

Aus dem Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Die kombinatorische Stimulation von Toll-like Rezeptoren auf
dendritischen Zellen und ihr Effekt auf die Polarisierung von
CD4⁺T-Zellen

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Robert Michael Gramlich

aus Siegburg

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. R. Stahlmann
 2. Prof. Dr. rer. nat. T. Platzek
 3. Prof. Dr. med. B. Wittig

Datum der Promotion: 30.11.2012

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	6
1 Einleitung	9
1.1 Ontogenese der dendritischen Zellen.....	10
1.2 Verteilungsmuster und Morphologie.....	12
1.3 Aufnahme und Prozessierung von Antigenen	13
1.4 Reifung der dendritischen Zellen.....	14
1.5 Die Gefahrenhypothese	15
1.6 Toll-like Rezeptoren	17
1.7 Interaktion mit Lymphozyten.....	19
1.8 Die unterschiedlichen Populationen der CD4 ⁺ T-Zellen	21
1.8.1 Die CD4 ⁺ T _H 1-Zellen	21
1.8.2 Die CD4 ⁺ T _H 2-Zellen	22
1.8.3 Die CD4 ⁺ T _H 17-Zellen	22
1.8.4 Die CD4 ⁺ T _H 22-Zellen	23
1.8.5 T-Zell-Plastizität	25
1.9 Die TLR gesteuerte T-Zell-Differenzierung.....	26
1.10 Die Kooperation der TLR.....	28
1.11 Aufgabenstellung.....	29
2 Material und Methoden.....	32
2.1 Zellbiologisches Material und Arbeitstechniken.....	32
2.2 Zellisolierung aus <i>buffy coat</i>	33
2.2.1 Isolierung von PBMC aus <i>buffy coat</i> über Dichtegradientenzentrifugation	33
2.2.2 Isolierung von Monozyten aus PBMC durch Adhärenz	34
2.2.3 Magnetische Sortierung von Monozyten mit Anti-CD14 Mikrobeads	34
2.2.4 Isolierung von Monozyten durch Depletion anderer PBMC-Populationen.	35
2.2.5 Isolierung von pDC durch Depletion anderer PBMC-Populationen und anschließender Sortierung mit Anti-human CD304 Mikrobeads	36
2.3 Generierung von DC und LC aus Monozyten.....	37
2.4 Stimulation der DC	38
2.5 Isolierung und Kultur von CD4 ⁺ T-Zellen durch Depletion anderer PBMC-Populationen	39
2.6 Zytokinmessung im Sandwich-ELISA.....	40

2.7 Durchflusszytometrie.....	43
2.7.1 Färbung der Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern	44
2.7.2 Messung der Zellen und Analyse	45
2.8 Datenverarbeitung und statistische Auswertung	46
3 Ergebnisse	47
3.1 Vergleich der Methoden Adhärenz, Positivisolierung und Depletion in TLR2 stimulierten DC.....	47
3.2 Vergleich unterschiedlicher TLR2-Liganden.....	48
3.2.1 Sekretion von IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-1 β und IL-12p70	48
3.2.2 Expression von HLA-DR, CD40, CD86, CD1a, CD80 und CD83 auf MoLC nach Stimulation mit PGN, Pam ₂ und Pam ₃	49
3.2.3 Stimulation mit PGN bei Blockade des TLR2.....	50
3.2.3 Resümee.....	51
3.3 Stimulation von MoLC und MoDC mit PGN und CD40L.....	52
3.3.1 Sekretion von IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-12p70 und IL-1 β durch MoLC und MoDC nach Stimulation mit PGN und CD40L.....	52
3.3.2 Expression der Reifungsmarker CD86, HLA-DR, CD83 und CD80 auf MoLC und MoDC nach Stimulation mit PGN und CD40L	53
3.3.3 Resümee.....	55
3.4 Sekretion von Zytokinen nach simultaner Stimulation der DC mit LPS und anderen TLR-Liