Multiplex- bzw. konventionellen ELISA charakterisiert. Dieses Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass PF-4 das Überleben *in vitro* kultivierter  $CD1c^+$  BDC signifikant verlängerte und diese Zellen zudem auf mRNA- wie auch auf Proteinebene durch PF-4 zur Induktion verschiedener inflammatorischer Zytokine angeregt wurden. PF-4 steigerte in BDC die Expression von Aktivierungsmolekülen sowie MHC II-Komplexen. Des Weiteren wurde die TLR-induzierte Ausreifung durch PF-4 sowohl in Bezug auf inflammatorische Zytokine als auch auf phänotypische Aktivierungsmarker weiter verstärkt. Diese PF-4-vermittelten Effekte hatten zudem funktionelle Konsequenzen für die Interaktion mit T-Zellen. Hierbei wurde gezeigt, dass PF-4-modulierte BDC im Vergleich zu unbehandelten Zellen, je nach Kulturbedingungen, die Sekretion von IL-2 bzw. von IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  durch aktivierte T-Zellen verstärken konnten.

### 3.3 Dendritische Zellen als Produzenten von IFN $\gamma$ *in vitro* und *in vivo*

Bei den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten vergleichenden Analysen zwischen konventionellen MoDC und PFAPC lieferten die Abbildungen 3.1.5.4 bzw. 3.1.5.5 zunächst erste deutliche Hinweise auf die Induktion von IFN $\gamma$  durch *in vitro*-generierte MoDC. In diesen Zellen konnte hierbei sowohl auf mRNA-Ebene als auch im Zellkulturüberstand auf Proteinniveau eine substantielle Induktion des  $T_H1$ -Schlüsselzytokins nach Stimulation mit BCG nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu konnte dieses Zytokin in vergleichbar stimulierten PFAPC weder auf mRNA- noch auf Proteinebene substantiell induziert werden. Bei diesen Untersuchungen stellte sich jedoch als problematisch heraus, dass selbst geringe Mengen kontaminierender Lymphozyten oder NK-Zellen in den APC-Kulturen für falsch positive Signale in ELISA-Messungen von Zellkultur-

überständen verantwortlich hätten sein können. Aus diesem Grund war es unerlässlich, die Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  durch myeloide APC auch auf Einzelzellniveau nachzuweisen.

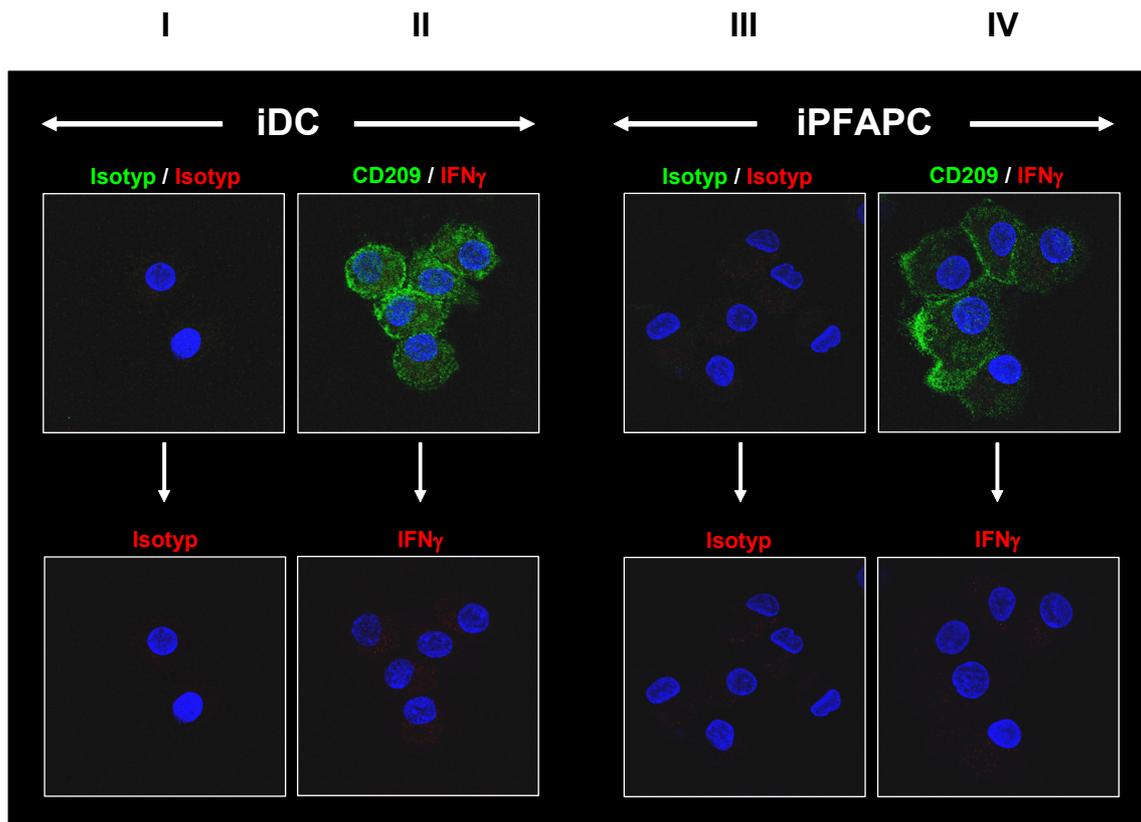
### 3.3.1 Proteinnachweis von $\text{IFN}\gamma$ in Monozyten-generierten APC

Die Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  als Schlüsselzytokin bei  $T_H1$ -polarisierten Immunantworten war nach bisheriger Lehrmeinung ausschließlich lymphoiden  $\text{CD4}^+$  T-Helferzellen<sup>123</sup>,  $\text{CD8}^+$  zytotoxischen T-Zellen<sup>124</sup> oder aktivierten NK-Zellen<sup>125;126</sup> vorbehalten. In neueren Studien der vergangenen Jahre konnten jedoch Hinweise für die Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  auch in Zellen mit myeloider Herkunft wie beispielsweise Alveolarmakrophagen gefunden werden<sup>127-129</sup>. In diesem Zusammenhang wurde in vorangegangenen Arbeiten unserer Laborgruppe und mithilfe experimenteller Versuchsreihen in dieser Arbeit zusätzlich der Nachweis von  $\text{IFN}\gamma$ -produzierenden, *in vitro* generierten myeloiden MoDC erbracht (Fricke *et al.*; J Immunol, in Revision). Der Nachweis für  $\text{IFN}\gamma$ -produzierende dendritische Zellen wurde dann im Rahmen der hier vorliegenden Arbeit zusätzlich auf die *in vivo*-Situation erweitert.

#### 3.3.1.1 Stimulation durch BCG induziert $T_H1$ -polarisierendes $\text{IFN}\gamma$ in MoDC, nicht aber in PFAPC

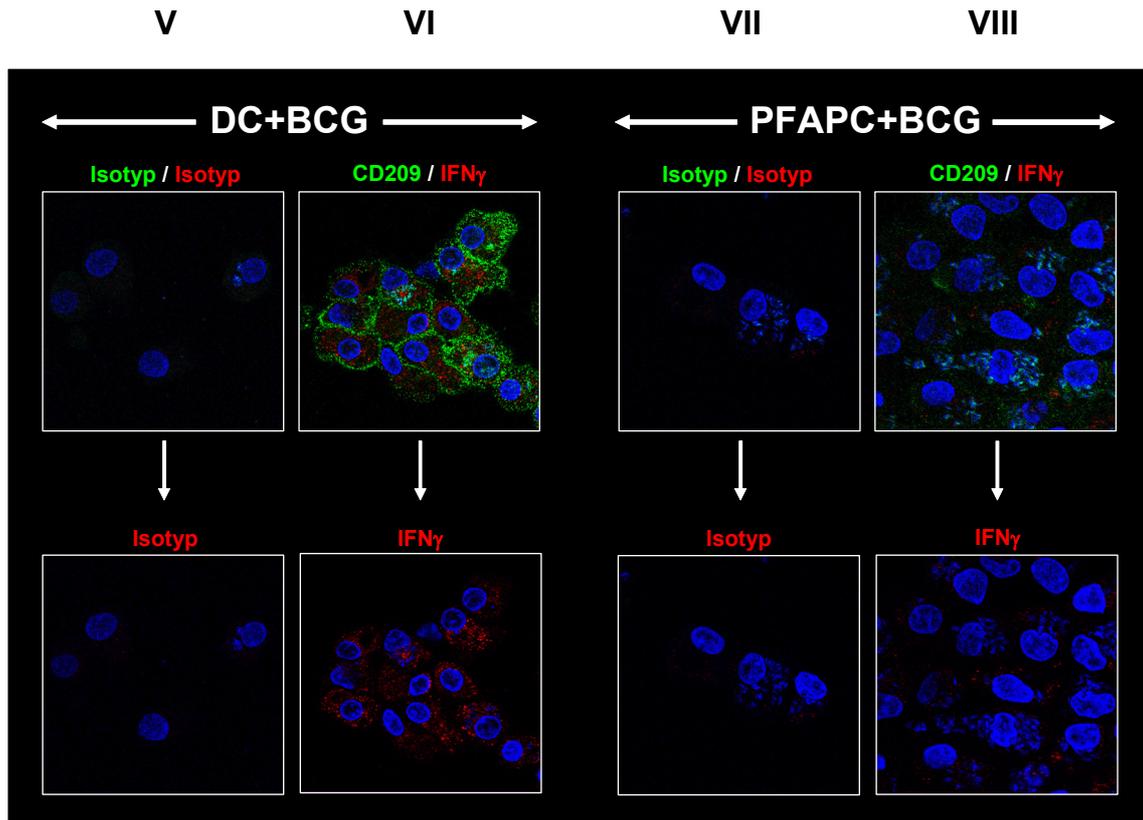
Um zweifelsfrei die Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  durch MoDC oder PFAPC nachweisen zu können, wurde eine immunzytochemische Färbetechnik für die konfokale Laserscanning-Mikroskopie etabliert. Hierbei stand der sensitive und direkte Nachweis von  $\text{CD209}^+$   $\text{IFN}\gamma^+$  Zellen auf Einzelzellniveau im Mittelpunkt der Untersuchungen. Abbildung 3.3.1.1 (I – IV) zeigt zunächst Aufnahmen von immunzytochemisch gefärbten unstimulierten MoDC bzw. PFAPC in der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie. In dieser Abbildung wird deutlich, dass MoDC wie auch PFAPC den membranständigen DC-Marker CD209 (grün) exprimierten. Zudem wird jedoch auch sichtbar, dass in unstimulierten MoDC oder PFAPC, wie aufgrund der in Abbildung 3.1.5.4 und 3.1.5.5 dargestellten Datenlage erwartet, kein immunzytochemischer Nachweis für  $\text{IFN}\gamma$  auf Proteinebene erbracht werden konnte. Zu beachten ist, dass die spezifische Antikörperfärbung in allen Abbildungen der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie immer in Relation zu den jeweiligen unspezifischen Isotyp-Kontrollen beurteilt werden muss.

Im Anschluss an die Untersuchungen zur konstitutiven Expression von  $\text{IFN}\gamma$  in MoDC und PFAPC wurde die Induzierbarkeit des lymphoiden Zytokins durch mykobakterielle Aktivierung auf Einzelzellniveau analysiert. In Abbildung 3.3.1.2 sind spezifische Färbungen von 18 h mit BCG (MOI=1) stimulierten MoDC (V und VI) bzw. PFAPC (VII und VIII) neben den entsprechenden Isotyp-Kontrollen gezeigt. In diesen Experimenten konnte zweifelsfrei auf Einzelzellniveau nachgewiesen werden, dass myeloide  $\text{CD209}^+$  MoDC nach Aktivierung durch BCG das lymphoide,  $T_H1$ -polarisierende Zytokin  $\text{IFN}\gamma$  (rot) produzierten. In den repräsentativen Abbildungen in 3.3.1.2 ist außerdem ersichtlich, dass zwar nur in etwa der Hälfte der MoDC BCG-Mykobakterien nachweisbar waren, jedoch prinzipiell weitaus mehr Zellen in der Immunzytochemie positiv für  $\text{IFN}\gamma$  gewesen sind. Die Induktion von  $\text{IFN}\gamma$  in MoDC scheint demnach nicht ausschließlich mit einer direkten Endocytose von BCG einherzugehen, sondern kann vermutlich auch über parakrine Mechanismen induziert werden.



**Abbildung 3.3.1.1: Nachweis von IFN $\gamma$  in unstimulierten myeloiden APC.** Konfokal-mikroskopische Aufnahmen von Tag 5 differenzierten, unstimulierten MoDC (je 500 U/ml GM-CSF und IL-4) und PFAPC (4  $\mu$ M PF-4 und 500 U/ml IL-4). Die spezifischen Färbungen in Spalte II und IV für CD209 bzw. IFN $\gamma$  sind in Grün (Alexa 488) bzw. in Rot (Alexa 546) neben den jeweiligen Isotyp-Kontrollen in Spalte I und III dargestellt. Die Zellkerne (TOTO-3) erscheinen in Blau. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mithilfe eines Leica TCS SP2-Mikroskops erstellt und mit Adobe<sup>®</sup> Photoshop weiterbearbeitet. Dieses Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

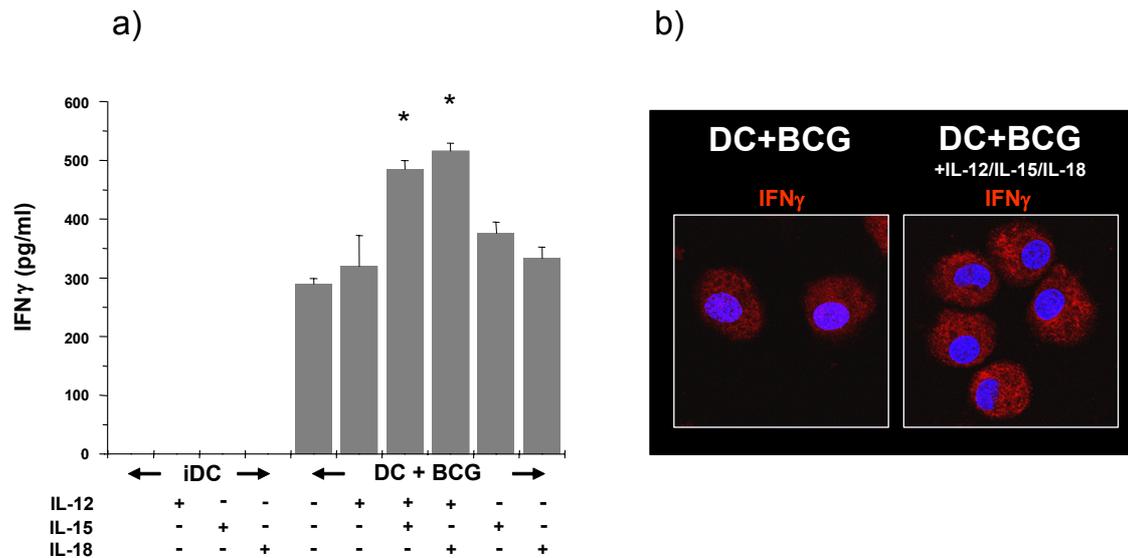
Demgegenüber wird in Abbildung 3.3.1.2 allerdings auch deutlich, dass in BCG-aktivierten PFAPC, wie aufgrund der bereits in Kapitel 3.1.5 präsentierten Daten vermutet, kein IFN $\gamma$  nachgewiesen werden konnte. Aus diesem Grund wurden die PFAPC aus den nachfolgenden Experimenten zum Nachweis IFN $\gamma$ -produzierender dendritischer Zellen ausgenommen. Erwähnenswert ist, dass BCG-aktivierte PFAPC in der konfokalen Mikroskopie nur noch schwach positiv für eine CD209-Expression erschienen, wobei CD209 hauptsächlich intrazellulär mit phagozytierten BCG-Mykobakterien kolokalisierte. Eine CD209-vermittelte Erkennung und Internalisierung von mykobakteriellen Zellwandstrukturen durch DC konnte kürzlich in verschiedenen Studien nachgewiesen werden<sup>130-132</sup>. Zudem konnte als eine PFAPC-spezifische Besonderheit auch mithilfe der konfokalen Laserscanning-Mikroskopie die bereits unter 3.1.2 dargestellte erhöhte Phagozytoseaktivität von mikrobiell aktivierten PFAPC im Vergleich zu MoDC nachgewiesen werden.



**Abbildung 3.3.1.2: Nachweis von  $\text{IFN}\gamma$  in BCG-stimulierten myeloiden APC.** Konfokal-mikroskopische Aufnahmen von Tag 5 differenzierten MoDC (je 500 U/ml GM-CSF und IL-4) und PFAPC (4  $\mu\text{M}$  PF-4 und 500 U/ml IL-4) nach 18 h Aktivierung durch BCG (MOI=1). Die spezifischen Färbungen in Spalte VI und VIII für CD209 bzw.  $\text{IFN}\gamma$  sind in Grün (Alexa 488) bzw. in Rot (Alexa 546) neben den jeweiligen Isotyp-Kontrollen in Spalte V und VII dargestellt. Die Zellkerne (TOTO-3) und BCG-Mykobakterien (SYTO45) erscheinen in Blau. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mithilfe eines Leica TCS SP2-Mikroskops erstellt und mit Adobe® Photoshop weiterbearbeitet. Dieses Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

### 3.3.2 Modulation der $\text{IFN}\gamma$ -Produktion durch IL-12/IL-15/IL-18

Im weiteren Verlauf der Untersuchungen sollte einer verstärkten Induktion von myeloidem  $\text{IFN}\gamma$  in MoDC durch die  $\text{T}_\text{H}1$ -assoziierten Zytokine IL-12, IL-15 sowie IL-18 nachgegangen werden. Im murinen System konnte bereits gezeigt werden, dass IL-12 in Kombination mit IL-15 oder IL-18 die Produktion von  $\text{IFN}\gamma$  sowohl durch Lymphozyten als auch in Makrophagen und DC steigert. Auch in der vorliegenden Arbeit konnten signifikante additive Effekte der  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion bei kombinierter Anwendung von IL-12/IL-15 oder IL-12/IL-18 in MoDC aufgedeckt werden. Dabei war die additive Induktion von  $\text{IFN}\gamma$  nicht nur mittels ELISA-Technik in den Zellkulturüberständen von MoDC nachweisbar (Abbildung 3.3.2 a), sondern zusätzlich konnte dieser Effekt auch intrazellulär auf Einzelzellniveau in der konfokalen Mikroskopie (Abbildung 3.3.2 b) dargestellt werden.



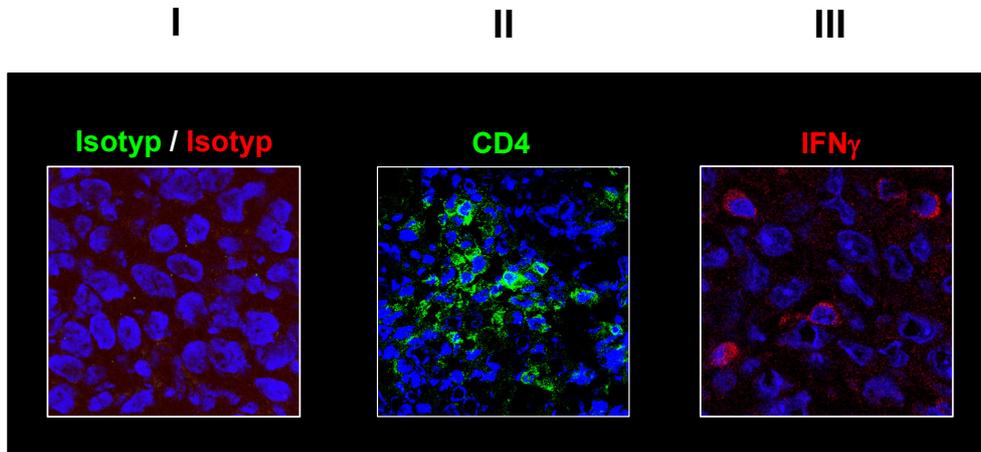
**Abbildung 3.3.2: Additive Induktion von IFN $\gamma$  in MoDC nach Stimulation mit BCG in Kombination mit IL-12, IL-15 oder IL-18.** MoDC (je 500 U/ml GM-CSF und IL-4) wurden an Tag 5 der Differenzierung 18 h mit BCG (MOI=0,5), mit BCG und Kombinationen von IL-12, IL-15 und IL-18 (jeweils 10 ng/ml) oder allein mit IL-12, IL-15 oder IL-18 (jeweils 10 ng/ml) aktiviert. Die Freisetzung von IFN $\gamma$  in den Zellkulturüberstand wurde mittels ELISA-Technik bestimmt. Die statistische Signifikanz ( $p$ -Wert < 0,05) der unterschiedlichen Zytokinproduktion zwischen BCG- und BCG+Zytokin-stimulierten DC wurde mithilfe des Student t-Test bestätigt und ist in der Abbildung jeweils durch \* angezeigt (a). Die Messwerte sind als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung eines Triplikates dargestellt. Parallel wurden die Zellen immunzytochemisch in der konfokalen Mikroskopie im Hinblick auf IFN $\gamma$ -Produktion (rot) analysiert (b). Die Zellkerne (TOTO-3) erscheinen in Blau. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mithilfe eines Leica TCS SP2-Mikroskops erstellt und mit Adobe<sup>®</sup> Photoshop weiterbearbeitet. Dieses Experiment wurde dreimal mit vergleichbaren Ergebnissen wiederholt.

### 3.3.3 Nachweis von IFN $\gamma$ -produzierenden DC *ex vivo* und *in vivo*

Bisher konnte im Rahmen dieser Arbeit die Produktion von IFN $\gamma$  durch *in vitro*-generierte myeloide MoDC auf Einzelzellniveau nachgewiesen werden. Um in einem abschließenden Themenkomplex zu klären, ob die Expression dieses T<sub>H</sub>1-polarisierenden Schlüsselzytokins auf *in vitro* generierte MoDC beschränkt oder ebenso *in vivo* nachweisbar ist, wird zunächst auf die Ergebnisse aus Abbildung 3.2.4.2 verwiesen. Bei diesen Microarray-Analysen konnte in *ex vivo* isolierten CD1c<sup>+</sup> myeloiden BDC nach Stimulation mit LPS auf mRNA-Ebene ein deutliches Signal für dieses Zytokin festgestellt werden. mRNA-Analysen bezüglich der Induktion von IFN $\gamma$  konnten diese Microarray-Daten anschließend in der quantitativen PCR bestätigen (Daten nicht gezeigt). Eine Zytokinbestimmung mittels ELISA in den Zellkulturüberständen wurde hierbei nicht durchgeführt, da grundsätzlich rekombinantes IFN $\gamma$  als Kostimulus neben LPS zur Aktivierung der BDC verwendet wurde.

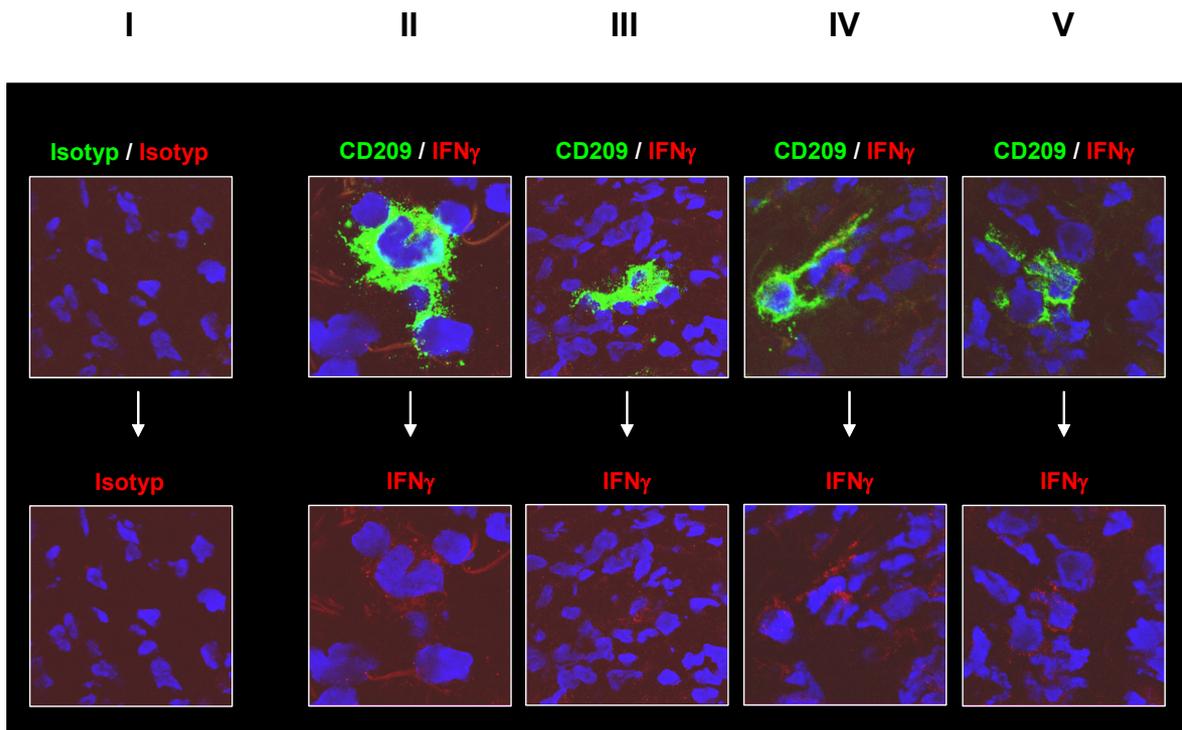
In einem nächsten Schritt sollte die Produktion von IFN $\gamma$ , erneut mithilfe von immunzytochemischen Färbungen für die konfokale Mikroskopie, auch *in vivo* nachgewiesen werden. Hierzu wurden ultradünne Gefrierschnitte von Blasenbiopsien BCG-therapierter Tumorpatienten verwendet. Diese Biopsien wurden in Vorexperimenten konfokal-mikroskopisch auf Infiltration von CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen sowie IFN $\gamma$ <sup>+</sup> Zellen untersucht (Abbildung 3.3.3). Auf diesem Wege sollte die hohe Spezifität des verwendeten  $\alpha$ IFN $\gamma$ -Antikörpers (Klon GZ-4) auch bei Verwendung von Gewebebiopsien zweifelsfrei bestätigt werden. In Abbildung 3.3.3 wird zunächst gezeigt, dass

erwartungsgemäß eine hohe Zahl an  $CD4^+$  T-Zellen (grün) nach Instillation von BCG-Mykobakterien in die Blase eingewandert war (II). Zusätzlich konnte jedoch der auf deutlich weniger Zellen beschränkte, hochspezifische Nachweis für die Expression von  $IFN\gamma$  (rot) erbracht werden (III). In dieser Abbildung 3.3.3. III fällt bei einigen Zellen das schmale, direkt an die Kernregion assoziierte zytoplasmatische Signal für  $IFN\gamma$  auf. Diese Zellmorphologie ist typisch für  $CD4^+$  T-Helferzellen.



**Abbildung 3.3.3: Nachweis von  $CD4^+$  und  $IFN\gamma^+$  T-Zellen in Blasenbiopsien.** Konfokal-mikroskopische Aufnahmen von Gefrierschnitten aus Blasenbiopsien BCG-therapierter Tumorpatienten zum Nachweis von  $CD4^+$  sowie  $IFN\gamma^+$  T-Zellen. Die spezifischen Färbungen in Spalte II und III für  $CD4$  bzw.  $IFN\gamma$  sind in Grün (Alexa 488) bzw. in Rot (Alexa 546) neben der Isotyp-Kontrolle in Spalte I dargestellt. Die Zellkerne (TOTO-3) erscheinen in Blau. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mithilfe eines Leica TCS SP2-Mikroskops erstellt und mit Adobe® Photoshop weiterbearbeitet.

In einem weiteren Versuchsansatz sollte abschließend der Nachweis von  $CD209^+$   $IFN\gamma^+$  dendritischen Zellen in den Blasenbiopsien BCG-therapierter Patienten erbracht werden. In Abbildung 3.3.4 ist hierzu eine Isotyp-Kontrolle (I) neben einigen repräsentativen spezifischen Färbungen gezeigt (II - V). Zunächst ist beachtenswert, dass  $CD209^+$  dendritische Zellen (grün) vereinzelt (max. 10 Zellen / Gefrierschnitt) in den Blasenbiopsien nachgewiesen werden konnten. Anhand der deutlichen Signale für membranständiges  $CD209$  ist auch das ausgeprägte kommunikative Verhalten der DC zu erkennen. Die dendritischen Zellen stehen mit ihren namensgebenden langen Zellausläufern gleichzeitig in direktem Kontakt mit diversen Zellen. Ferner konnten jedoch auch deutliche immunzytochemische Signale für  $IFN\gamma^+$  nachgewiesen werden. Die Signale für  $IFN\gamma$  waren dabei weitestgehend auf die zytoplasmatischen Bereiche der  $CD209^+$  DC beschränkt.



**Abbildung 3.3.4: Nachweis von CD209<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> DC in Blasenbiopsien.** Konfokal-mikroskopische Aufnahmen von Gefrierschnitten aus Blasenbiopsien BCG-therapierter Tumorpatienten zum Nachweis von CD209<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> dendritischen Zellen. Die spezifischen Färbungen in den Spalten II bis V für CD209 bzw. IFN $\gamma$  sind in Grün (Alexa 488) bzw. in Rot (Alexa 546) neben der Isotyp-Kontrolle in Spalte I dargestellt. Die Zellkerne (TOTO-3) erscheinen in Blau. Die mikroskopischen Aufnahmen wurden mithilfe eines Leica TCS SP2-Mikroskops erstellt und mit Adobe<sup>®</sup> Photoshop weiterbearbeitet. Gezeigt sind repräsentative Aufnahmen aus fünf unabhängigen Gewebebiopsien.

Zusammenfassend konnte in diesem Abschnitt auf Einzelzellniveau bewiesen werden, dass *in vitro* generierte MoDC, nicht aber PFAPC, zur Produktion substantieller Mengen IFN $\gamma$  befähigt sind. Des Weiteren konnte zudem ein *in vivo*-Nachweis von CD209<sup>+</sup> IFN $\gamma$ <sup>+</sup> DC in Blasenbiopsien von BCG-therapierter Tumorpatienten erbracht werden.

## 4 Diskussion

Dendritische Zellen (DC) stellen ein entscheidendes Bindeglied zwischen angeborener Immunität und adaptiven Immunzellen dar. In dieser Funktion erkennen DC eingedrungene Pathogene und leiten die integrierten Signale zur Aktivierung an T-Zellen weiter. Nach heutigem Kenntnisstand bilden DC jedoch einen ausgesprochen heterogenen Zelltypus, wobei neben unterschiedlichen Differenzierungswegen aus myeloiden oder lymphoiden Vorläuferzellen zusätzlich eine außerordentliche funktionelle Plastizität dieser Zellen zu Tage tritt. Ein Beispiel hierfür ist die Fähigkeit von myeloiden DC, sowohl  $T_H1$ - bzw.  $T_H2$ -polarisierte T-Effektorzellen zu aktivieren, als auch die Differenzierung regulatorischer  $T_{REG}$  einzuleiten<sup>9;72;77;82</sup>. Nach neueren Erkenntnissen ist die funktionelle Plastizität von DC zwar einerseits durch ontogenetische Faktoren einzelner Subpopulationen vorherbestimmt, gleichzeitig nehmen jedoch der Differenzierungsstatus und der Grad der Ausreifung von DC sowie die Art der stimulierenden Signale bedeutenden Einfluss auf die Ausrichtung adaptiver Immunantworten.

### 4.1 Plättchenfaktor 4-differenzierte Antigen-präsentierende Zellen

Obwohl die Herkunft und die Differenzierungswege der einzelnen DC-Subpopulationen bisher nur ansatzweise aufgedeckt werden konnten<sup>69</sup>, ist dessen ungeachtet inzwischen allgemein anerkannt, dass die Differenzierung von DC maßgeblich durch Zytokinkombinationen während der Differenzierungsphase gesteuert werden kann<sup>28</sup>. In diesem Zusammenhang wurden in den vergangenen Jahren diverse *in vitro*-Differenzierungsprotokolle von DC beispielsweise aus monozytären Vorläufern etabliert. Weiterführende Studien konnten darauf aufbauend eine schnelle Differenzierung von DC aus Monozyten *ex vivo* und sogar *in vivo* unter pathologischen oder inflammatorischen Bedingungen beschreiben<sup>50-55</sup>.

Traumatische oder inflammatorische Ereignisse führen im Allgemeinen auch zur Aktivierung von Thrombozyten. Die Aktivierung dieser anukleären Zellen löst neben Blutgerinnungskaskaden nach neueren Erkenntnissen auch die Sekretion eines breiten Spektrums von inflammatorischen und immunmodulatorischen Mediatoren aus. Einen wesentlichen Bestandteil in diesem Spektrum sezernierter Mediatoren stellt Plättchenfaktor 4 dar. In der Literatur ist eine Vielzahl von Effekten dieses inflammatorischen CXC-Chemokins auf verschiedene Leukozytenpopulationen beschrieben. In einer Argumentationslinie mit diesen Daten wurde in vorangegangenen initialen Arbeiten unserer Laborgruppe eine PF-4-induzierte Differenzierung von Antigen-präsentierenden Zellen aus Monozyten in Kombination mit IL-4 nachgewiesen<sup>107</sup>. In der vorliegenden Arbeit sollten PF-4-differenzierte Antigen-präsentierende Zellen (PFAPC) im Vergleich zu konventionellen DC (MoDC) immunbiologisch im Detail weiterführend charakterisiert werden. Im Mittelpunkt der in diesem Abschnitt diskutierten Untersuchungen stand dabei die Frage, ob und wie PFAPC auf Pathogen-induzierte Aktivierung reagieren und welche Konsequenzen sich hieraus für nachfolgende, durch diese Zellen eingeleitete Immunantworten ergeben.

#### 4.1.1 PFAPC – dendritische Zelle, Makrophage oder Dendrophage?

PFAPC konnten durch Fricke *et al.*<sup>107</sup> anhand phänotypischer Merkmale deutlich von MoDC oder GM-CSF-generierten bzw. PF-4-generierten Makrophagen (GM-M $\Phi$  bzw. PF-M $\Phi$ ) unterschieden werden. PFAPC waren bei diesen Untersuchungen zwar durch Induktion des DC-assoziierten Oberflächenantigens CD209 sowie durch die Herabregulation des Monozyten/Makrophagenmarkers CD14 charakterisiert, gleichzeitig war jedoch MoDC-spezifisches CD1a nicht vorhanden und stattdessen der Makrophagenmarker Max-1 (Carboxypeptidase M) exprimiert. Eine eindeutige Zuordnung der PFAPC zu dendritischen Zellen oder zu Makrophagen war daher mithilfe dieser durchflusszytometrischen Analysen oder anhand zusätzlicher zellmorphologischer Merkmale (siehe Abbildung 3.1.1) nicht möglich. Denkbar wäre auch gewesen, dass PFAPC eine als Dendrophagen zu bezeichnende Mischform aus beiden Zelltypen darstellen. Um diesen Sachverhalt aufzuklären, wurden in Phagozytose-Assays (siehe Abbildung 3.1.2 a und b) und durch Messung der Freisetzungsrates reaktiver Sauerstoffmetabolite (siehe Abbildung 3.1.3) charakteristische Makrophageneigenschaften untersucht. Die Gegenüberstellung von PFAPC und MoDC im Vergleich zu den GM-M $\Phi$  bzw. PF-M $\Phi$  zeigte jedoch, dass PFAPC zusammen mit MoDC funktionell von Makrophagen zu unterscheiden sind, da weder PFAPC noch MoDC zur Produktion reaktiver Sauerstoffmetabolite befähigt waren. Somit konnte auf funktioneller Basis der Beweis dafür erbracht werden, dass PFAPC keine spezialisierte Subpopulation von Makrophagen darstellen und ferner auch keinen funktionellen Mischtyp aus DC und Makrophagen bilden. Im Rahmen der Phagozytose-Assays wurde festgestellt, dass alle untersuchten Zelltypen eine ausgeprägte Phagozytoseaktivität aufwiesen. Dessen ungeachtet wurde in diesen Phagozytose-Assays jedoch ein interessanter Unterschied zwischen PFAPC und MoDC aufgezeigt. Wie erwartet zeigten zwar vollständig ausdifferenzierte MoDC nach Aktivierung mit LPS eine verminderte rezeptorunabhängige Phagozytoseaktivität<sup>12</sup>. Überraschenderweise war aber diese Aktivität in PFAPC nach LPS-Aktivierung im Vergleich zu den unstimulierten Zellen konstant oder leicht erhöht. Diese Steigerung der Phagozytoserate nach Aktivierung von PFAPC ist für DC ungewöhnlich.

#### 4.1.2 Konstitutiver Aktivierungsstatus von PFAPC

Anhand der bereits erwähnten initialen phänotypischen Charakterisierung von PFAPC wurde ein weiteres sehr bedeutendes Merkmal dieser Antigen-präsentierenden Zellen aufgedeckt. PFAPC wurden in diesen vergleichenden Studien genau wie MoDC standardmäßig während eines sieben Tage dauernden Zeitraumes differenziert. Bei diesen Untersuchungen wurde allerdings zusätzlich zum späten Zeitpunkt der Differenzierung (Tag 7) auch ein kurzer Zeitpunkt (Tag 3) mit einbezogen. Dieser kurze Differenzierungszeitpunkt wurde in Anlehnung an verschiedene Studien aus neuerer Zeit gewählt, in denen eine schnelle, nur wenige Tage dauernde Differenzierung von DC aus monozytären Vorläufern unter unterschiedlichen inflammatorischen Bedingungen aufgezeigt werden konnte<sup>50-58</sup>. Es stellte sich bei den Untersuchungen in unserer Laborgruppe heraus, dass PFAPC an Tag 3 der Differenzierung tatsächlich phänotypisch bereits zu Antigen-präsentierenden Zellen differenziert waren (CD14<sup>-</sup> CD209<sup>+</sup> MHC II<sup>+++</sup>). Darüber hinaus exprimierten diese Zellen zu diesem frühen Zeitpunkt konstitutiv und transient den üblicherweise ausschließlich auf aktivierten DC nachweisbaren Oberflächenmarker CD83 sowie deutliche Mengen des T-Zell-kostimulieren-

den Moleküls CD86. Aufgrund dieser phänotypischen Voraktivierung wurde mithilfe verschiedener cDNA Microarray-Transkriptionsanalysen versucht, den Aktivierungsstatus der unter inflammatorischen Bedingungen differenzierten PFAPC im Vergleich zu MoDC umfassend zu charakterisieren. In der Tat konnte durch Analyse der Regulation von Genen der Signaltransduktions-Stoffwechselwege (siehe Abbildung 3.1.4.1) sowie anhand der Induktion eines spezifischen Profils inflammatorischer Zytokine gezeigt werden, dass PFAPC an Tag 3 der Differenzierung auf molekularer Ebene ein spezifisches Ausreifungsprogramm aktiviert hatten. Dieser Sachverhalt wurde dadurch verdeutlicht, dass eine Vielzahl von bei Signaltransduktionen involvierten Genen in PFAPC massiv induziert waren, wobei die exprimierten Gene zum erheblichen Teil in den Überleben-Stoffwechselweg (siehe hierzu Tabelle A.2 im Anhang) und den Retinolsäure-Stoffwechselweg gruppiert werden konnten. Interessanterweise waren jedoch gleichzeitig keinerlei Gene des proinflammatorischen NF $\kappa$ B-Stoffwechselweges angeschaltet. Die Induktion verschiedener Gene des Überleben-Stoffwechselweges liefert eine molekulare Erklärung für die bereits von Scheuerer *et al.*<sup>97</sup> beschriebenen anti-apoptotischen Effekte von PF-4 auf Monozyten. Hingegen war die nachhaltige Aktivierung des Retinolsäure-Stoffwechselweges eher überraschend. Im Allgemeinen sind Retinolsäuren bekannt als eine pleiotrope Mediatorenklasse, die regulierend bei homöostatischen oder entwicklungsbiologischen Prozessen beteiligt ist<sup>133</sup>. PFAPC induzierten verschiedene Gene dieser Genfamilie, wobei die Retinol-bindenden Proteine (RBP) 1 und 2 am deutlichsten induziert waren. Die Funktion von RBP in myeloiden Zellen ist bisher nur ungenügend aufgeklärt, dennoch konnte durch Kreuz *et al.*<sup>134</sup> eine differenzielle Regulation von RBP 2-mRNA in MoDC gegenüber Makrophagen beobachtet werden. Aus Monozyten generierte Makrophagen wiesen in dieser Studie im Verlauf des Differenzierungsprozesses eine deutliche und dabei adhärenzabhängige Induktion von RBP 2 auf, während im Gegensatz dazu Monozyten-generierte MoDC nur äußerst geringe Mengen der mRNA von RBP 2 induzierten. In einer weiteren Studie wurde berichtet, dass Retinolsäuren unter inflammatorischen Bedingungen die Expression von MHC II-Komplexen sowie von T-Zell-kostimulierenden Molekülen erhöhen und dadurch auch in funktioneller Konsequenz das lymphostimulatorische Potenzial von DC steigern<sup>135</sup>. Es ist durchaus vorstellbar, dass diese Retinolsäure-vermittelten Effekte zur konstitutiven Aktivierung sowie zum bereits früher aufgedeckten hohen lymphostimulatorischen Potenzial der PFAPC an Tag 3 der Differenzierung beitragen<sup>107</sup>. Vor kurzer Zeit konnte außerdem von Yoneyama *et al.*<sup>136</sup> der Nachweis erbracht werden, dass das Retinolsäure-induzierbare Gen 1 für eine RNA-Helikase kodiert, die mit zytoplasmatisch vorliegender doppelsträngiger RNA interagiert und durch Homodimerisierung über NF $\kappa$ B-abhängige Stoffwechselwege aktivierende Signale in den Zellkern weiterleitet. Die Aktivierung von APC durch doppelsträngige RNA war nach bisheriger Lehrmeinung ausschließlich durch Ligation mit *toll-like*-Rezeptor (TLR) 3 möglich.

Anhand der oben dargestellten Ergebnisse der cDNA Microarray-Analysen kann hypothetisiert werden, dass PFAPC und MoDC unter Verknüpfung durchaus divergenter zellbiologischer Entwicklungsmechanismen aus Monozyten differenzieren. In einem nächsten Schritt sollte deshalb untersucht werden, inwiefern die unterschiedlichen Differenzierungsmerkmale von PFAPC und MoDC auch zu immunbiologischen Unterschieden zwischen diesen Zellen führen. Tatsächlich konnte im weiteren Verlauf der hier gezeigten immunbiologischen Beschreibung von PFAPC

diese Hypothese betätigt werden, da PFAPC als eine konstitutiv aktivierte Subpopulation professionell Antigen-präsentierender Zellen charakterisiert werden konnte, die überwiegend und in großen Mengen  $T_H2$ -assoziierte inflammatorische Chemokine sezerniert und präferenziell T-Zellantworten in Richtung  $T_H2$  polarisiert.

Erste Anzeichen dafür, dass PFAPC eine effiziente „Chemokin-Fabrik“ mit Präferenz für  $T_H2$ -orientierte Immunantworten darstellen, wurden erneut mithilfe von cDNA Microarray-Analysen verdeutlicht (siehe Abbildung 3.1.4.2). Diese mRNA-Analysen der Transkriptionsprofile von drei Tage differenzierten PFAPC konnten anschließend durch umfangreiche ELISA-Messungen (siehe Abbildung 3.1.4.3) bestätigt werden. PFAPC produzierten konstitutiv und ohne weitere mikrobielle Aktivierung ein spezifisches Spektrum an inflammatorischen Chemokinen. Einige dieser Chemokine, wie MCP-1, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$  oder RANTES, wurden zugleich nicht oder nur in sehr geringen Mengen von unstimulierten MoDC produziert. Gleichzeitig wurden jedoch typische und üblicherweise nur von mikrobiell aktivierten APC produzierte, proinflammatorische Zytokine wie IL-1 $\beta$ , IL-6 oder TNF $\alpha$  erwartungsgemäß weder von unstimulierten PFAPC noch von MoDC sezerniert. Besonders auffällig war allerdings, dass PFAPC konstitutiv außerordentliche Mengen MDC sezernierten (in einigen Experimenten bereits ohne Stimulation mehr als 500 ng/ml). Dieses inflammatorische CC-Chemokin wird in der Literatur in einen eindeutigen Zusammenhang mit der Verschiebung von T-Zellantworten in Richtung  $T_H2$  gebracht<sup>137</sup>. Nach heutigem Kenntnisstand wird angenommen, dass DC die Hauptquelle von MDC sowohl *in vitro* als auch *in vivo* darstellen<sup>138</sup>, wobei die Produktion von MDC innerhalb eines komplexen Rückkopplungsmechanismus straff durch klassische  $T_H2$ -Zytokine wie IL-4 oder IL-5 positiv reguliert wird<sup>139</sup>. Zudem rekrutiert MDC als Agonist von CCR4 selektiv CCR4<sup>+</sup>  $T_H2$ -differenzierte T-Gedächtniszellen<sup>140;141</sup>. Demgegenüber konnte demonstriert werden, dass IFN $\gamma$  und IL-12 als typische  $T_H1$ -polarisierende Zytokine sowie bereits  $T_H1$ -polarisierte CD4<sup>+</sup> Dipeptidylpeptidase IV<sup>+</sup> (CD26) T-Helferzellen durch Inhibition der Produktion bzw. durch enzymatische Inaktivierung von MDC einen negativen Rückkopplungsmechanismus bilden<sup>142-144</sup>. Außerdem wurde gezeigt, dass in Patienten mit typischerweise  $T_H2$ -lastigen chronischen Erkrankungen wie der atopischen Dermatitis erhöhte Mengen an MDC im Serum nachweisbar sind<sup>145</sup>. Überdies ist MDC nach neueren Erkenntnissen ebenfalls bei verschiedenen allergisch bedingten Immunreaktionen involviert<sup>146</sup>. Ein weiteres Indiz für eine mögliche Förderung von  $T_H2$ -orientierten Immunantworten durch PFAPC stellte die konstitutive Sekretion von MCP-1 durch diese Zellen dar. Auch diese Chemokinrezeptorachse (CCL2/CCR2) wird durch verschiedene Studien in direkten Zusammenhang mit  $T_H2$ -assoziierten T-Zellantworten gebracht<sup>3;147-149</sup>.

Interessanterweise war in unstimulierten PFAPC CCR7 als der spezifische Rezeptor für ELC/SLC konstitutiv exprimiert (siehe Abbildung 3.1.4.2). Üblicherweise ist dieser Rezeptor nur auf vollständig ausgereiften DC nachweisbar, da diese Chemokinrezeptorachse die Wanderung von antigenbeladenen DC aus entzündeten Geweben heraus über afferente Lymphgefäße in Richtung sekundäre Lymphorgane dirigiert<sup>150</sup>. Aufgrund der Expression dieses Rezeptors in Kombination mit kostimulierenden Molekülen wie CD86 wären PFAPC folglich bereits ohne weitere inflammatorische Ausreifungssignale in der Lage, in T-Zell-reiche Areale der sekundären

Lymphorgane einzuwandern und antigenspezifische T-Zellen präferenziell T<sub>H</sub>2-orientiert zu aktivieren.

#### 4.1.3 Inflammatorisches Potenzial von aktivierten PFAPC

Nachdem die konstitutive Produktion eines spezifischen Chemokinprofils in PFAPC nachgewiesen werden konnte, sollte in einer weiterführenden Versuchsreihe das inflammatorische Potenzial dieser Zellen untersucht werden. Die Fähigkeit von PFAPC, nach Pathogen-induzierter Aktivierung durch Produktion inflammatorischer Mediatoren eine Entzündungsreaktion zu initiieren bzw. aufrechtzuerhalten, wird in diesem Zusammenhang als inflammatorisches Potenzial bezeichnet. Da die Fähigkeit dendritischer Zellen zur Erkennung mikrobieller Struktur motive ganz entscheidend von der Expression der erst seit wenigen Jahren bekannten *toll-like*-Rezeptoren (TLR) abhängt, wurde zunächst das in Tag 5 differenzierten PFAPC bzw. MoDC exprimierte Repertoire von TLR untersucht. Dieser mittlere Differenzierungszeitpunkt an Tag 5 wurde als zeitlicher Kompromiss aus frühem und spätem Zeitpunkt gewählt. Es stellte sich heraus, dass PFAPC und MoDC ein identisches, typisch myeloides Repertoire an nachweisbaren TLR exprimierten und auch die Regulation dieser Moleküle nach Aktivierung mit BCG-Mykobakterien in beiden Zelltypen vergleichbar war (siehe Abbildung 3.1.5.1.). Interessanterweise wurde nach Aktivierung der bei der Erkennung von BCG maßgebliche Rezeptor TLR2 in beiden Zelltypen transient induziert, während die Expression nicht involvierter Rezeptoren wie beispielsweise TLR5 drastisch herabreguliert wurde. Die Liganden-spezifische Heraufregulation von TLR2 nach Aktivierung läßt die Vermutung zu, dass die Erkennung von BCG kurzzeitig zu einer Steigerung der Sensitivität von aktivierten DC gegenüber weiteren BCG führt und diese Zellen somit einer Spezialisierung zur Erkennung von BCG unterliegen. Gleichzeitig verliert TLR5 dagegen als ein bei der Erkennung von BCG nicht beteiligter Rezeptor unmittelbar an Bedeutung. Die nachfolgende Herabregulation aller TLR erscheint ebenfalls durchaus sinnvoll, da DC zu späteren Zeitpunkten nach Aktivierung primär nicht mehr Erkennungsfunktionen wahrnehmen, sondern Antigen-präsentierende und T-Zell-aktivierende Aufgaben übernehmen.

Im Anschluss an die TLR-Expressionsanalysen wurde das inflammatorische Potenzial von PFAPC und MoDC nach Aktivierung durch Verwendung eines breiten Spektrums definierter TLR-Liganden getestet. Es wurde hierbei die Sekretion von TNF $\alpha$  als Parameter gewählt, da dieses typisch proinflammatorische Zytokin üblicherweise von mikrobiell aktivierten DC in substanziellen Mengen sezerniert wird. Anhand der in Abbildung 3.1.5.2. dargestellten Ergebnisse konnte gezeigt werden, dass BCG, Zymosan, LPS sowie R-848 zwar die potentesten TNF $\alpha$ -Induktoren sowohl in PFAPC als auch in MoDC waren, dass PFAPC jedoch gleichzeitig, mit Ausnahme von R-848, mit verhältnismäßig schwacher Induktion von TNF $\alpha$  auf TLR-Ligation reagierten. Da sich BCG als der potenteste Induktor von TNF $\alpha$  in beiden Zelltypen herausstellte, wurde dieser Stimulus für die weiterführenden Untersuchungen verwendet.

In einem nachfolgenden Satz von Experimenten sollte geklärt werden, ob PFAPC aufgrund einer generell verminderten Aktivierbarkeit durch mikrobielle Alarmsignale ein grundsätzlich abgeschwächtes inflammatorisches Potenzial aufweisen, sozusagen als eine rein quantitative Verschiebung der Fähigkeit, Entzündungsreaktionen auszulösen. Alternativ bestand die Möglichkeit,

dass das inflammatorische Potenzial von PFAPC nach Aktivierung anhand qualitativer Unterschiede von MoDC unterschieden werden kann. Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden erneut verschiedene cDNA Microarray-Analysen und umfangreiche ELISA-Messungen durchgeführt. Es konnte im Rahmen dieser Experimente gezeigt werden, dass in BCG-aktivierten PFAPC diverse Gene des inflammatorischen NF $\kappa$ B-Signalweges deutlich schwächer als in MoDC induziert waren (siehe Abbildung 3.1.5.3 a und b). Ungeachtet einer verminderten Induktion von Genen des NF $\kappa$ B-Stoffwechselweges sowie einer schwachen Phosphorylierung der eigentlichen Signaltransduktionsproteine (siehe Abbildung 3.1.5.3 c) konnte jedoch mithilfe der Abbildungen 3.1.5.4 und 3.1.5.5 gezeigt werden, dass PFAPC trotzdem durchaus aktivierbar waren. Zwar wurden von stimulierten PFAPC und dabei im Gegensatz zu MoDC, wie aufgrund der Signalweiterleitungsexperimente vermutet, die typisch proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF $\alpha$  sowie MIP-1 $\alpha$  und MIP-1 $\beta$  nur in geringen Mengen sezerniert. Außerdem produzierten diese Zellen nur wenig T<sub>H</sub>1-polarisierende Zytokine wie IL-12p70<sup>151</sup>, IP-10<sup>152</sup> und insbesondere wenig IFN $\gamma$  (siehe Abschnitt 4.3). Mithilfe dieser Experimente konnte jedoch gleichzeitig die initiale Vermutung bestätigt werden, dass PFAPC ein spezifisches, eher T<sub>H</sub>2-orientiertes Profil an inflammatorischen Chemokinen induzierten. Denn nach Aktivierung wurden erneut enorme Mengen von T<sub>H</sub>2-assoziiertem MDC (bis in den  $\mu$ g-Bereich) und MCP-1 zusammen mit T-Zell-anlockendem RANTES festgestellt. Mittels dieser Daten konnte gezeigt werden, dass PFAPC kein prinzipiell vermindertes inflammatorisches Potenzial besitzen, sondern dass diese Zellen generell nach Aktivierung (siehe Abbildung 3.1.5.6) eine hochspezifische qualitative Verschiebung des vorliegenden inflammatorischen Zytokinprofils in Richtung T<sub>H</sub>2 verursachen.

#### 4.1.4 Lymphostimulatorische Kapazität von PFAPC

Die antigenabhängige Induktion der Proliferation CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> naiver T-Zellen ist eine wichtige immunbiologische Besonderheit dendritischer Zellen<sup>12</sup>. Aus diesem Grund werden DC als professionell Antigen-präsentierende Zellen (APC) funktionell den Monozyten oder auch Makrophagen als nicht-professionelle APC gegenübergestellt. Daraus ergab sich in Anknüpfung an die unter 4.1.1 diskutierte funktionelle Unterscheidung der PFAPC und MoDC von Makrophagen in logischer Konsequenz die entscheidende Fragestellung, ob PFAPC bei Interaktion mit CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> naiven T-Zellen funktionell tatsächlich als professionelle APC in Erscheinung treten und in eine Reihe mit DC gestellt werden können. Bereits im Verlauf der initialen Experimente durch Fricke *et al.*<sup>107</sup> wurde gezeigt, dass Tag 3 differenzierte PFAPC hochpotente Induktoren sowohl antigenabhängiger als auch antigenunabhängiger Proliferation von nicht-aufgereinigten Gesamtymphozyten (CD3<sup>+</sup>, CD19<sup>+</sup>, CD56<sup>+</sup>) waren. In dieser Arbeit konnte nun zweifelsfrei auf funktioneller Ebene zusätzlich der Nachweis erbracht werden, dass PFAPC tatsächlich als professionelle, DC-vergleichbare APC angesehen werden müssen. Denn in Abbildung 3.1.6.1 ist gezeigt, dass nur MoDC und PFAPC, nicht aber Monozyten oder Makrophagen, substantielle antigenabhängige Proliferation CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> naiver T-Zellen induzierten.

Überdies wurde in verschiedenen Arbeiten bereits beschrieben, dass T-Zell-vermittelte Immunantworten von T<sub>H</sub>1 über T<sub>H</sub>2 bis hin zur Polarisierung naiver T-Zellen zu regulatorischen T-Effektorzellen maßgeblich von DC instruiert werden<sup>11;153</sup>. In diesen Studien stellte sich heraus,

dass die Orientierung der jeweils initiierten T-Zellantworten einerseits entscheidend von den DC-aktivierenden Signalen abhängt, andererseits aber auch der Aktivierungsstatus der beteiligten DC Einfluss auf die Polarisierung der T-Zellantwort nehmen kann<sup>144;154-158</sup>. Daher war die Einbeziehung umfassender Analysen zur Induktion T-Zell-assoziiierter Zytokine nach Interaktion mit PFAPC bzw. MoDC von großer Bedeutung für die Beurteilung des immunbiologischen Potenzials von PFAPC. Zu diesem Zweck wurden in dieser Arbeit verschiedene *in vitro*-Interaktionsexperimente zwischen verschiedenen T-Zellsubpopulationen und PFAPC bzw. MoDC durchgeführt und die Zellkulturüberstände mithilfe von T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-Multi-Zytokin ELISA charakterisiert. Zum einen wurden zur Reaktivierung von stark T<sub>H</sub>1-vorpolarisierten T-Gedächtniszellen PPD-beladene PFAPC bzw. MoDC in autologen Antigenpräsentations-Assays eingesetzt (siehe Abbildung 3.1.6.2). Des Weiteren wurden präferenziell T<sub>H</sub>2-induzierende Stimuli wie Zymosan (siehe Abbildung 3.1.6.3) oder Cholera-Toxin (Daten nicht gezeigt) zur Ausreifung autologer PFAPC bzw. MoDC verwendet, um anschließend das resultierende Zytokinprofil aktivierter vormals CD4<sup>+</sup> CD45RA<sup>+</sup> naiver T-Zellen zu untersuchen. Abschließend wurden in heterologen gemischten Leukozytenreaktionen (MLR) naive T-Zellen antigenunabhängig aktiviert und das entstandene Zytokinprofil gemessen (hierzu siehe Abbildung 3.1.6.4). In allen experimentellen Versuchsreihen konnte konsistent eine reduzierte Sezernierung von IFN $\gamma$  zusammen mit TNF $\alpha$  in PFAPC/T-Zell-Kokulturen im Vergleich zu den MoDC-aktivierten T-Zellen nachgewiesen werden. Eine tatsächliche Verschiebung der induzierten Zytokinprofile in den PFAPC-Kokulturen in Richtung T<sub>H</sub>2 konnte dadurch aufgezeigt werden, dass gleichzeitig die Produktion von T<sub>H</sub>2-polarisierenden Zytokinen wie IL-5 und IL-13 zumindest konstant, wenn nicht sogar überwiegend gesteigert wurde. IL-4 als ein weiteres typisches T<sub>H</sub>2-polarisierendes Zytokin konnte in diesen Experimenten nicht substantiell induziert werden und die Produktion von immunregulatorischem IL-10 blieb weitestgehend unbeeinflusst. Interessanterweise konnte gleichzeitig bei allen Interaktionsexperimenten, wie anhand der unter 4.1.2 und 4.1.3 diskutierten Datenlage erwartet, eine massive Induktion des T<sub>H</sub>2-assoziierten MDC in den PFAPC-Kokulturen festgestellt werden. Ob diese Sekretion großer Mengen MDC durch PFAPC in der Tat für die Polarisierung der in diesen Experimenten eingesetzten naiven T-Zellen in Richtung T<sub>H</sub>2 verantwortlich ist, ließe sich in zukünftigen Arbeiten beispielsweise durch Verwendung spezifischer MDC-inhibierender Antikörper nachweisen. Sollte die präferenzielle Induktion von T<sub>H</sub>2-Zellen bei Anwesenheit des inhibitorischen Antikörpers verringert werden, wäre dies ein Nachweis für T-Zell-polarisierende Eigenschaften von MDC.

Zusammengenommen legen die präsentierten Daten die Schlussfolgerung nahe, dass das aus aktivierten Thrombozyten freigesetzte PF-4 aus monozytären Vorläufern in einem inflammatorischen Milieu durch Induktion eines spezifischen Differenzierungsprogramms sehr schnell einen spezialisierten Subtypus von APC differenzieren kann. Anhand der gezeigten Ergebnisse kann zudem eine neue, bisher nicht bekannte Funktion für Plättchenfaktor 4 als ein immunmodulatorisches, T<sub>H</sub>2-assoziiertes Chemokin bei der Interaktion von PFAPC mit T-Zellen definiert werden. Diese Zellen sind dabei durch eine massive Induktion T<sub>H</sub>2-assoziiierter inflammatorischer Chemokine charakterisiert, welche die Polarisierung verschiedener T-Zellpopulationen in Richtung T<sub>H</sub>2 unterstützen.

Die Schlussfolgerung, dass PFAPC als hochpotente Lymphostimulatoren eine Verschiebung des Zytokinmilieus von  $T_H1$  in Richtung  $T_H2$  verursachen, konnte durch ein weiteres Interaktionsexperiment mit Zellen der angeborenen Immunität untermauert werden. In Abbildung 3.1.7 konnte gezeigt werden, dass gravierende Unterschiede zwischen PFAPC und MoDC bei der Aktivierung von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) bestehen. Zwar waren beide APC-Subtypen zur massiven Induktion von *in vitro*-Zytotoxizität von NK-Zellen gegen Tumorzellen in der Lage, jedoch konnten bei Interaktion von PFAPC mit NK-Zellen, im drastischen Gegensatz zu den MoDC-Kokulturen, keine substanziellen Mengen des charakteristischen  $T_H1$ -polarisierenden NK-Zytokins  $IFN\gamma$  nachgewiesen werden. Es sollte Erwähnung finden, dass NK-Zellen phänotypisch und funktionell als heterogene Population vorliegen. So ist für das humane System bekannt, dass  $CD56^{+/-}$  (engl.: *CD56 dim*) NK-Zellen, die in etwa 90% der gesamten NK-Population ausmachen, sehr hohe Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen aufweisen. Die verbliebenen 10% NK-Zellen sind als  $CD56^{++}$  (engl.: *CD56 bright*) vornehmlich zur Produktion von  $IFN\gamma$  befähigt<sup>159</sup>. Es erscheint durchaus plausibel, dass PFAPC in den hier gezeigten *in vitro*-Studien zwar  $CD56^{+/-}$  NK-Zellen aktivierten, im Gegensatz dazu jedoch nicht die Sekretion von  $IFN\gamma$  in  $CD56^{++}$  NK-Zellen anregen konnten. Ein möglicher Mechanismus für die geringe Induktion von NK- $IFN\gamma$  in den PFAPC-Kokulturen ist die sehr schwache Produktion von IL-12p70 durch PFAPC, da dieses Zytokin  $CD56^{++}$  NK-Zellen zur Sekretion von  $IFN\gamma$  anregt<sup>159,160</sup>. NK-generiertes  $IFN\gamma$  ist in vielerlei Hinsicht bei der Polarisierung von  $T_H1$ -Antworten insbesondere zu frühen Zeitpunkten einer Infektion von Bedeutung<sup>161</sup>. So werden NK-Zellen zum einen bereits sehr früh während einer Infektion zur Sekretion von  $IFN\gamma$  angeregt und können so in dem jeweiligen Mikromilieu mittels positiver Rückkopplung die Induktion von IL-12p70 in DC induzieren<sup>162-164</sup>. Es konnte außerdem vor kurzem gezeigt werden, dass aktivierte NK-Zellen CXCR3-abhängig in sekundäre Lymphknoten rekrutiert werden und auch auf diesem Wege durch Sekretion von  $IFN\gamma$   $T_H1$ -polarisierend auf naive T-Zellen wirken können<sup>165</sup>.

## 4.2 Modulation der Immunbiologie dendritischer Zellen durch PF-4

In Erweiterung an die in 3.1 dargestellten und unter 4.1 diskutierten Langzeiteffekte von PF-4 in Bezug auf die Differenzierung von Antigen-präsentierenden Zellen aus Monozyten und deren immunstimulatorischen Kapazitäten wurden in diesem Teilprojekt schwerpunktmäßig modulierende Kurzzeiteffekte von PF-4 auf terminal differenzierte dendritische Zellen des peripheren Blutes (BDC) unter inflammatorischen Bedingungen untersucht. Hierbei sollte bei Simulation einer vaskulären Interaktion von aktivierten Thrombozyten mit BDC die Fähigkeit von Thrombozyten, mittels Sekretion von PF-4 auf die Immunbiologie von BDC an sich sowie auf die Qualität nachfolgender T-Zellantworten Einfluss zu nehmen, analysiert werden. Als APC-Subpopulation wurden *ex vivo* isolierte, myeloide  $CD1c^+$  BDC gewählt, da diese Zellen des peripheren Blutes in der Vaskulatur während einer Inflammation direkt mit PF-4 in Kontakt treten können. Des Weiteren sind diese Zellen einerseits den gut charakterisierten konventionellen MoDC funktionell ähnlich und andererseits durch Verwendung des BDCA-1 DC Isolation Kit (Miltenyi Biotec) in reproduzierbarer Reinheit verfügbar (siehe Abbildung 3.2.1). Tatsächlich wurde mithilfe der in dieser Arbeit vorgestellten Daten die Hypothese bestätigt, dass PF-4 nicht nur die Differenzierung speziali-

sierter professioneller APC aus Monozyten auslösen kann, sondern auch ein modulierendes Potenzial in Bezug auf die Immunbiologie terminal differenzierter BDC ausübt. Die alleinige Stimulation durch PF-4 bewirkte die massive Induktion eines inflammatorischen Zytokinprofils sowie eine phänotypische Ausreifung der BDC. In Kombination mit TLR-abhängigen, mikrobiellen Aktivierungssignalen fungierte PF-4 zusätzlich als ein Verstärker des inflammatorischen Potenzials dieser Zellen. Konsequenterweise resultierte das durch PF-4 gesteigerte inflammatorische Potenzial der BDC in einer verstärkten Aktivierung von T-Zellen.

#### 4.2.1 Aktivierbarkeit und inflammatorisches Potenzial CD1c<sup>+</sup> BDC

CD1c<sup>+</sup> BDC wurden erstmals von Dzionek *et al.* beschrieben<sup>31</sup> und sind seit dieser Zeit nur unzureichend phänotypisiert worden<sup>36;119-121</sup>. Die in Abbildung 3.2.2.1 dargestellte umfangreiche phänotypische Charakterisierung von CD1c<sup>+</sup> BDC zeigte, dass diese Zellen zwar negativ für die typischen MoDC-Marker CD1a und CD209 waren, andererseits jedoch große Mengen MHC I und II sowie kostimulierende Moleküle wie CD40 und CD86 exprimierten. Die indifferente Expression des typischen Monozyten/Makrophagen-Markers CD14 kann als Indiz einer kontinuierlich ablaufenden *in vivo*-Transition von Monozyten in terminal differenzierte CD1c<sup>+</sup> BDC gedeutet werden. Diese Hypothese steht im Einklang mit bereits beobachteten Transitionen von Monozyten zu DC unter inflammatorischen oder pathologischen Bedingungen, die auch in dieser Arbeit beobachtet wurden. Zugleich exprimierten die CD1c<sup>+</sup> BDC ein breites Spektrum verschiedener Chemokinrezeptoren, wobei insbesondere der Nachweis von CXCR3b-mRNA für dieses Projekt entscheidend war (siehe Abbildung 3.2.2.2), da PF-4 kürzlich als funktionaler Agonist für diese Spleißvariante von CXCR3 beschrieben wurde<sup>122</sup>. Die Expression dieser Rezeptorvariante ließ die Vermutung zu, dass PF-4 einen direkten modulierenden Einfluss auf BDC nehmen kann.

Bereits durch Scheuerer *et al.*<sup>97</sup> konnte ein verlängertes Überleben *ex vivo* isolierter und *in vitro* kultivierter Monozyten durch PF-4 nachgewiesen werden und auch in der vorliegenden Studie wurde eine signifikante Verlängerung der *in vitro*-Überlebensdauer von BDC durch PF-4 beobachtet. PF-4 konnte hierbei durchaus vergleichbar zu dem hochpotenten Wachstumsfaktor GM-CSF<sup>26</sup> (siehe Abbildung 3.2.3) das Überleben von BDC verlängern. In Ergänzung zu den in dieser Arbeit und durch Scheuerer *et al.*<sup>97</sup> beobachteten Effekten von PF-4 auf die Differenzierung von Monozyten zu PFAPC oder zu PF-M $\Phi$  induzierte die Inkubation von CD1c<sup>+</sup> BDC mit PF-4 eine nachhaltige Aktivierung dieser Zellen auf Genexpressions- wie auch auf Proteinebene. Die alleinige Stimulation durch PF-4 induzierte ohne weitere mikrobielle Aktivierung ein breites Profil inflammatorischer Zytokine (hierzu siehe Abbildung 3.2.4.1 und Tabelle 3.2.4.3). Zu diesen Entzündungsmediatoren zählten unter anderem TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, RANTES und wieder MDC und MCP-1. Beachtenswert ist, dass das durch PF-4 in BDC induzierte Zytokinprofil aufgrund der zusätzlichen Induktion der typisch proinflammatorischen Zytokine IL-1 $\beta$  und TNF $\alpha$  eine wesentliche Erweiterung des konstitutiven Zytokinprofils der PFAPC darstellte. Jedoch konnte, ähnlich dem bereits gezeigten Differenzierungsprozess von PFAPC, auch bei BDC eine PF-4-induzierte Heraufregulation der wichtigen DC-spezifischen Aktivierungsmarker CD83, CD86 und auch der Antigen-präsentierenden MHC II-Komplexe beobachtet werden. Die deutliche PF-4-vermittelte Induktion von MHC II auf BDC muss insbesondere im Zusammenhang mit den durch Scheuerer

*et al.*<sup>97</sup> generierten Daten diskutiert werden. In jener Publikation wurde dargelegt, dass die Differenzierung von Monozyten zu PF-M $\Phi$  in einer kompletten Herabregulation von Antigen-präsentierenden HLA-DR resultierte. Durch Fricke *et al.*<sup>107</sup> konnte jedoch gezeigt werden, dass die Applikation von PF-4 in Kombination mit IL-4 eine Induktion dieser Oberflächenantigene während der Differenzierung von Monozyten zu professionellen APC bewirkte. Eine hypothetische Erklärung für diese anscheinend gegenteiligen Effekte wäre, dass die Freisetzung von PF-4 bei Gewebeverletzungen o.ä. einerseits die Differenzierung von Monozyten zu spezialisierten Makrophagen auslöst. So sind PF-M $\Phi$  durch eine hohe phagozytische Aktivität und eine hohe Produktionsrate reaktiver Sauerstoffmetabolite gekennzeichnet<sup>98</sup>, was den Abtransport nekrotischen Zellmaterials erleichtern und wesentlich zur Beseitigung von Pathogenen beitragen könnte. Zudem ist denkbar, dass PF-M $\Phi$  gleichzeitig aufgrund fehlender MHC II-Komplexe nicht substanzial als Antigen-präsentierende Zellen durch Interaktion mit CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen in adaptive Immunprozesse eingreifen. Andererseits induziert PF-4 in einem anderen Mikromilieu – in Anwesenheit von IL-4 – hochpotente, präferenziell T<sub>H</sub>2-assoziierte Lymphostimulatoren, die zwar ebenfalls eine hohe phagozytische Aktivität aufweisen, aber dennoch, nicht zuletzt wegen der Expression von CCR7, voll funktionsfähige und spezialisierte APC darstellen. Demgegenüber wurden die T-Zell-aktivierenden Fähigkeiten von terminal differenzierten BDC durch Induktion von CD83, CD86 und MHC II verstärkt. Somit ist zu vermuten, dass PF-4 die verschiedenen Subpopulationen Antigen-präsentierender Zellen, je nach Differenzierungsstatus dieser Zellen und dem vorhandenen Zytokinmilieu, unterschiedlich modulierend beeinflusst. Diese Argumentationslinie konnte dahingehend unterstützt werden, dass das inflammatorische Potenzial von PF-4-aktivierten BDC in Kombination mit TLR-Ligation (Abbildungen 3.2.4.2; 3.2.4.4 und Tabelle 3.2.4.3) generell gesteigert wurde. In diesen Experimenten war jedoch keine signifikante PF-4-induzierte Verschiebung des Zytokinprofils in Richtung T<sub>H</sub>2 zu erkennen. Die Aktivierung durch LPS + IFN $\gamma$  löste zunächst ein typisch inflammatorisches Zytokinprofil in BDC aus. Hierzu gehörte die Induktion von IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-12p70, RANTES und TNF $\alpha$  sowie erwartungsgemäß die Heraufregulation von CD83, CD86 und MHC II. In Kombination von LPS + IFN $\gamma$  mit PF-4 zeichnete sich eine generelle Verstärkung des inflammatorischen Potenzials von CD1c<sup>+</sup> BDC ab. Am deutlichsten wurde dies durch massive Induktion von proinflammatorischem TNF $\alpha$  sowie anhand einer gesteigerten phänotypischen Aktivierung. Interessanterweise wurde IL-12p70 dabei jedoch auf sehr niedrigem Niveau durch PF-4 inhibiert.

Demzufolge lassen die bis hierher diskutierten Daten die Schlussfolgerung zu, dass die alleinige Stimulation mit Plättchenfaktor 4 und insbesondere in Kombination mit TLR-aktivierenden Signalen das inflammatorische Potenzial von BDC verstärkt. Jedoch lässt eine generelle Verstärkung typischer DC-Funktionen durch PF-4 weiterführend vermuten, dass dieses inflammatorische Chemokin indirekt auch auf die Initiierung von T-Zellantworten Einfluss haben könnte. Tatsächlich wurde in verschiedenen Interaktionsexperimenten zwischen BDC und T-Zellen in dieser Arbeit der Nachweis erbracht, dass die PF-4-vermittelte Aktivierung von BDC in funktioneller Konsequenz auch die Qualität von T-Zellantworten moduliert.

#### 4.2.2 Indirekte Effekte von PF-4 auf die T-Zellaktivierung

Es konnte in Anlehnung an die bisher diskutierten Daten in dieser Arbeit gezeigt werden, dass in heterologen wie auch in autologen Interaktionsexperimenten zwischen BDC und T-Zellen eine verstärkte Freisetzung von T-Zell-spezifischen Zytokinen nachweisbar war. Im heterologen System (siehe Abbildung 3.2.5.1) war insbesondere die massive Induktion von T-Zell-aktivierendem IL-2 durch PF-4-aktivierte BDC augenfällig. Zudem konnte in diesem System ebenso die PF-4-induzierte Freisetzung von MDC, sehr wahrscheinlich durch die BDC, nachgewiesen werden. Allerdings hatte die gesteigerte MDC-Produktion keinen reproduzierbaren Einfluss auf das  $T_H1/T_H2$ -Zytokinprofil in diesen experimentellen Versuchsreihen. Die antigenabhängige Reaktivierung  $T_H1$ -vorpolarisierter autologer T-Gedächtniszellen durch PF-4-aktivierte BDC resultierte stattdessen in einer Intensivierung des  $T_H1$ -Profils, sichtbar an einer verstärkten Produktion von  $IFN\gamma$  und  $TNF\alpha$  in diesen Ansätzen, während andere Zytokine unbeeinflusst blieben (Abbildung 3.2.5.2). Auch die Proliferationsrate verschiedener Subpopulationen von T-Zellen blieb durch PF-4-modulierte BDC unbeeinflusst (Daten nicht gezeigt). Es ist nichtsdestotrotz offensichtlich, dass PF-4 indirekt über Interaktion mit BDC einen aktivierenden Einfluss auf adaptive Immunzellen nehmen kann, wobei diese Ergebnisse zunächst in Widerspruch zu bereits publizierten Daten stehen. So wurde durch Fleischer *et al.*<sup>95</sup> gezeigt, dass die antigenrestringierte Reaktivierung von T-Zellen durch PF-4, sichtbar an verringerter Proliferation und  $IFN\gamma$ -Freisetzung, inhibiert wurde. In der Arbeit von Fleischer *et al.*<sup>95</sup> wurden jedoch PF-4-stimulierte Monozyten als Antigen-präsentierende Zellen verwendet. Da durch Scheuerer *et al.*<sup>97</sup> gezeigt werden konnte, dass PF-4 die Expression Antigen-präsentierender Moleküle massiv herabsetzt, ist es durchaus denkbar, dass die in den Arbeiten von Fleischer *et al.*<sup>95</sup> beobachtete verminderte T-Zellaktivierung ihre Ursache in einer reduzierten Antigenpräsentation hat. In der gleichen Arbeit wurden T-Zellen zur weiterführenden Analyse etwaiger direkter Effekte von PF-4 auf die T-Zellen jedoch zusätzlich antigenunabhängig mithilfe eines polyklonalen Antikörper-Stimulationsmodells in Anwesenheit von PF-4 aktiviert. Hierbei stellte sich heraus, dass die kombinierte Aktivierung von T-Zellen durch CD3- und CD28-aktivierende Antikörper, zusammen mit direkter Applikation von PF-4, zu einer drastischen Reduktion von T-Zellproliferation und Freisetzung von IL-2 führte. Die Widersprüche zwischen den Beobachtungen in dieser Arbeit und den Ergebnissen von Fleischer *et al.*<sup>95</sup> ließen sich jedoch dadurch erklären, dass in beiden *in vitro*-Systemen grundsätzlich unterschiedliche physiologische Bedingungen nachgestellt wurden. Es ist denkbar, dass die Aktivierung von T-Zellen durch CD3 und CD28 ein andersartiges Aktivierungsprogramm induziert im Vergleich zur in dieser Arbeit durchgeführten physiologischen Aktivierung dieser Zellen durch ausgereifte BDC. Hinzu kommt, dass die von Fleischer *et al.*<sup>95</sup> simulierte Konstellation im Detail nicht die physiologische Situation während einer Inflammation widerspiegelt. Eine Aktivierung von Thrombozyten in der Peripherie geht weder zeitlich noch räumlich mit einer Aktivierung von adaptiven Immunzellen wie T-Zellen einher. Wahrscheinlich würde sich die Situation *in vivo* eher wie folgt darstellen: Bei akuter Verletzung der Vaskulatur würde von Thrombozyten freigesetztes PF-4 in Monozyten, je nach Mikromilieu, zwar die bereits beschriebenen Differenzierungsprogramme initiieren. Bei Interaktion mit zuvor terminal differenzierten BDC könnte freigesetztes PF-4 jedoch insbesondere in Kombination mit mikrobiellen Stimuli eine verstärkte Aktivierung dieser Zellen induzieren. Die

ausgereiften und antigenbeladenen BDC würden anschließend in die nächstgelegenen sekundären Lymphorgane wandern und erst dort aufgrund oben dargestellter Parameter zu einer verstärkten Aktivierung von T-Zellen beitragen. Anschließend würden die aktivierten T-Effektorzellen auswandern und am Ort der Entzündung ins Gewebe eindringen und Effektorfunktionen ausüben. Erst zu diesem Zeitpunkt, am Ort der Entzündung, könnten mögliche negative Rückkopplungsmechanismen von PF-4 auf die aktivierten T-Effektorzellen greifen.

Die in dieser Arbeit dargestellten Ergebnisse lassen die Interpretation zu, dass das von stimulierten Thrombozyten freigesetzte PF-4 über Induktion eines spezifischen Aktivierungsprogrammes in BDC das immunstimulatorische Potenzial dieser Zellen erhöht und auf diesem Wege indirekt die Aktivierung von T-Zellen steuern kann. Es wäre daher sinnvoll, in weiterführenden Studien die Interaktion von anderen Plättchemediatoren wie  $\beta$ -Thromboglobulin oder von intakten Thrombozyten mit Monozyten oder BDC zu analysieren. Das Ziel solcher Untersuchungen wäre es aufzuklären, ob das differenzierende und immunmodulierende Potenzial des inflammatorischen Plättchenchemokins PF-4 durch andere Plättchenmediatoren wie beispielsweise auch Prostaglandine weiter modifiziert werden kann. Außerdem werden in zukünftigen Untersuchungen in unserer Laborgruppe *in vitro* differenzierte humane PFAPC und MoDC in immundefiziente Mäuse injiziert, um auf diesem Wege das inflammatorische Potenzial dieser Zellen während mikrobieller Infektionen oder in verschiedenen Tumor-Tiermodellen bei Interaktion mit humanen T-Zellen oder NK-Zellen in einem *in vivo*-Kontext analysieren zu können. Ausgehend von den in dieser Arbeit vorgelegten Untersuchungen zur PF-4/IL-4-induzierten Differenzierung von PFAPC aus monozytären Vorläufern sind zudem umfangreiche Analysen zur Plastizität von APC-Entwicklungswegen geplant. Hierbei soll durch Kombination von PF-4 mit verschiedenen Mastzell-assoziierten Mediatoren die kombinierte Aktivierung von Thrombozyten und Mastzellen unter inflammatorischen Bedingungen in der Vaskulatur simuliert werden, um ihren Einfluss auf die Differenzierung und Funktion von Monozyten in einem physiologischen Kontext zu untersuchen. Das Ziel dieser Untersuchungen ist herauszustellen, welche phänotypische und funktionelle Plastizität bei der PF-4-induzierten Differenzierung von Monozyten zu APC im Kontext variabler und dynamischer Mikromilieus besteht. Ein weiterer interessanter Aspekt wäre die Differenzierung von PFAPC-vergleichbaren, murinen APC aus Knochenmarks-Vorläuferzellen durch Verwendung von humanem PF-4 und murinem IL-4. Auf diesem Wege könnten weitreichende *in vivo*-Modelle zur weiterführenden Charakterisierung der immunmodulierenden Fähigkeiten von PF-4 Verwendung finden.

### **4.3 Produktion von IFN $\gamma$ durch dendritische Zellen *in vitro* und *in vivo***

Im Verlauf dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass aktivierte MoDC erhebliche Mengen IL-12p70 und IP-10 produzierten (Abbildung 3.1.5.5) und potente Induktoren von T<sub>H</sub>1-orientierten Immunantworten darstellten (Abbildungen 3.1.6.2 - 3.1.6.4). Auf der anderen Seite wurden PFAPC in diesen Experimenten als präferenziell T<sub>H</sub>2-induzierende Antigen-präsentierende Zellen charakterisiert. Interessanterweise lieferte unter anderem die Abbildung 3.1.5.5 erste Hinweise

darauf, dass auch das Leitzytokin IFN $\gamma$  in geringen Mengen von konventionellen MoDC, nicht aber von PFAPC, in den Kulturüberstand freigesetzt wurde.

IFN $\gamma$  wird nach gängiger Lehrmeinung als das zentrale Zytokin bei T<sub>H</sub>1-polarisierten Immunantworten angesehen. Hierbei kommt diesem Zytokin insbesondere bei der Bekämpfung intrazellulärer Erreger wie Mykobakterien eine wichtige Funktion zu. IFN $\gamma$  verstärkt die anti-mikrobielle Aktivität Antigen-präsentierender Zellen auf zellulärer Ebene sowie in Bezug auf die Nachhaltigkeit induzierter T-Zellantworten<sup>166;167</sup>. Ursprünglich wurde angenommen, dass dieses zentrale Leitzytokin ausschließlich von lymphoiden T<sub>H</sub>1-polarisierten CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen, CD8<sup>+</sup> zytotoxischen T-Zellen oder aktivierten NK-Zellen produziert wird. In neuerer Zeit mehrten sich jedoch die Hinweise, dass auch andere Zellen an der Produktion dieses Schlüsselzytokins beteiligt sein könnten. So wurde die Produktion von IFN $\gamma$  unter anderem in humanen Makrophagen nachgewiesen<sup>127;168</sup>. Daneben konnte – bisher ausschließlich im murinen System – die Produktion von IFN $\gamma$  auch in dendritischen Zellen gezeigt werden. Hierbei gelang der Nachweis der Produktion von IFN $\gamma$  durch murine DC sowohl *in vitro* als auch *ex vivo*<sup>169;170</sup>; zusätzlich konnte vor kurzem auch die Produktion von IFN $\gamma$  durch myeloide Zellen *in vivo* bestätigt werden<sup>84;171</sup>. Es ist durchaus vorstellbar, dass die frühe Produktion von IFN $\gamma$  durch NK-Zellen oder Antigen-präsentierende Zellen im Verlauf einer Infektion wichtige Funktionen bei parakrinen Aktivierungsrückkopplungen ausübt, wohingegen erst zu späteren Zeitpunkten aktivierte T<sub>H</sub>1-polarisierte T-Zellen die Hauptproduktion von IFN $\gamma$  übernehmen<sup>172</sup>. Die Induktion von IFN $\gamma$  in murinen Makrophagen wird in hohem Maße durch Zytokine wie IL-12 oder IL-18 verstärkt<sup>173;174</sup>, umgekehrt verstärkt aber auch IFN $\gamma$  in einer positiven Rückkopplung die Produktion von IL-12 durch Antigen-präsentierende Zellen. In Anlehnung an diese bereits bekannte Datenlage wurde inzwischen ein so genanntes Schnellstart-Modell (engl.: *jump-start model*) postuliert. Hiernach wird für das murine System hypothesisiert, dass myeloide DC nach mikrobieller Aktivierung zur Produktion geringer Mengen IFN $\gamma$  angeregt werden können, was anschließend in einer autokrinen Rückkopplung diese Zellen zu erhöhter Immunkompetenz und insbesondere verstärkter Sekretion von IL-12p70 aktiviert<sup>175</sup>.

In vorangegangenen Arbeiten aus dieser Laborgruppe (Fricke *et al.*; J Immunol, in Revision) und im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte nunmehr der Nachweis erbracht werden, dass IFN $\gamma$  als Schlüsselzytokin von T<sub>H</sub>1-polarisierten Immunantworten auch von humanen, myeloiden DC produziert werden kann. Hierzu ist in Abbildung 3.1.5.4 bzw. 3.1.5.5 zunächst gezeigt, dass die Aktivierung konventioneller MoDC durch BCG zu einer substanziellen Induktion dieses T<sub>H</sub>1-Zytokins auf mRNA-Ebene bzw. als Protein in den Zellkulturüberstand führte. Bemerkenswerterweise produzierten aktivierte PFAPC im Gegensatz dazu präferenziell zwar die bereits dargestellten T<sub>H</sub>2-assoziierten Chemokine, aber nur sehr geringe Mengen IL-12p70 sowie IFN $\gamma$ . Durch Schleicher *et al.*<sup>176</sup> wurde in einem kontroversen Bericht für murine Antigen-präsentierende Zellen gezeigt, dass selbst eine geringe Anzahl kontaminierender NK-Zellen oder T-Zellen für falsch-positive IFN $\gamma$ -Messwerte in APC-Zellkulturen verantwortlich sein können. Aus diesem Grund war es für die Signifikanz der hier gezeigten Untersuchungen unerlässlich, einen Nachweis für die Produktion von IFN $\gamma$  durch myeloide DC auf Einzelzellniveau zusätzlich zu den ELISA-Bestimmungen zu erbringen. Aufgrund der hohen Sensitivität und der Möglichkeit, immunzytochemische

Doppelmarkierungen durchzuführen, wurde die konfokale Laserscanning-Mikroskopie gewählt, um in immunzytochemischen Doppelfärbungen den DC-Marker CD209 simultan zu  $\text{IFN}\gamma$  auf Proteinebene nachzuweisen. Die Abbildungen 3.3.1.1 und 3.3.1.2 beweisen auf Einzelzellniveau die Induzierbarkeit von  $\text{IFN}\gamma$  in MoDC. Im Gegensatz dazu produzierten PFAPC kein  $\text{IFN}\gamma$ . Dieser Befund ist insbesondere dadurch von Interesse, da sowohl MoDC als auch PFAPC zwar CD209 als typisches, DC-assoziiertes Oberflächenantigen exprimierten, aber offensichtlich grundsätzlich verschiedene Zytokinprofile produzierten. PFAPC konnten damit als eine Subpopulation professionell Antigen-präsentierender Zellen charakterisiert werden, die generell eine drastisch reduzierte Fähigkeit zur Produktion  $\text{T}_\text{H}1$ -assoziierter Zytokine aufweisen. Aus der weiterführenden Argumentationslinie zum Nachweis von  $\text{IFN}\gamma$  in myeloiden DC wurden diese Zellen somit ausgenommen.

Durch Experimente von Fricke *et al.* (J Immunol, in Revision) konnte zudem in funktionellen Untersuchungen gezeigt werden, dass die nachgewiesenen geringen Mengen von  $\text{IFN}\gamma$  in autokrinen Wirkmechanismen auf das inflammatorische Potenzial von MoDC Einfluss nehmen. Hierbei wurde beschrieben, dass durch Verwendung inhibitorischer  $\alpha\text{IFN}\gamma$ -Antikörper die Sekretion von  $\text{TNF}\alpha$  durch BCG-aktivierte MoDC signifikant verringert wurde. Außerdem wurde die Produktion von  $\text{TNF}\alpha$  und IL-12p70 von BCG-aktivierten MoDC durch Zugabe von rekombinantem  $\text{IFN}\gamma$  verstärkt (Daten hier nicht gezeigt). Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass das von Frucht *et al.*<sup>175</sup> vorgeschlagene Schnell-Start Modell der DC-Aktivierung auf humane MoDC erweitert werden muss. Zudem konnte die für das murine System bereits dargestellte verstärkte Induktion von  $\text{IFN}\gamma$  in Abhängigkeit von IL-12, IL-15 und IL-18<sup>177;178</sup> sowohl im Zellkulturüberstand als auch auf Einzelzellniveau zumindest teilweise bestätigt werden (siehe Abbildung 3.3.2). Insbesondere die Zytokine IL-12/IL-15 und IL-12/IL-18 steigerten als Kostimulatoren zu BCG die  $\text{IFN}\gamma$ -Produktion von MoDC maßgeblich. Um auszuschließen, dass es sich bei den hier untersuchten  $\text{CD209}^+ \text{IFN}\gamma^+$  MoDC um ein *in vitro*-Phänomen handelte, musste zusätzlich ein Nachweis von  $\text{IFN}\gamma$  in *ex vivo* isolierten BDC sowie *in vivo* erfolgen. Tatsächlich konnte in  $\text{CD1c}^+$  *ex vivo* stimulierten BDC der Nachweis für  $\text{IFN}\gamma$  auf mRNA-Ebene geliefert werden (Daten nicht gezeigt). Des Weiteren wurden in Blasenbiopsien BCG-therapierter Tumorpatienten  $\text{CD209}^+ \text{IFN}\gamma^+$  DC *in vivo* nachgewiesen (siehe Abbildung 3.3.4).

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass in dieser Arbeit die Produktion des typisch lymphoiden Zytokin  $\text{IFN}\gamma$  durch humane DC auf Einzelzellniveau bewiesen werden konnte. Diese Beobachtungen können einen wichtigen Beitrag zum Verständnis des mechanistischen Zusammenwirkens von Zytokinen während der frühen Phase einer Infektion darstellen. Zudem stehen die hier vorgestellten Daten argumentativ in einer Reihe mit der kürzlich publizierten Beobachtung, dass humane DC in Abhängigkeit von IL-15 das üblicherweise ausschließlich von Lymphozyten produzierte Zytokin IL-2 sezernieren<sup>48</sup>. Trotz der sicherlich vielfach stärkeren Induktion von IL-2 oder  $\text{IFN}\gamma$  durch lymphoide Zellen ist es durchaus vorstellbar, dass die vergleichsweise geringe Produktion dieser Zytokine durch dendritische Zellen in dem jeweiligen Mikromilieu Einfluss auf die Qualität der initiierten Immunantwort nehmen kann. In diesem Zusammenhang kommt der Ausbildung so genannter immunologischer Synapsen zwischen DC und T-Zellen oder

DC und NK-Zellen eine große Bedeutung bei der Initiierung und Polarisierung von Immunantworten zu. Als immunologische Synapse wird der schmale interzelluläre Raum zwischen interagierenden Immunzellen bezeichnet. Während der zellulären Interaktion bilden APC und T-Zellen durch Ligation von Peptid-MHC-Komplexen mit T-Zellrezeptoren (TCR) und kostimulierenden Molekülen wie CD80 mit CD28 sowie ICAM-1 (engl.: *intercellular adhesion molecule-1*) mit LFA1 (engl.: *lymphocyte function-associated antigen 1*) unter aktivierenden Bedingungen eine stabile Synapse aus<sup>179</sup>. In diesen Zwischenraum können nun sekretorische Vesikel freigesetzt werden. Aufgrund der in dieser Arbeit vorliegenden Datenlage ließe sich vermuten, dass  $\text{IFN}\gamma$  durch mykobakteriell aktivierte DC bereits zu sehr frühen Zeitpunkten einer Infektion produziert und bei Interaktion mit T-Zellen in den synaptischen Spalt freigesetzt werden kann. Durch Maldonado *et al.*<sup>180</sup> konnte zusätzlich vor kurzem gezeigt werden, dass die Aktivierung naiver T-Zellen während der Ausbildung immunologischer Synapsen mit DC die Polarisierung von  $\text{IFN}\gamma$ - und IL-4-Rezeptoren auf der Oberfläche der T-Zellen induzierte. Während der Interaktion mit dendritischen Zellen wurden diese vorher zufällig auf der Oberfläche der T-Zellen verteilten Rezeptoren innerhalb weniger Minuten zusammen mit der immunologischen Synapse kolokalisiert.

Anhand dieser Daten wird deutlich, dass DC bereits zu sehr frühen Zeitpunkten einer mykobakteriellen Infektion durch Synthese geringer Mengen des  $\text{T}_\text{H}1$ -Leitzytokins  $\text{IFN}\gamma$  entscheidend auf die Aktivierung von NK-Zellen sowie die Polarisierung naiver T-Zellen einwirken könnten. Die Fähigkeit zur Modulation nachfolgender Immunantworten durch myeloides  $\text{IFN}\gamma$  erscheint hierbei durchaus vergleichbar zu den durch Feau *et al.*<sup>48</sup> beschriebenen immunmodulierenden Effekten von myeloidem IL-2 auf T-Zellen und NK-Zellen insbesondere zu frühen Zeitpunkten einer Inflammation.

## Literatur

1. **Hamerman, J.A., K.Ogasawara, and L.L.Lanier.** 2005. NK cells in innate immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 17:29-35.
2. **Raulet, D.H.** 2004. Interplay of natural killer cells and their receptors with the adaptive immune response. *Nat. Immunol.* 5:996-1002.
3. **Kapsenberg, M.L.** 2003. Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nat. Rev. Immunol.* 3:984-993.
4. **Andrews, D.M., C.E.Andoniou, A.A.Scalzo, S.L.van Dommelen, M.E.Wallace, M.J.Smyth, and M.A.Degli-Esposti.** 2005. Cross-talk between dendritic cells and natural killer cells in viral infection. *Mol. Immunol.* 42:547-555.
5. **Foti, M., F.Granucci, and P.Ricciardi-Castagnoli.** 2004. A central role for tissue-resident dendritic cells in innate responses. *Trends Immunol.* 25:650-654.
6. **Banchereau, J. and R.M.Steinman.** 1998. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392:245-252.
7. **Steinman, R.M. and Z.A.Cohn.** 1973. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137:1142-1162.
8. **Sallusto, F. and A.Lanzavecchia.** 1994. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med* 179:1109-1118.
9. **Moser, M. and K.M.Murphy.** 2000. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat. Immunol.* 1:199-205.
10. **Mazzoni, A. and D.M.Segal.** 2004. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J. Leukoc. Biol.* 75:721-730.
11. **de Jong, E.C., H.H.Smits, and M.L.Kapsenberg.** 2005. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin. Immunopathol.* 26:289-307.
12. **Banchereau, J., F.Briere, C.Caux, J.Davoust, S.Lebecque, Y.J.Liu, B.Pulendran, and K.Palucka.** 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18:767-811.
13. **Ludewig, B., T.Junt, H.Hengartner, and R.M.Zinkernagel.** 2001. Dendritic cells in autoimmune diseases. *Curr. Opin. Immunol.* 13:657-662.
14. **Steinman, R.M. and M.C.Nussenzweig.** 2002. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 99:351-358.
15. **Takeda, K., T.Kaisho, and S.Akira.** 2003. Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21:335-376.
16. **Takeda, K. and S.Akira.** 2005. Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.* 17:1-14.
17. **Murray, P.J.** 2005. NOD proteins: an intracellular pathogen-recognition system or signal transduction modifiers? *Curr. Opin. Immunol.* 17:352-358.
18. **Philpott, D.J. and S.E.Girardin.** 2004. The role of Toll-like receptors and Nod proteins in bacterial infection. *Mol. Immunol.* 41:1099-1108.
19. **Kawai, T. and S.Akira.** 2005. Pathogen recognition with Toll-like receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 17:338-344.
20. **Reis e Sousa.** 2004. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin. Immunol.* 16:27-34.

21. **Reis e Sousa.** 2004. Activation of dendritic cells: translating innate into adaptive immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 16:21-25.
22. **Croft,M.** 2003. Co-stimulatory members of the TNFR family: keys to effective T-cell immunity? *Nat. Rev. Immunol.* 3:609-620.
23. **Yoneyama,H., K.Matsuno, and K.Matsushimaa.** 2005. Migration of dendritic cells. *Int. J. Hematol.* 81:204-207.
24. **Randolph,G.J., V.Angeli, and M.A.Swartz.** 2005. Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat. Rev. Immunol.* 5:617-628.
25. **Liu,Y.J.** 2001. Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106:259-262.
26. **Kohrgruber,N., N.Halaneck, M.Groger, D.Winter, K.Rappersberger, M.Schmitt-Egenolf, G.Stingl, and D.Maurer.** 1999. Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. *J. Immunol.* 163:3250-3259.
27. **Robinson,S.P., S.Patterson, N.English, D.Davies, S.C.Knight, and C.D.Reid.** 1999. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 29:2769-2778.
28. **Ardavin,C., d.H.Martinez, P.Martin, F.Anjuere, C.F.Arias, A.R.Marin, S.Ruiz, V.Parrillas, and H.Hernandez.** 2001. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol.* 22:691-700.
29. **Shortman,K. and Y.J.Liu.** 2002. Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2:151-161.
30. **Grabbe,S., E.Kampgen, and G.Schuler.** 2000. Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunol. Today* 21:431-433.
31. **Dzionic,A., A.Fuchs, P.Schmidt, S.Cremer, M.Zysk, S.Miltenyi, D.W.Buck, and J.Schmitz.** 2000. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J. Immunol.* 165:6037-6046.
32. **Engering,A., S.J.Van Vliet, T.B.Geijtenbeek, and Y.Van Kooyk.** 2002. Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood* 100:1780-1786.
33. **Romani,N., S.Holzmann, C.H.Tripp, F.Koch, and P.Stoitzner.** 2003. Langerhans cells - dendritic cells of the epidermis. *APMIS* 111:725-740.
34. **Colonna,M., G.Trinchieri, and Y.J.Liu.** 2004. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat. Immunol.* 5:1219-1226.
35. **Strobl,H., C.Scheinecker, E.Riedl, B.Csmarits, C.Bello-Fernandez, W.F.Pickl, O.Majdic, and W.Knapp.** 1998. Identification of CD68+lin- peripheral blood cells with dendritic precursor characteristics. *J. Immunol.* 161:740-748.
36. **Penna,G., M.Vulcano, S.Sozzani, and L.Adorini.** 2002. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum. Immunol.* 63:1164-1171.
37. **Caux,C., C.zutter-Dambuyant, D.Schmitt, and J.Banchereau.** 1992. GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360:258-261.
38. **Santiago-Schwarz,F., E.Belilos, B.Diamond, and S.E.Carsons.** 1992. TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *J. Leukoc. Biol.* 52:274-281.
39. **Romani,N., S.Gruner, D.Brang, E.Kampgen, A.Lenz, B.Trockenbacher, G.Konwalinka, P.O.Fritsch, R.M.Steinman, and G.Schuler.** 1994. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180:83-93.
40. **Bykovskaja,S.N., M.J.Buffo, M.Bunker, H.Zhang, A.Majors, M.Herbert, A.Lokshin, M.L.Levitt, A.Jaja, D.Scalise, D.Kosiban, C.Evans, S.Marks, and J.Shogan.** 1998. Interleukin-2-induces development of dendritic cells from cord blood CD34+ cells. *J. Leukoc. Biol.* 63:620-630.

41. **Caux,C., B.Vanbervliet, C.Massacrier, I.Durand, and J.Banchereau.** 1996. Interleukin-3 cooperates with tumor necrosis factor alpha for the development of human dendritic/Langerhans cells from cord blood CD34+ hematopoietic progenitor cells. *Blood* 87:2376-2385.
42. **Blom,B., S.Ho, S.Antonenko, and Y.J.Liu.** 2000. Generation of interferon alpha-producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34(+) hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 192:1785-1796.
43. **Kadowaki,N., S.Antonenko, S.Ho, M.C.Rissoan, V.Soumelis, S.A.Porcelli, L.L.Lanier, and Y.J.Liu.** 2001. Distinct cytokine profiles of neonatal natural killer T cells after expansion with subsets of dendritic cells. *J. Exp. Med.* 193:1221-1226.
44. **Alters,S.E., J.R.Gadea, B.Holm, J.Lebkowski, and R.Philip.** 1999. IL-13 can substitute for IL-4 in the generation of dendritic cells for the induction of cytotoxic T lymphocytes and gene therapy. *J. Immunother.* 22:229-236.
45. **Strobl,H., C.Bello-Fernandez, E.Riedl, W.F.Pickl, O.Majdic, S.D.Lyman, and W.Knapp.** 1997. flt3 ligand in cooperation with transforming growth factor-beta1 potentiates in vitro development of Langerhans-type dendritic cells and allows single-cell dendritic cell cluster formation under serum-free conditions. *Blood* 90:1425-1434.
46. **Zou,G.M. and Y.K.Tam.** 2002. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur. Cytokine Netw.* 13:186-199.
47. **Ebner,S., S.Hofer, V.A.Nguyen, C.Furhapter, M.Herold, P.Fritsch, C.Heufler, and N.Romani.** 2002. A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *J. Immunol.* 168:6199-6207.
48. **Feau,S., V.Facchinetti, F.Granucci, S.Citterio, D.Jarrossay, S.Seresini, M.P.Protti, A.Lanzavecchia, and P.Ricciardi-Castagnoli.** 2005. Dendritic cell-derived IL-2 production is regulated by IL-15 in humans and in mice. *Blood* 105:697-702.
49. **Breckpot,K., J.Corthals, A.Bonehill, A.Michiels, S.Tuyaerts, C.Aerts, C.Heirman, and K.Thielemans.** 2005. Dendritic cells differentiated in the presence of IFN- $\beta$  and IL-3 are potent inducers of an antigen-specific CD8+ T cell response. *J. Leukoc. Biol.*
50. **Ho,C.S., D.Munster, C.M.Pyke, D.N.Hart, and J.A.Lopez.** 2002. Spontaneous generation and survival of blood dendritic cells in mononuclear cell culture without exogenous cytokines. *Blood* 99:2897-2904.
51. **Randolph,G.J., K.Inaba, D.F.Robbiani, R.M.Steinman, and W.A.Muller.** 1999. Differentiation of phagocytic monocytes into lymph node dendritic cells in vivo. *Immunity.* 11:753-761.
52. **Blanco,P., A.K.Palucka, M.Gill, V.Pascual, and J.Banchereau.** 2001. Induction of dendritic cell differentiation by IFN-alpha in systemic lupus erythematosus. *Science* 294:1540-1543.
53. **Geissmann,F., S.Jung, and D.R.Littman.** 2003. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 19:71-82.
54. **Randolph,G.J., S.Beaulieu, S.Lebecque, R.M.Steinman, and W.A.Muller.** 1998. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282:480-483.
55. **Randolph,G.J., G.Sanchez-Schmitz, R.M.Liebman, and K.Schakel.** 2002. The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J. Exp. Med.* 196:517-527.
56. **Brossart,P., F.Grunebach, G.Stuhler, V.L.Reichardt, R.Mohle, L.Kanz, and W.Brugger.** 1998. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 92:4238-4247.
57. **Di,P.T., C.Lapenta, S.M.Santini, M.Logozzi, S.Parlato, and F.Belardelli.** 2003. CD2+/CD14+ monocytes rapidly differentiate into CD83+ dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 33:358-367.

58. **Krutzik, S.R., B.Tan, H.Li, M.T.Ochoa, P.T.Liu, S.E.Sharfstein, T.G.Graeber, P.A.Sieling, Y.J.Liu, T.H.Rea, B.R.Bloom, and R.L.Modlin.** 2005. TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nat. Med.* 11:653-660.
59. **Ito, T., Y.H.Wang, and Y.J.Liu.** 2005. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin. Immunopathol.* 26:221-229.
60. **Wagner, H.** 2002. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:62-69.
61. **Rothenfusser, S., E.Tuma, S.Endres, and G.Hartmann.** 2002. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum. Immunol.* 63:1111-1119.
62. **Diebold, S.S., T.Kaisho, H.Hemmi, S.Akira, and Reis e Sousa.** 2004. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303:1529-1531.
63. **Kadowaki, N., S.Antonenko, J.Y.Lau, and Y.J.Liu.** 2000. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J. Exp. Med.* 192:219-226.
64. **Cella, M., D.Jarrossay, F.Facchetti, O.Alebardi, H.Nakajima, A.Lanzavecchia, and M.Colonna.** 1999. Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nat. Med.* 5:919-923.
65. **Siegel, F.P., N.Kadowaki, M.Shodell, P.A.Fitzgerald-Bocarsly, K.Shah, S.Ho, S.Antonenko, and Y.J.Liu.** 1999. The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-1837.
66. **Liu, Y.J.** 2005. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol.* 23:275-306.
67. **Kadowaki, N., S.Ho, S.Antonenko, R.W.Malefyt, R.A.Kastelein, F.Bazan, and Y.J.Liu.** 2001. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* 194:863-869.
68. **Sieling, P.A. and R.L.Modlin.** 2002. Toll-like receptors: mammalian "taste receptors" for a smorgasbord of microbial invaders. *Curr. Opin. Microbiol.* 5:70-75.
69. **Liu, Y.J., H.Kanzler, V.Soumelis, and M.Gilliet.** 2001. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat. Immunol.* 2:585-589.
70. **de Jong, E.C., P.L.Vieira, P.Kalinski, J.H.Schuitmaker, Y.Tanaka, E.A.Wierenga, M.Yazdanbakhsh, and M.L.Kapsenberg.** 2002. Microbial compounds selectively induce Th1 cell-promoting or Th2 cell-promoting dendritic cells in vitro with diverse th cell-polarizing signals. *J. Immunol.* 168:1704-1709.
71. **Napolitani, G., A.Rinaldi, F.Bertoni, F.Sallusto, and A.Lanzavecchia.** 2005. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat. Immunol.* 6:769-776.
72. **Schulz, O., A.D.Edwards, M.Schito, J.Aliberti, S.Manickasingham, A.Sher, and Reis e Sousa.** 2000. CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity.* 13:453-462.
73. **Mukhopadhyay, S., J.Herre, G.D.Brown, and S.Gordon.** 2004. The potential for Toll-like receptors to collaborate with other innate immune receptors. *Immunology* 112:521-530.
74. **Re, F. and J.L.Strominger.** 2001. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J. Biol. Chem.* 276:37692-37699.
75. **d'Ostiani, C.F., G.Del Sero, A.Bacci, C.Montagnoli, A.Spreca, A.Mencacci, P.Ricciardi-Castagnoli, and L.Romani.** 2000. Dendritic cells discriminate between yeasts and hyphae of the fungus *Candida albicans*. Implications for initiation of T helper cell immunity in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 191:1661-1674.

76. **Dillon,S., A.Agrawal, T.Van Dyke, G.Landreth, L.McCauley, A.Koh, C.Maliszewski, S.Akira, and B.Pulendran.** 2004. A Toll-like receptor 2 ligand stimulates Th2 responses in vivo, via induction of extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase and c-Fos in dendritic cells. *J. Immunol.* 172:4733-4743.
77. **Gagliardi,M.C., F.Sallusto, M.Marinaro, A.Langenkamp, A.Lanzavecchia, and M.T.De Magistris.** 2000. Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *Eur. J. Immunol.* 30:2394-2403.
78. **van der,K.D., E.Latz, J.F.Brouwers, Y.C.Kruize, M.Schmitz, E.A.Kurt-Jones, T.Espevik, E.C.de Jong, M.L.Kapsenberg, D.T.Golenbock, A.G.Tielens, and M.Yazdanbakhsh.** 2002. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J. Biol. Chem.* 277:48122-48129.
79. **Sing,A., D.Rost, N.Tvardovskaia, A.Roggenkamp, A.Wiedemann, C.J.Kirschning, M.Aepfelbacher, and J.Heesemann.** 2002. Yersinia V-antigen exploits toll-like receptor 2 and CD14 for interleukin 10-mediated immunosuppression. *J. Exp. Med.* 196:1017-1024.
80. **Weigt,H., P.F.Muhlradt, A.Emmendorffer, N.Krug, and A.Braun.** 2003. Synthetic mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 induces maturation and function of dendritic cells. *Immunobiology* 207:223-233.
81. **O'Garra,A., P.L.Vieira, P.Vieira, and A.E.Goldfeld.** 2004. IL-10-producing and naturally occurring CD4+ Tregs: limiting collateral damage. *J. Clin. Invest* 114:1372-1378.
82. **Lutz,M.B. and G.Schuler.** 2002. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol.* 23:445-449.
83. **McGuirk,P., C.McCann, and K.H.Mills.** 2002. Pathogen-specific T regulatory 1 cells induced in the respiratory tract by a bacterial molecule that stimulates interleukin 10 production by dendritic cells: a novel strategy for evasion of protective T helper type 1 responses by Bordetella pertussis. *J. Exp. Med.* 195:221-231.
84. **Suzue,K., T.Asai, T.Takeuchi, and S.Koyasu.** 2003. In vivo role of IFN-gamma produced by antigen-presenting cells in early host defense against intracellular pathogens. *Eur. J. Immunol.* 33:2666-2675.
85. **Ito,T., Y.J.Liu, and N.Kadowaki.** 2005. Functional diversity and plasticity of human dendritic cell subsets. *Int. J. Hematol.* 81:188-196.
86. **Grunig,G., A.Banz, and M.R.de Waal.** 2005. Molecular regulation of Th2 immunity by dendritic cells. *Pharmacol. Ther.* 106:75-96.
87. **Klinger,M.H. and W.Jelkmann.** 2002. Role of blood platelets in infection and inflammation. *J. Interferon Cytokine Res.* 22:913-922.
88. **Gear,A.R. and D.Camerini.** 2003. Platelet chemokines and chemokine receptors: linking hemostasis, inflammation, and host defense. *Microcirculation.* 10:335-350.
89. **Weyrich,A.S. and G.A.Zimmerman.** 2004. Platelets: signaling cells in the immune continuum. *Trends Immunol.* 25:489-495.
90. **Weyrich,A.S., S.Lindemann, and G.A.Zimmerman.** 2003. The evolving role of platelets in inflammation. *J. Thromb. Haemost.* 1:1897-1905.
91. **Brandt,E., A.Ludwig, F.Petersen, and H.D.Flad.** 2000. Platelet-derived CXC chemokines: old players in new games. *Immunol. Rev.* 177:204-216.
92. **Brindley,L.L., J.M.Sweet, and E.J.Goetzl.** 1983. Stimulation of histamine release from human basophils by human platelet factor 4. *J. Clin. Invest* 72:1218-1223.
93. **Kasper,B., E.Brandt, S.Bulfone-Paus, and F.Petersen.** 2004. Platelet factor 4 (PF-4)-induced neutrophil adhesion is controlled by src-kinases, whereas PF-4-mediated exocytosis requires the additional activation of p38 MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase. *Blood* 103:1602-1610.

94. **Schenk,B.I., F.Petersen, H.D.Flad, and E.Brandt.** 2002. Platelet-derived chemokines CXC chemokine ligand (CXCL)7, connective tissue-activating peptide III, and CXCL4 differentially affect and cross-regulate neutrophil adhesion and transendothelial migration. *J. Immunol.* 169:2602-2610.
95. **Fleischer,J., E.Grage-Griebenow, B.Kasper, H.Heine, M.Ernst, E.Brandt, H.D.Flad, and F.Petersen.** 2002. Platelet factor 4 inhibits proliferation and cytokine release of activated human T cells. *J. Immunol.* 169:770-777.
96. **Liu,C.Y., M.Battaglia, S.H.Lee, Q.H.Sun, R.H.Aster, and G.P.Visentin.** 2005. Platelet factor 4 differentially modulates CD4+CD25+ (regulatory) versus CD4+CD25- (nonregulatory) T cells. *J. Immunol.* 174:2680-2686.
97. **Scheuerer,B., M.Ernst, I.Durrbaum-Landmann, J.Fleischer, E.Grage-Griebenow, E.Brandt, H.D.Flad, and F.Petersen.** 2000. The CXC-chemokine platelet factor 4 promotes monocyte survival and induces monocyte differentiation into macrophages. *Blood* 95:1158-1166.
98. **Pervushina,O., B.Scheuerer, N.Reiling, L.Behnke, J.M.Schroder, B.Kasper, E.Brandt, S.Bulfone-Paus, and F.Petersen.** 2004. Platelet factor 4/CXCL4 induces phagocytosis and the generation of reactive oxygen metabolites in mononuclear phagocytes independently of Gi protein activation or intracellular calcium transients. *J. Immunol.* 173:2060-2067.
99. **von Hundelshausen,P., R.R.Koenen, M.Sack, S.F.Mause, W.Adriaens, A.E.Proudfoot, T.M.Hackeng, and C.Weber.** 2005. Heterophilic interactions of platelet factor 4 and RANTES promote monocyte arrest on endothelium. *Blood* 105:924-930.
100. **McIntyre,T.M., S.M.Prescott, A.S.Weyrich, and G.A.Zimmerman.** 2003. Cell-cell interactions: leukocyte-endothelial interactions. *Curr. Opin. Hematol.* 10:150-158.
101. **Czapiga,M., A.D.Kirk, and J.Lekstrom-Himes.** 2004. Platelets deliver costimulatory signals to antigen-presenting cells: a potential bridge between injury and immune activation. *Exp. Hematol.* 32:135-139.
102. **Kaneider,N.C., A.Kaser, H.Tilg, G.Ricevuti, and C.J.Wiedermann.** 2003. CD40 ligand-dependent maturation of human monocyte-derived dendritic cells by activated platelets. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 16:225-231.
103. **Martinson,J., J.Bae, H.G.Klingemann, and Y.Tam.** 2004. Activated platelets rapidly up-regulate CD40L expression and can effectively mature and activate autologous ex vivo differentiated DC. *Cytotherapy.* 6:487-497.
104. **Elzey,B.D., J.Tian, R.J.Jensen, A.K.Swanson, J.R.Lees, S.R.Lentz, C.S.Stein, B.Nieswandt, Y.Wang, B.L.Davidson, and T.L.Ratliff.** 2003. Platelet-mediated modulation of adaptive immunity. A communication link between innate and adaptive immune compartments. *Immunity.* 19:9-19.
105. **Cognasse,F., H.Hamzeh, P.Chavarin, S.Acquart, C.Genin, and O.Garraud.** 2005. Evidence of Toll-like receptor molecules on human platelets. *Immunol. Cell Biol.* 83:196-198.
106. **Andonegui,G., S.M.Kerfoot, K.McNaghy, K.V.Ebbert, K.D.Patel, and P.Kubes.** 2005. Platelets express functional Toll-like receptor-4. *Blood* 106:2417-2423.
107. **Fricke,I., D.Mitchell, F.Petersen, A.Boehle, S.Bulfone-Paus, and S.Brandau.** 2004. Platelet factor 4 in conjunction with IL-4 directs differentiation of human monocytes into specialized antigen-presenting cells. *FASEB J.* 18:1588-1590.
108. **Petersen,F., A.Ludwig, H.D.Flad, and E.Brandt.** 1996. TNF-alpha renders human neutrophils responsive to platelet factor 4. Comparison of PF-4 and IL-8 reveals different activity profiles of the two chemokines. *J. Immunol.* 156:1954-1962.
109. **Hemmi,H., T.Kaisho, O.Takeuchi, S.Sato, H.Sanjo, K.Hoshino, T.Horiuchi, H.Tomizawa, K.Takeda, and S.Akira.** 2002. Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 3:196-200.
110. **Jurk,M., F.Heil, J.Vollmer, C.Schetter, A.M.Krieg, H.Wagner, G.Lipford, and S.Bauer.** 2002. Human TLR7 or TLR8 independently confer responsiveness to the antiviral compound R-848. *Nat. Immunol.* 3:499.

111. **Boyum,A.** 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of monuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scand. J. Clin. Lab Invest Suppl* 97:77-89.
112. **Contreras,T.J., J.F.Jemionek, H.C.Stevenson, V.M.Hartwig, and A.S.Fauci.** 1980. An improved technique for the negative selection of large numbers of human lymphocytes and monocytes by counterflow centrifugation-elutriation. *Cell Immunol.* 54:215-229.
113. **Grage-Griebenow,E., D.Lorenzen, R.Fetting, H.D.Flad, and M.Ernst.** 1993. Phenotypical and functional characterization of Fc gamma receptor I (CD64)-negative monocytes, a minor human monocyte subpopulation with high accessory and antiviral activity. *Eur. J. Immunol.* 23:3126-3135.
114. **Narendran,P., K.Elsegood, N.J.Leech, and C.M.Dayan.** 2002. Dendritic cell-based proliferative assays of peripheral T cell responses to tetanus toxoid. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 958:170-174.
115. **Datta,S.R., A.Brunet, and M.E.Greenberg.** 1999. Cellular survival: a play in three Akts. *Genes Dev.* 13:2905-2927.
116. **Chiba,H., J.Clifford, D.Metzger, and P.Chambon.** 1997. Distinct retinoid X receptor-retinoic acid receptor heterodimers are differentially involved in the control of expression of retinoid target genes in F9 embryonal carcinoma cells. *Mol. Cell Biol.* 17:3013-3020.
117. **Schutysse,E., S.Struyf, and D.J.Van.** 2003. The CC chemokine CCL20 and its receptor CCR6. *Cytokine Growth Factor Rev.* 14:409-426.
118. **Fernandez,N.C., A.Lozier, C.Flament, P.Ricciardi-Castagnoli, D.Bellet, M.Suter, M.Perricaudet, T.Tursz, E.Maraskovsky, and L.Zitvogel.** 1999. Dendritic cells directly trigger NK cell functions: cross-talk relevant in innate anti-tumor immune responses in vivo. *Nat. Med.* 5:405-411.
119. **Jarrossay,D., G.Napolitani, M.Colonna, F.Sallusto, and A.Lanzavecchia.** 2001. Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* 31:3388-3393.
120. **Krug,A., A.Towarowski, S.Britsch, S.Rothenfusser, V.Hornung, R.Bals, T.Giese, H.Engelmann, S.Endres, A.M.Krieg, and G.Hartmann.** 2001. 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.* 31:3026-3037.
121. **Penna,G., M.Vulcano, A.Roncari, F.Facchetti, S.Sozzani, and L.Adorini.** 2002. Cutting edge: differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *J. Immunol.* 169:6673-6676.
122. **Lasagni,L., M.Francalanci, F. Annunziato, E.Lazzeri, S.Giannini, L.Cosmi, C.Sagrinati, B.Mazzinghi, C.Orlando, E.Maggi, F.Marra, S.Romagnani, M.Serio, and P.Romagnani.** 2003. An alternatively spliced variant of CXCR3 mediates the inhibition of endothelial cell growth induced by IP-10, Mig, and I-TAC, and acts as functional receptor for platelet factor 4. *J. Exp. Med.* 197:1537-1549.
123. **Barnes,P.F., J.S.Abrams, S.Lu, P.A.Sieling, T.H.Rea, and R.L.Modlin.** 1993. Patterns of cytokine production by mycobacterium-reactive T-cell clones. *Infect. Immun.* 61:197-203.
124. **Lalvani,A., R.Brookes, R.J.Wilkinson, A.S.Malin, A.A.Pathan, P.Andersen, H.Dockrell, G.Pasvol, and A.V.Hill.** 1998. Human cytolytic and interferon gamma-secreting CD8+ T lymphocytes specific for Mycobacterium tuberculosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95:270-275.
125. **Umemura,M., H.Nishimura, K.Hirose, T.Matsuguchi, and Y.Yoshikai.** 2001. Overexpression of IL-15 in vivo enhances protection against Mycobacterium bovis bacillus Calmette-Guerin infection via augmentation of NK and T cytotoxic 1 responses. *J. Immunol.* 167:946-956.
126. **Vankayalapati,R., B.Wizel, S.E.Weis, H.Safi, D.L.Lakey, O.Mandelboim, B.Samten, A.Porgador, and P.F.Barnes.** 2002. The NKp46 receptor contributes to NK cell lysis of mononuclear phagocytes infected with an intracellular bacterium. *J. Immunol.* 168:3451-3457.

127. **Fenton, M.J., M.W.Vermeulen, M.Burdick, R.M.Strieter, and H.Kornfeld.** 1997. Induction of gamma interferon production in human alveolar macrophages by Mycobacterium tuberculosis. *Infect. Immun.* 65:5149-5156.
128. **Schindler, H., M.B.Lutz, M.Rollinghoff, and C.Bogdan.** 2001. The production of IFN-gamma by IL-12/IL-18-activated macrophages requires STAT4 signaling and is inhibited by IL-4. *J. Immunol.* 166:3075-3082.
129. **Wang, J., J.Wakeham, R.Harkness, and Z.Xing.** 1999. Macrophages are a significant source of type 1 cytokines during mycobacterial infection. *J. Clin. Invest.* 103:1023-1029.
130. **Tailleux, L., B.Gicquel, and O.Neyrolles.** 2003. [DC-SIGN, a key receptor of Mycobacterium tuberculosis?]. *Med. Sci. (Paris)* 19:658-660.
131. **Geijtenbeek, T.B., S.J.Van Vliet, E.A.Koppel, M.Sanchez-Hernandez, C.M.Vandenbroucke-Grauls, B.Appelmek, and K.Y.van.** 2003. Mycobacteria target DC-SIGN to suppress dendritic cell function. *J. Exp. Med.* 197:7-17.
132. **van, K.Y. and T.B.Geijtenbeek.** 2003. DC-SIGN: escape mechanism for pathogens. *Nat. Rev. Immunol.* 3:697-709.
133. **Chambon, P.** 1996. A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *FASEB J.* 10:940-954.
134. **Kreutz, M., J.Fritsche, R.Andreesen, and S.W.Krause.** 1998. Regulation of cellular retinoic acid binding protein (CRABP II) during human monocyte differentiation in vitro. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 248:830-834.
135. **Geissmann, F., P.Revy, N.Brousse, Y.Lepelletier, C.Folli, A.Durandy, P.Chambon, and M.Dy.** 2003. Retinoids regulate survival and antigen presentation by immature dendritic cells. *J. Exp. Med.* 198:623-634.
136. **Yoneyama, M., M.Kikuchi, T.Natsukawa, N.Shinobu, T.Imaizumi, M.Miyagishi, K.Taira, S.Akira, and T.Fujita.** 2004. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. *Nat. Immunol.* 5:730-737.
137. **Kikuchi, T. and R.G.Crystal.** 2001. Antigen-pulsed dendritic cells expressing macrophage-derived chemokine elicit Th2 responses and promote specific humoral immunity. *J. Clin. Invest* 108:917-927.
138. **Vulcano, M., C.Albanesi, A.Stoppacciaro, R.Bagnati, G.D'Amico, S.Struyf, P.Transidico, R.Bonecchi, A.Del Prete, P.Allavena, L.P.Ruco, C.Chiabrande, G.Girolomoni, A.Mantovani, and S.Sozzani.** 2001. Dendritic cells as a major source of macrophage-derived chemokine/CCL22 in vitro and in vivo. *Eur. J. Immunol.* 31:812-822.
139. **Yamashita, U. and E.Kuroda.** 2002. Regulation of macrophage-derived chemokine (MDC, CCL22) production. *Crit Rev. Immunol.* 22:105-114.
140. **Imai, T., M.Nagira, S.Takagi, M.Kakizaki, M.Nishimura, J.Wang, P.W.Gray, K.Matsushima, and O.Yoshie.** 1999. Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *Int. Immunol.* 11:81-88.
141. **Mariani, M., R.Lang, E.Binda, P.Panina-Bordignon, and D.D'Ambrosio.** 2004. Dominance of CCL22 over CCL17 in induction of chemokine receptor CCR4 desensitization and internalization on human Th2 cells. *Eur. J. Immunol.* 34:231-240.
142. **Bonecchi, R., S.Sozzani, J.T.Stine, W.Luini, G.D'Amico, P.Allavena, D.Chantry, and A.Mantovani.** 1998. Divergent effects of interleukin-4 and interferon-gamma on macrophage-derived chemokine production: an amplification circuit of polarized T helper 2 responses. *Blood* 92:2668-2671.
143. **Mantovani, A., P.A.Gray, J.Van Damme, and S.Sozzani.** 2000. Macrophage-derived chemokine (MDC). *J. Leukoc. Biol.* 68:400-404.

144. **Iellem,A., L.Colantonio, S.Bhakta, S.Sozzani, A.Mantovani, F.Sinigaglia, and D.D'Ambrosio.** 2000. Inhibition by IL-12 and IFN-alpha of I-309 and macrophage-derived chemokine production upon TCR triggering of human Th1 cells. *Eur. J. Immunol.* 30:1030-1039.
145. **Shimada,Y., K.Takehara, and S.Sato.** 2004. Both Th2 and Th1 chemokines (TARC/CCL17, MDC/CCL22, and Mig/CXCL9) are elevated in sera from patients with atopic dermatitis. *J. Dermatol. Sci.* 34:201-208.
146. **Bisset,L.R. and P.Schmid-Grendelmeier.** 2005. Chemokines and their receptors in the pathogenesis of allergic asthma: progress and perspective. *Curr. Opin. Pulm. Med.* 11:35-42.
147. **Gu,L., S.Tseng, R.M.Horner, C.Tam, M.Loda, and B.J.Rollins.** 2000. Control of TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. *Nature* 404:407-411.
148. **Omata,N., M.Yasutomi, A.Yamada, H.Iwasaki, M.Mayumi, and Y.Ohshima.** 2002. Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. *J. Immunol.* 169:4861-4866.
149. **Luther,S.A. and J.G.Cyster.** 2001. Chemokines as regulators of T cell differentiation. *Nat. Immunol.* 2:102-107.
150. **Sallusto,F. and A.Lanzavecchia.** 1999. Mobilizing dendritic cells for tolerance, priming, and chronic inflammation. *J. Exp. Med.* 189:611-614.
151. **Trinchieri,G.** 2003. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* 3:133-146.
152. **Mantovani,A., A.Sica, S.Sozzani, P.Allavena, A.Vecchi, and M.Locati.** 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* 25:677-686.
153. **Fehervari,Z. and S.Sakaguchi.** 2004. CD4+ Tregs and immune control. *J. Clin. Invest* 114:1209-1217.
154. **Jenkins,S.J. and A.P.Mountford.** 2005. Dendritic cells activated with products released by schistosome larvae drive Th2-type immune responses, which can be inhibited by manipulation of CD40 costimulation. *Infect. Immun.* 73:395-402.
155. **Manickasingham,S.P., A.D.Edwards, O.Schulz, and Reis e Sousa.** 2003. The ability of murine dendritic cell subsets to direct T helper cell differentiation is dependent on microbial signals. *Eur. J. Immunol.* 33:101-107.
156. **Rutella,S., G.Bonanno, L.Pierelli, A.Mariotti, E.Capoluongo, A.M.Contemi, F.Ameglio, A.Curti, D.G.De Ritis, M.T.Voso, A.Perillo, S.Mancuso, G.Scambia, R.M.Lemoli, and G.Leone.** 2004. Granulocyte colony-stimulating factor promotes the generation of regulatory DC through induction of IL-10 and IFN-alpha. *Eur. J. Immunol.* 34:1291-1302.
157. **Berenson,L.S., N.Ota, and K.M.Murphy.** 2004. Issues in T-helper 1 development--resolved and unresolved. *Immunol. Rev.* 202:157-174.
158. **Mowen,K.A. and L.H.Glimcher.** 2004. Signaling pathways in Th2 development. *Immunol. Rev.* 202:203-222.
159. **gli-Esposti,M.A. and M.J.Smyth.** 2005. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat. Rev. Immunol.* 5:112-124.
160. **Borg,C., A.Jalil, D.Laderach, K.Maruyama, H.Wakasugi, S.Charrier, B.Ryffel, A.Cambi, C.Figdor, W.Vainchenker, A.Galy, A.Caignard, and L.Zitvogel.** 2004. NK cell activation by dendritic cells (DCs) requires the formation of a synapse leading to IL-12 polarization in DCs. *Blood* 104:3267-3275.
161. **Yokoyama,W.M., S.Kim, and A.R.French.** 2004. The dynamic life of natural killer cells. *Annu. Rev. Immunol.* 22:405-429.

162. **Gerosa, F., B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra, and G. Trinchieri.** 2002. Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells. *J. Exp. Med.* 195:327-333.
163. **Moretta, A.** 2002. Natural killer cells and dendritic cells: rendezvous in abused tissues. *Nat. Rev. Immunol.* 2:957-964.
164. **Cooper, M.A., T.A. Fehniger, A. Fuchs, M. Colonna, and M.A. Caligiuri.** 2004. NK cell and DC interactions. *Trends Immunol.* 25:47-52.
165. **Martin-Fontecha, A., L.L. Thomsen, S. Brett, C. Gerard, M. Lipp, A. Lanzavecchia, and F. Sallusto.** 2004. Induced recruitment of NK cells to lymph nodes provides IFN-gamma for T(H)1 priming. *Nat. Immunol.* 5:1260-1265.
166. **Shtrichman, R. and C.E. Samuel.** 2001. The role of gamma interferon in antimicrobial immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 4:251-259.
167. **Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi, and D.A. Hume.** 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75:163-189.
168. **Robinson, B.W., T.L. McLemore, and R.G. Crystal.** 1985. Gamma interferon is spontaneously released by alveolar macrophages and lung T lymphocytes in patients with pulmonary sarcoidosis. *J. Clin. Invest.* 75:1488-1495.
169. **Munder, M., M. Mallo, K. Eichmann, and M. Modolell.** 1998. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* 187:2103-2108.
170. **Ohteki, T., T. Fukao, K. Suzue, C. Maki, M. Ito, M. Nakamura, and S. Koyasu.** 1999. Interleukin 12-dependent interferon gamma production by CD8alpha+ lymphoid dendritic cells. *J. Exp. Med.* 189:1981-1986.
171. **Fujii, S., K. Liu, C. Smith, A.J. Bonito, and R.M. Steinman.** 2004. The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *J. Exp. Med.* 199:1607-1618.
172. **Schroder, K., P.J. Hertzog, T. Ravasi, and D.A. Hume.** 2004. Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. *J. Leukoc. Biol.* 75:163-189.
173. **Munder, M., M. Mallo, K. Eichmann, and M. Modolell.** 1998. Murine macrophages secrete interferon gamma upon combined stimulation with interleukin (IL)-12 and IL-18: A novel pathway of autocrine macrophage activation. *J. Exp. Med.* 187:2103-2108.
174. **Munder, M., M. Mallo, K. Eichmann, and M. Modolell.** 2001. Direct stimulation of macrophages by IL-12 and IL-18 - a bridge built on solid ground. *Immunol. Lett.* 75:159-160.
175. **Frucht, D.M., T. Fukao, C. Bogdan, H. Schindler, J.J. O'Shea, and S. Koyasu.** 2001. IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* 22:556-560.
176. **Schleicher, U., A. Hesse, and C. Bogdan.** 2005. Minute numbers of contaminant CD8+ T cells or CD11b+CD11c+ NK cells are the source of IFN-gamma in IL-12/IL-18-stimulated mouse macrophage populations. *Blood* 105:1319-1328.
177. **Fukao, T., S. Matsuda, and S. Koyasu.** 2000. Synergistic effects of IL-4 and IL-18 on IL-12-dependent IFN-gamma production by dendritic cells. *J. Immunol.* 164:64-71.
178. **Stober, D., R. Schirmbeck, and J. Reimann.** 2001. IL-12/IL-18-dependent IFN-gamma release by murine dendritic cells. *J. Immunol.* 167:957-965.
179. **Friedl, P., A.T. den Boer, and M. Gunzer.** 2005. Tuning immune responses: diversity and adaptation of the immunological synapse. *Nat. Rev. Immunol.* 5:532-545.
180. **Maldonado, R.A., D.J. Irvine, R. Schreiber, and L.H. Glimcher.** 2004. A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. *Nature* 431:527-532.

## Zusammenfassung

Nach heutigem Verständnis bilden dendritische Zellen (DC) ein funktionelles Bindeglied zwischen der angeborenen Immunabwehr und adaptiven Immunzellen. Sie sind daher als ein zentraler Drehpunkt bei der Initiierung und bei der Regulierung von Immunität anzusehen. In dieser Funktion erkennen DC mikrobielle Pathogene und leiten die integrierten Signale zur Aktivierung an Effektorzellen weiter. DC stellen jedoch einen heterogenen Zelltypus mit verschiedenartigen Differenzierungswegen und einer ausgeprägten funktionellen Plastizität dar. Die Ausrichtung adaptiver Immunantworten durch DC wird dabei, neben ontogenetischen Faktoren, entscheidend vom Differenzierungsstatus und dem Grad der Ausreifung der DC sowie der Art stimulierender Signale während der Differenzierung oder Aktivierung bestimmt. Thrombozyten besitzen nach Aktivierung, zusätzlich zu den bekannten homöostatischen Aufgaben, durch Sekretion löslicher Mediatoren ein immunmodulierendes Potenzial. In diesem Zusammenhang konnte in verschiedenen Studien gezeigt werden, dass das inflammatorische Plättchenchemokin Plättchenfaktor 4 (PF-4; CXCL4) auf die Immunbiologie von NK-Zellen, T-Zellen, Granulozyten oder auch Monozyten modulierend einwirkt.

Im Hinblick auf die Bedeutung inflammatorischer Signale auf die Funktionsweise von DC und im Zusammenhang mit dem erst kürzlich erkannten immunmodulierenden Potenzial aktivierter Thrombozyten sollte im Rahmen dieser Arbeit die Interaktion von Thrombozyten mit APC unter inflammatorischen Bedingungen untersucht werden. Das Ziel dieser Analysen war es, die von aktivierten Thrombozyten durch das inflammatorische Plättchenchemokin PF-4-vermittelten immunmodulierenden Effekte auf die Differenzierung und Aktivierbarkeit Antigen-präsentierender Zellen (APC) eingehend zu charakterisieren. Hierbei wurden in einem ersten Themenkomplex Langzeiteffekte von PF-4 auf die Differenzierung von APC aus monozytären Vorläuferzellen, insbesondere auch im Hinblick auf funktionelle Konsequenzen bei der Aktivierung von Effektorzellen untersucht. Zum anderen wurden in einem weiteren Abschnitt Daten zu immunmodulierenden Kurzzeiteffekten von PF-4 während der Interaktion mit terminal differenzierten, *ex vivo* isolierten CD1c<sup>+</sup> DC des peripheren Blutes (BDC) gezeigt.

Es stellte sich im Rahmen der Langzeituntersuchungen heraus, dass PF-4 in Kombination mit IL-4 die schnelle Differenzierung von Monozyten in PF-4-differenzierte APC (PFAPC) induzierte. Diese PFAPC waren funktionell von Makrophagen unterscheidbar und zeichneten sich durch eine ausgeprägte konstitutive Aktivierung aus. Bereits ohne mikrobielle Stimulation exprimierten diese Zellen DC-spezifische Aktivierungsmarker und erzeugten ein spezifisches Profil inflammatorischer Chemokine, wobei insbesondere das T<sub>H</sub>2-assoziierte MDC (CCL22) und IL-8 (CXCL8) in hohen Mengen nachweisbar waren. Nach Aktivierung produzierten PFAPC vergleichsweise geringe Mengen proinflammatorischer sowie T<sub>H</sub>1-polarisierender Zytokine. Die mikrobielle Stimulation dieser Zellen resultierte jedoch nicht in einer generell verminderten Zytokinsekretion, sondern vielmehr produzierten PFAPC durch Sekretion hoher Mengen an MDC, MCP-1 (CCL2) sowie RANTES (CCL5) ein hochspezifisches, vornehmlich T<sub>H</sub>2-assoziiertes Chemokinprofil. In funktioneller Konsequenz konnte zudem gezeigt werden, dass PFAPC zwar potente Induktoren

von Lymphoproliferation waren, jedoch resultierte die Aktivierung von T-Zellen in einer Verschiebung des Zytokinprofils von T<sub>H</sub>1 (IFN $\gamma$ ) in Richtung T<sub>H</sub>2 (IL-5 und IL-13). Zudem konnten auch NK-Zellen durch PF4PC zwar zur *in vitro*-Zytotoxizität, nicht aber zur Produktion von IFN $\gamma$  angeregt werden.

In Bezug auf Kurzzeiteffekte von PF-4 auf die Immunbiologie terminal differenzierter CD1c<sup>+</sup> BDC stellte sich zunächst heraus, dass CD1c<sup>+</sup> BDC die Rezeptorvariante CXCR3b als spezifischen Rezeptor für PF-4 exprimierten und dass die Spontanapoptose dieser Zellen während *in vitro*-Kulturen durch Zugabe von PF-4 signifikant inhibiert werden konnte. Des Weiteren induzierte die alleinige Stimulation durch PF-4 die Produktion proinflammatorischer Zytokine (TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8, MDC und RANTES) sowie T-Zell-stimulierender Moleküle (CD83, CD86, MHC II) in BDC. In Kombination mit LPS konnte PF-4 das inflammatorische Potenzial dieser Zellen weiter steigern. Interessanterweise inhibierte PF-4 jedoch die LPS-induzierte Produktion von IL-12p70 durch CD1c<sup>+</sup> BDC auf niedrigem Niveau. Ferner wurde das lymphostimulatorische Potenzial von BDC durch PF-4 dahingehend verstärkt, dass bei Interaktion von PF-4-modulierten BDC mit T-Zellen die Sekretion von IL-2 (heterologe MLR) oder IFN $\gamma$  und TNF $\alpha$  (autologe Antigenpräsentations-Assays) gesteigert wurde.

Für das murine System konnte kürzlich die Produktion des lymphoiden T<sub>H</sub>1-Leitzytokins IFN $\gamma$  durch myeloide DC nachgewiesen werden. Dieses Leitzytokin ist bei der frühen Polarisierung von T-Effektorzellen und bei der frühen Aktivierung von NK-Zellen von entscheidender Bedeutung. In einem abschließenden Themenkomplex in dieser Arbeit konnte in Erweiterung an diese Datengrundlage der Nachweis für das humane System erbracht werden, dass konventionelle Monozytengenerierte DC (MoDC) das wichtige T<sub>H</sub>1-polarisierende Leitzytokin IFN $\gamma$  produzieren können. Es wurde hierbei gezeigt, dass zwar MoDC, nicht aber die präferenziell T<sub>H</sub>2-polarisierenden PF4PC nach Stimulation durch *Mycobacterium bovis Bacillus Calmette-Guérin* (BCG) zur Sekretion von IFN $\gamma$  in den Kulturüberstand befähigt sind. Um die Beteiligung kontaminierender lymphoider Zellen auszuschließen, wurde die Produktion von IFN $\gamma$  durch MoDC immunzytochemisch in der konfokalen Mikroskopie zweifelsfrei auf Einzelzellniveau bestätigt. Zudem wurde zusätzlich auch *in vivo* in Gewebebiopsien BCG-therapierter Tumorpatienten die Produktion von IFN $\gamma$  durch CD209<sup>+</sup> DC aufgezeigt.

Die in dieser Arbeit generierten Daten erweitern unser Verständnis bezüglich der funktionellen Plastizität dendritischer Zellen bei der Verknüpfung angeborener Immunmechanismen mit den Zellen der adaptiven Immunität. Es konnte gezeigt werden, dass die Differenzierung und die Immunbiologie von APC durch das inflammatorische Plättchenchemokin PF-4 maßgeblich beeinflusst werden kann. Diese Daten geben erste Einblicke in die Interaktion von Thrombozyten mit Antigen-präsentierenden Zellen unter entzündlichen oder nekrotischen Bedingungen in der Vaskulatur. Sie geben zudem Aufschluss über die Fähigkeit aktivierter Thrombozyten, durch Freisetzung von PF-4 auf die Nachhaltigkeit und Qualität von APC-induzierten Immunantworten einzuwirken.

## Anhang

**Tab. A.1:** Vollständige Auflistung der in den *Human Signal Transduction PathwayFinder Gene Arrays* (Superarray) zwischen unstimulierten MoDC und PFAPC unterschiedlich regulierten Gene (Anhang zu Abb. 3.1.4.1)

	<b>MMP7</b>	<b>85.31</b>
	<b>FN1</b>	<b>47.93</b>
	<b>BCL2A1</b>	<b>30.09</b>
	HHIP	25.00
↑ x-fach über MoDC Expression ↓	<b>RBP2</b>	<b>22.00</b>
	A2M	11.56
	SELE	11.12
	CDKN2A	10.11
	HSF1	7.70
	KLK3	6.40
	BRCA1	5.31
	<b>RBP1</b>	<b>5.05</b>
	<b>HOXB1</b>	<b>4.60</b>
	CDKN2C	4.56
	CD5	4.50
	<b>CTSD</b>	<b>4.33</b>
	EGR1	4.24
	<b>CCND1</b>	<b>3.95</b>
	IL4R	3.80
	CDKN2B	3.78
	PTGS2	3.50
	<b>BIRC3</b>	<b>3.26</b>
	PTCH2	3.20
	MDM2	3.18
GADD45A	3.06	
<b>BIRC2</b>	<b>3.05</b>	
PRKCB1	2.92	
TNFRSF6	2.90	
<b>HOXA1</b>	<b>2.75</b>	
PRKCE	2.75	
TNFRSF10B	2.61	
CCL2	2.57	
IL2RA	2.50	
PRKCA	2.47	
TFRC	2.43	
CDKN2D	2.31	
<b>EN1</b>	<b>2.24</b>	
FOXA2	2.11	
	SELPLG	0.49
	BIRC1	0.46
	CDX1	0.25
	TP53	0.19

**Tab. A.2:** Gruppierung der in den *Human Signal Transduction PathwayFinder Gene Arrays* (Superarray) enthaltenen Gene in die verschiedenen Stoffwechselfade

**Mitogenic Pathway:** EGR1 (egr-1), FOS (c-fos), JUN (c-jun)

**Wnt Pathway:** CCND1 (cyclin D1), JUN (c-jun), MYC (c-myc), WISP1, WISP2, WISP3

**Hedgehog Pathway:** BMP2, BMP4, EN1 (engrailed), HIP, HNF3B (forkhead box A2), PTCH1 (patched 1), PTCH2 (patched 2), WNT1, WNT2, WSB1

**TGF- $\beta$  Pathway:** CDKN1A (p21Waf1, p21Cip1), CDKN1B (p27), CDKN1C (p57Kip2), CDKN2A (p16Ink4), CDKN2B (p15 Ink2b), CDKN2C (p18, cdk4 inhibitor), CDKN2D (p19)

**Survival Pathway:**

PI3 Kinase / AKT Pathway: BCL2, CCND1 (cyclin D1), FN1 (fibronectin), JUN (c-jun), MMP-7 (matrilysin), MYC (c-myc)

Jak / Src Pathway: BCL2, BCL2L1 (Bcl-XL)

NF- $\kappa$ B Pathway: BCL2A1 (Bfl-1/A1), BIRC1 (NAIP), BIRC2 (c-IAP2), BIRC3 (c-IAP1)

**p53 Pathway:** BAX, CDKN1A (p21Waf1/p21Cip1), GADD45A (gadd45), IGFBP3, MDM2, PIG3, TNFRSF6 (Fas), TNFRSF10B (TrailR/DR5)

**Stress Pathway:** ATF2, FOS (c-fos), HSF1 (tcf5), HSPB1 (hsp27), HSPCA (hsp90), MYC (c-myc), TP53 (p53)

**NF $\kappa$ B Pathway:** ICAM1, IL2, LTA (TNF $\beta$ ), NFKB1 (NF $\kappa$ B), NFKBIA (I $\kappa$ B $\alpha$ ), NOS2 (iNOS), PECAM1, TNFA (TNF $\alpha$ ), VCAM1

**NFAT Pathway:** CD5, IL2, TNFSF6 (FasL)

**CREB Pathway:** CYP19 (aromatase p450), EGR1 (egr-1), FOS (c-fos)

**Jak-Stat Pathway:** A2M (a2macroglobulin), CSN2 (b-casein), IL4, IL4R, IRF1, MIG, MMP10 (stromelysin-2), NOS2A (iNOS)

**Estrogen Pathway:** BCL2, BRCA1, CTSD (cathepsin D), EGFR, PGR (PR), ZNF147 (Efp)

**Androgen Pathway:** CDK2, CDKN1A (p21Waf1/p21Cip1), EGFR, KLK2 (hGK2), KLK3 (PSA), TMEPA1

**Calcium and Protein Kinase C Pathway:** CSF2 (GM-CSF), FOS (c-fos), IL2, IL2RA (IL-2 Ra), JUN (c-jun), MYC (c-myc), ODC1 (ornithine decarboxylase), PRKCA (PKCA), PRKCB1, PRKCE (PKCE), TFRC (p90/Transferrin Receptor)

**Phospholipase C Pathway:** BCL2 (Bcl-2), EGR1 (egr-1), FOS (c-fos), ICAM1, JUN (c-jun), JUNB (jun-B), NOS2A (iNOS), PTGS2 (COX-2), VCAM1

**Insulin Pathway:** CEBPB (C/EBP-beta), FASN (fatty acid synthase), GYS1 (GS, glycogen synthase), HK2 (hexokinase II), LEP (Ob)

**LDL Pathway:** CSF2 (GM-CSF), SCYA2 (mcp-1), SELE (ELAM-1/E-selectin), SELPLG (P-selectin), VCAM1

**Retinoic Acid Pathway:** CDX1, CTSD (cathepsin D), EN1 (engrailed homolog 1), FLJ12541 (Stra6), HOXA1, HOXB1, RBP1 (CRBPI), RBP2 (CRABPII)

**Quelle:** www.superarray.com  
(Datenblatt zur funktionellen Gruppierung der Gene  
des *Human Signal Transduction PathwayFinder Gene Array*)

**Tab. A.3:** Vollständige Auflistung der in den *Human Inflammatory Cytokines & Receptors Gene Arrays* (Superarray) zwischen unstimulierten MoDC und PFAPC unterschiedlich regulierten Gene (Anhang zu Abb. 3.1.4.2)

↑ x-fach über MoDC Expression ↓	<b>MDC</b>	<b>13.82</b>
	<b>RANTES</b>	<b>9.73</b>
	<b>MIP1-β</b>	<b>6.47</b>
	CXCR4	5.18
	<b>IL-8</b>	<b>4.68</b>
	SDF2	4.64
	<b>MCP-1</b>	<b>4.44</b>
	<b>MIP1-α</b>	<b>4.27</b>
	IL6R	3.62
	CSF1	3.37
	<b>MIF</b>	<b>3.32</b>
	ENA-78	3.24
	IL16	2.73
	IL25	2.46
	TGF <sub>α</sub>	2.39
	EMAC	2.16
	TGF <sub>β</sub> 1	2.09
	IL10R <sub>β</sub>	2.02
	<b>CCR7</b>	<b>neu</b>
	HCC-1	0.30
IL1R1	0.30	
MPIF-1	0.26	
IL1R2	0.21	
<b>CCR6</b>	<b>0.07</b>	

**Tab. A.4:** Vollständige Auflistung der in den *Human Signal Transduction PathwayFinder Gene Arrays* (Superarray) zwischen BCG-stimulierten MoDC und PFAPC unterschiedlich regulierten Gene (Anhang zu Abb. 3.1.5.3)

FN1	12,70
A2M	4,49
BIRC3	3,04
CYP19A1	2,49
FASN	neu
JUN	de novo
WNT1	0,48
BCL2A1	0,47
<b>NF<math>\kappa</math>B1</b>	<b>0,46</b>
MDM2	0,45
CDKN1A	0,43
MYC	0,39
CEBPB	0,36
RBP1	0,34
TRIM25	0,33
TRAILR	0,32
GYS1	0,31
TP53I3	0,29
<b>NF<math>\kappa</math>BIA</b>	<b>0,27</b>
GADD45A	0,27
HIP	0,27
HK2	0,25
EN1	0,24
SELE	0,23
<b>ICAM1</b>	<b>0,23</b>
CDKN2B	0,22
JUNB	0,22
SELPLG	0,22
CDK2	0,20
CDKN2D	0,20
BCL2L1	0,19
BRCA1	0,18
CDKN2A	0,16
CD95	0,16
BCL2	0,12
CDX1	0,11
BIRC1	0,11
HOXB1	0,11
<b>LTA</b>	<b>0,11</b>
IRF1	0,10
CDKN1C	0,08
HSF1	0,07
MMP10	0,07
IL2R $\alpha$	0,06



x-fach über MoDC Expression



**Tab. A.5:** Vollständige Auflistung der in den *Human Inflammatory Cytokines & Receptors Gene Arrays* (Superarray) zwischen BCG-stimulierten MoDC und PFAPC unterschiedlich regulierten Gene (Anhang zu Abb. 3.1.5.4)

<b>MCP-1</b>	<b>40,31</b>
IL25	2,04
<b>RANTES</b>	<b>1,93</b>
<b>MDC</b>	<b>1,56</b>
ENA-78	0,47
IL9	0,45
CCL21	0,45
TARC	0,44
IL6R	0,44
IL1 $\alpha$	0,38
IL1R1	0,37
MPIF-2	0,33
MIP-1 $\delta$	0,28
PARC	0,25
IL15 R $\alpha$	0,23
<b>IP-10</b>	<b>0,22</b>
<b>IL6</b>	<b>0,18</b>
IL1R2	0,14
MPIF-1	0,11
<b>IL12p40</b>	<b>0,10</b>
<b>CCR6</b>	<b>abwesend</b>
<b>IFN<math>\gamma</math></b>	<b>abwesend</b>
IL-2R $\alpha$	abwesend
IP-9	abwesend
MIF	abwesend

**Tab. A.6:** Vollständige Auflistung der in den *Human Inflammatory Cytokines & Receptors Gene Arrays* (Superarray) zwischen unstimulierten BDC und PF-4-stimulierten BDC unterschiedlich regulierten Gene (Anhang zu Abb. 3.2.4.1)

↑ x-fach über BDC Expression ↓	<b>IL5</b>	<b>5,49</b>
	IL2R $\alpha$	3,95
	<b>MCP-4</b>	<b>3,19</b>
	<b>Lymphotactin</b>	<b>3,16</b>
	CCR1	2,80
	<b>SCM-1<math>\beta</math></b>	<b>2,78</b>
	<b>IL25</b>	<b>2,72</b>
	<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	<b>2,69</b>
	TNFRSF1A	2,14
	<b>MCP-1</b>	<b>2,11</b>
	<b>IL9</b>	<b>2,07</b>
	TGF $\alpha$	2,03
	IL6R	2,00
	<b>Fractalkine</b>	<b>1,91</b>
	<b>Eotaxin</b>	<b>1,81</b>
	<b>MDC</b>	<b>1,67</b>
	<b>IL6</b>	<b>1,55</b>
	ELC	de novo
	<b>LEP</b>	<b>de novo</b>
	<b>IL-11</b>	<b>de novo</b>
<b>PARC</b>	<b>de novo</b>	
<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>de novo</b>	
MPIF-2	0,46	
IL1R2	0,45	
IL6ST	0,41	
IL13R $\alpha$ 1	0,32	

**Tab. A.7:** Vollständige Auflistung der in den *Human Inflammatory Cytokines & Receptors Gene Arrays* (Superarray) zwischen LPS+IFN $\gamma$ -stimulierten BDC und LPS+IFN $\gamma$ +PF-4-stimulierten BDC unterschiedlich regulierten Gene (Anhang zu Abb. 3.2.4.2)

x-fach über BDC+LPS Expression $\updownarrow$	<b>TNF<math>\alpha</math></b>	<b>6,75</b>
	<b>PARC</b>	<b>6,22</b>
	MPIF-1	5,69
	<b>MIP-1<math>\beta</math></b>	<b>4,85</b>
	MIP-1 $\delta$	4,47
	TGF $\alpha$	3,12
	<b>SCM-1<math>\beta</math></b>	<b>2,90</b>
	<b>MCP-4</b>	<b>2,82</b>
	CCR9	2,71
	<b>Lymphotactin</b>	<b>2,49</b>
	<b>I-309</b>	<b>2,48</b>
	<b>IL9</b>	<b>2,33</b>
	IL6R	2,27
	SLC	2,27
	<b>IL1<math>\alpha</math></b>	<b>2,03</b>
IL2R $\gamma$	2,01	
<b>MCP-2</b>	<b>abwesend</b>	

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 2.5.5:</b>	Schematischer Ablauf der immunzytochemischen Färbungen für die konfokale Mikroskopie.....	36
<b>Abbildung 3.1.1:</b>	Zellmorphologische Veränderungen von MoDC und PFAPC während der Differenzierungsperiode .....	38
<b>Abbildung 3.1.2:</b>	Phagozytoseaktivität von GM-M $\Phi$ und PF-M $\Phi$ im Vergleich zu MoDC und PFAPC .....	39
<b>Abbildung 3.1.3:</b>	Produktion von Sauerstoffradikalen durch GM-M $\Phi$ und PF-M $\Phi$ im Vergleich zu MoDC und PFAPC.....	40
<b>Abbildung 3.1.4.1:</b>	mRNA-Transkriptionsprofil von Signaltransduktionswegen in unstimulierten MoDC und PFAPC .....	42
<b>Abbildung 3.1.4.2:</b>	mRNA-Transkriptionsprofil inflammatorischer Zytokine und dazugehöriger Rezeptoren in unstimulierten MoDC und PFAPC.....	43
<b>Abbildung 3.1.4.3:</b>	Profil inflammatorischer Zytokine in unstimulierten MoDC und PFAPC auf Proteinebene .....	44
<b>Abbildung 3.1.5.1:</b>	Expression von TLR-mRNA in unstimulierten bzw. BCG-stimulierten MoDC und PFAPC .....	46
<b>Abbildung 3.1.5.2:</b>	Sezernierung von proinflammatorischem TNF $\alpha$ nach Stimulation von MoDC und PFAPC durch verschiedene TLR-Liganden .....	47
<b>Abbildung 3.1.5.3:</b>	mRNA-Transkriptionsprofil von Signaltransduktionsgenen in MoDC und PFAPC nach Stimulation mit BCG und Phosphorylierung von I $\kappa$ B und p38 im zeitlichen Verlauf nach Aktivierung von MoDC und PFAPC durch BCG ...	49
<b>Abbildung 3.1.5.4:</b>	mRNA-Transkriptionsprofil inflammatorischer Zytokine und dazugehöriger Rezeptoren in MoDC und PFAPC nach Stimulation mit BCG .....	50
<b>Abbildung 3.1.5.5:</b>	Sekretion inflammatorischer Zytokine durch MoDC und PFAPC nach Stimulation mit BCG .....	51
<b>Abbildung 3.1.5.6:</b>	Relative Sekretion von MDC durch PFAPC im Verhältnis zu MoDC nach Stimulation mit verschiedenen TLR-Liganden .....	52
<b>Abbildung 3.1.6.1:</b>	Induktion antigenabhängiger Proliferation CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> naiver T-Zellen durch verschiedene Antigen-präsentierenden Zellen .....	53
<b>Abbildung 3.1.6.2:</b>	T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Zytokinprofil von reaktivierten CD3 <sup>+</sup> T-Zellen in autologen Antigenpräsentations-Assay mit MoDC und PFAPC .....	55
<b>Abbildung 3.1.6.3:</b>	T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Zytokinprofil von aktivierten CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> T-Zellen in autologen Antigenpräsentations-Assay mit MoDC und PFAPC .....	56
<b>Abbildung 3.1.6.4:</b>	T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Zytokinprofil von CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> naiven T-Zellen in gemischter Leukozytenreaktion (MLR) mit heterologen MoDC und PFAPC .....	57
<b>Abbildung 3.1.7:</b>	DC-vermittelte Aktivierung von NK-Zellen in Zytotoxizitäts-Assay .....	58
<b>Abbildung 3.2.1:</b>	Reinheitskontrolle des CD1c <sup>+</sup> BDC-Aufreinigungsprotokolls.....	60
<b>Abbildung 3.2.2.1:</b>	Phänotyp von frisch isolierten CD1c <sup>+</sup> BDC .....	60
<b>Abbildung 3.2.2.2:</b>	Expression des PF-4-spezifischen Rezeptors CXCR3b in CD1c <sup>+</sup> BDC .....	61
<b>Abbildung 3.2.3:</b>	Anti-apoptotische Effekte von PF-4 im Vergleich zu GM-CSF auf <i>in vitro</i> kultivierte CD1c <sup>+</sup> BDC .....	61
<b>Abbildung 3.2.4.1:</b>	mRNA-Transkriptionsprofil inflammatorischer Zytokine und dazugehöriger Rezeptoren in unstimulierten bzw. PF-4-aktivierten CD1c <sup>+</sup> BDC.....	62
<b>Abbildung 3.2.4.2:</b>	mRNA-Transkriptionsprofil inflammatorischer Zytokine und dazugehöriger Rezeptoren in LPS+IFN $\gamma$ - und LPS+IFN $\gamma$ +PF-4-stimulierten CD1c <sup>+</sup> BDC .....	63

<b>Abbildung 3.2.4.4:</b>	Phänotypische Aktivierung von CD1c <sup>+</sup> BDC nach Stimulation mit PF-4 oder in Kombination mit TLR-Ligation .....	65
<b>Abbildung 3.2.5.1:</b>	T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Zytokinprofil von heterologen CD4 <sup>+</sup> CD45RA <sup>+</sup> naiven T-Zellen in Kokultur mit unstimulierten bzw. PF-4-stimulierten CD1c <sup>+</sup> BDC in gemischter Leukozytenreaktion .....	67
<b>Abbildung 3.2.5.2:</b>	T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2-Zytokinprofil in autologen Antigenpräsentations-Assay mit CD3 <sup>+</sup> T-Gedächtniszellen in Kokultur mit unstimulierten, PPD- oder PPD+PF-4-stimulierten CD1c <sup>+</sup> BDC .....	68
<b>Abbildung 3.3.1.1:</b>	Immunzytochemischer Nachweis von IFN <sub>γ</sub> in unstimulierten MoDC und PFAPC auf Einzelzellniveau .....	70
<b>Abbildung 3.3.1.2:</b>	Immunzytochemischer Nachweis von IFN <sub>γ</sub> in BCG-aktivierten MoDC und PFAPC auf Einzelzellniveau.....	71
<b>Abbildung 3.3.2:</b>	Additive Induktion von IFN <sub>γ</sub> in MoDC nach Stimulation mit BCG in Kombination mit IL-12, IL-15 oder IL-18 .....	72
<b>Abbildung 3.3.3:</b>	Immunzytochemischer Nachweis von CD4 <sup>+</sup> sowie IFN <sub>γ</sub> <sup>+</sup> T-Zellen in Gefrierschnitten aus Blasenbiopsien BCG-therapierter Tumorpatienten....	73
<b>Abbildung 3.3.4:</b>	Immunzytochemischer Nachweis von CD209 <sup>+</sup> IFN <sub>γ</sub> <sup>+</sup> dendritischen Zellen in Gefrierschnitten aus Blasenbiopsien BCG-therapierter Tumorpatienten....	74

## Veröffentlichungen

### Originalpublikationen:

- **Mitchell D, F. Petersen, G. Bentien, S. Brandau.** *PF-4 induces differentiation of monocytes into activated APC and thereby directs T helper polarization towards T<sub>H</sub>2.* (2005) (Zur Publikation eingereicht; Blood)
- **Fricke I, D. Mitchell, J. Mittelstädt, N. Lehan, T. Goldmann, H. Heine, A. Böhle, S. Brandau.** *Mycobacteria induce IFN $\gamma$  production in human dendritic cells via toll-like receptor 2.* (2005) (J Immunol, in Revision)
- **Fricke I, D. Mitchell, F. Petersen, A. Böhle, S. Bulfone-Paus, S. Brandau.** *Platelet factor 4 in conjunction with IL-4 directs differentiation of human monocytes into specialized antigen-presenting cells.* (2004) FASEB J 18:1588-1590.

### Buchbeiträge:

- **Mitchell D, K. Harneit, G. Meyer, W. Sand, E. Stackebrandt.** *Systematic analysis of our culture collection for "genospecies" of Acidithiobacillus ferrooxidans, A. thiooxidans and Leptospirillum ferrooxidans.* (2004) Biohydrometallurgy - sustainable technology in evolution. Tsezos M, A. Hatzikioseyian, E. Remoundaki (eds.); Part 2; pp.1369-78.

### Vorträge:

- **36<sup>th</sup> Meeting of the German Society of Immunology (DGFI).** Kiel, Deutschland  
*PF-4 induces differentiation of monocytes into activated APC and thereby directs T helper polarization towards T<sub>H</sub>2.* (September 2005)
- **27. Arbeitstagung der nordd. Immunologen.** Borstel, Deutschland  
*The inflammatory platelet-derived chemokine CXCL4 (PF-4) induces rapid differentiation of DC-like APC from monocytes.* (November 2004)
- **10<sup>th</sup> Conference on platelets.** Erfurt, Deutschland  
*Platelet factor-4 in conjunction with IL-4 directs differentiation of human monocytes into specialized antigen-presenting cells.* (Juni 2004)

### Auszeichnungen:

- Auszeichnung mit dem Qiagen-Award für die *most efficient presentation* für einen Vortrag im Rahmen der 27. Arbeitstagung der nordd. Immunologen (November 2004)

**Kongressbeiträge (gedruckte Abstracts):**

- **Mitchell D, G. Bentien, F. Petersen, S. Brandau.** *PF-4 / CXCL 4 induces differentiation of monocytes into activated APC and directs T helper polarization towards T<sub>H</sub>2.* (2005) Immunobiol. Vol.210, No.6-8
- **Nashkevich N, D. Mitchell, B. Kasper, S. Brandau, B. Scheuerer, E. Brandt.** *Secretion and intracellular accumulation of microbicidal beta-thromboglobulins and thrombocidins in human macrophages and dendritic cells in vitro and ex vivo.* (2005) Immunobiol. Vol.210, No.6-8
- **Fricke I, D. Mitchell, J. Mittelstädt, H. Heine, T. Goldmann, S. Brandau.** *Mycobacteria induce interferon- $\gamma$  production in human dendritic cells via triggering of toll-like receptor 2.* (2005) Keystone Symposium 2005. Vancouver, Kanada
- **Mitchell D, I. Fricke, F. Petersen, T. Laskay, N. Reiling, S. Brandau.** *The inflammatory platelet-derived chemokine CXCL4 (PF-4) induces rapid differentiation of DC-like antigen-presenting cells from human monocytes.* (2004) Immunobiol. Vol.209, No.4-6
- **Fricke I, D. Mitchell, J. Mittelstädt, N. Lehan, H. Heine, T. Goldmann, S. Brandau.** *Toll-like receptor 2 ligation by BCG mycobacteria induces interferon- $\gamma$  production in human dendritic cells.* (2004) Immunobiol. Vol.209, No.4-6
- **Mitchell D, I. Fricke, F. Petersen, S. Bulfone-Paus, T. Laskay, S. Brandau.** *The inflammatory platelet-derived chemokine CXCL4 induces rapid differentiation of DC-like APC from human monocytes.* (2004) 8<sup>th</sup> International Symposium on Dendritic Cells. Brügge, Belgien
- **Mitchell D, I. Fricke, F. Petersen, A. Böhle, S. Bulfone-Paus, S. Brandau.** *Platelet factor 4 in conjunction with IL-4 directs differentiation of human monocytes into specialized antigen-presenting cells.* (2004) Platelets 15 (8), pp. 479-517
- **Fricke I, D. Mitchell, F. Petersen, S. Bulfone-Paus, T. Laskay, S. Brandau.** *Platelet factor 4 in conjunction with IL-4 rapidly directs differentiation of human monocytes into specialized antigen-presenting cells.* (2004) Clinical and Investigative Medicine Vol.27; No.4
- **Mitchell D, I. Fricke, F. Petersen, A. Böhle, S. Bulfone-Paus, S. Brandau.** *Rapid in vitro generation of potent antigen-presenting cells from monocyte precursors by differentiation with platelet factor 4 and IL-4.* (2003) Immunobiol. Vol.208, No.1-3
- **Mitchell D, G. Meyer, W. Sand.** *DGGE-analyses on the relationship of different strains of Acidithiobacillus ferrooxidans, A. thiooxidans and Leptospirillum ferrooxidans.* (2002) BIOSpektrum Sonderausgabe 2002

## Danksagung

Meinem Betreuer, Herrn **PD Dr. Sven Brandau**, danke ich für die Überlassung des Promotions-themas und für die Möglichkeit, diese Dissertation in der Laborgruppe Immuntherapie am Forschungszentrum Borstel erstellen zu können. Außerdem danke ich ihm herzlich für die inten-sive Betreuung und die stete Diskussionsbereitschaft während der Durchführung dieser Arbeit.

Auch meinem Mentor, Herrn **PD Dr. Frank Petersen**, danke ich herzlich für sein begleitendes Interesse an dieser Arbeit und die wissenschaftlichen Diskussionen, die immer ausgesprochen hilfreich für mich waren.

Bei der Direktorin der Abteilung Immunologie und Zellbiologie, Frau **Prof. Dr. Dr. Silvia Bulfone-Paus**, möchte ich mich für die stete Unterstützung, unter anderem bei der Beantragung eines Stipendiums bei der Deutschen Gesellschaft für Immunologie für eine Kongressreise nach Montreal (Kanada) bedanken.

Bedanken möchte ich mich zudem bei allen Kolleginnen und Kollegen aus der Laborgruppe Immuntherapie für die angenehme Arbeitsatmosphäre. Hervorheben möchte ich an dieser Stelle Herrn **Dominik Schmaltz** und Herrn **Dr. Andreas Busche**. Des Weiteren danke ich Frau **Gabriele Bentien**, Frau **Stefanie Uthmann** und Frau **Mareike Newski** für die brillante technische Unterstützung.

Herrn **Dr. Martin Ernst** und Frau **Dr. Kathleen Marienfeld** danke ich für die zahllosen Hilfe-stellungen und Tipps nicht zuletzt zur Durchflusszytometrie. Frau **Renate Bergmann** und Frau **Erika Kaltenhäuser** danke ich für die Organisation der freiwilligen Blutspende sowie für diverse Zytokinmessungen und Elutriationen.

Herrn **PD Dr. Holger Heine** und Frau **Ina Goroncy** danke ich für die Bereitstellung diverser TLR-Liganden sowie für die Durchführung von Western-blot-Analysen.

Des Weiteren danke ich Frau **Diana Heinrich** für die Durchführung von Phagozytose-Assays und Experimenten zur Messung radikalischer Sauerstoffmetabolite und Frau **Dr. Katja Brandt** für die Durchführung von Multi-Zytokinmessungen.

Herrn **Dr. Thomas Scholzen** sowie Frau **PD Dr. Ulrike Seitzer** danke ich für die Einführung in die konfokale Laserscanning-Mikroskopie und Herrn **PD Dr. Norbert Reiling** sowie Frau **Svenja Kröger** für die Untersuchungen zur Expression des CXCR3b-Rezeptors auf BDC. Herrn **Prof. Dr. Klaus Brandenburg** danke ich für die Bereitstellung von Lipopolysacchariden von *Salmonella minnesota*.

Herrn **Prof. Dr. Ernst Brandt** danke ich für die Bereitstellung von Antikörpern für Zytokin-messungen. Frau **Dr. Natalia Naskhevich** danke ich für die konstruktive Zusammenarbeit und Frau **Christine Engellenner** für die Aufreinigung von Plättchenfaktor 4.

Herrn **PD Dr. Tamas Laskay** (Medizinische Mikrobiologie und Hygiene, Medizinische Universität zu Lübeck; Schleswig-Holstein) sowie Frau **Birgit Hansen** danke ich für die Durchführung der RNAse-Protektions-Assays.

Für die kritische Durchsicht dieser Dissertation danke ich Herrn **Dr. Andreas Busche**, Herrn **PD Dr. Frank Petersen**, Herrn **PD Dr. Sven Brandau** und Frau **Siegrid Woelk**.

Außerdem möchte ich der **Deutschen Forschungsgemeinschaft** für die Finanzierung der Promotion durch ein Stipendium im Rahmen des Graduiertenkollegs 288 danken. Herrn **Prof. Dr. Wolfgang Jelkmann** und Herrn **PD Dr. Helmut Haas** danke ich in diesem Zusammenhang für die Organisation der vielseitigen und lehrreichen Weiterbildungsveranstaltungen im Rahmen des Graduiertenkollegs 288.

Ich danke ganz besonders und sehr herzlich Frau **Petra Hahnemann**, Frau **Siegrid Woelk** und Frau **Renate Geissel** für die unermüdliche Unterstützung während dieser Zeit.

**Eva**, Dir danke ich für die wundervollen Jahre ...

## Curriculum vitae

### Persönliche Daten:

Name	Mitchell
Vorname	Daniell
Geburtsdatum	05. März 1976
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	ledig
Staatsangehörigkeit	deutsch

### Schulbildung:

1982 - 1986	Grundschule Alt-Rahlstedt, Hamburg
1986 - 1995	Matthias-Claudius-Gymnasium, Hamburg; Abschluss: Abitur

### Zivildienst:

Okt. 1995 - Okt. 1996	Amalie-Sieveking Krankenhaus, Hamburg
-----------------------	---------------------------------------

### Studium:

Okt. 1996 - Mai 2002	Studium der Biologie an der Universität Hamburg Diplomarbeit in der Abteilung Mikrobiologie bei Prof. Dr. W. Sand zum Thema: <i>Molekularbiologische Untersuchungen zu phylogenetischen Beziehungen extremophiler Bakterienstämme</i> , Abschluss: Diplom-Biologe
----------------------	---

### Promotion:

Seit Okt. 2002	Dissertation am Forschungszentrum Borstel, Leibniz - Zentrum für Medizin und Biowissenschaften Abteilung Immunologie und Zellbiologie Laborgruppe Immuntherapie
----------------	--

### Mitgliedschaften:

seit 2003	Deutsche Gesellschaft für Immunologie (DGfI)
-----------	--

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit selbständig verfasst und keine weiteren, als die darin angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet wurden. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form an anderer Stelle im Rahmen eines Prüfungsverfahrens vorgelegen.

Lübeck, 19. Oktober 2005

Daniell Mitchell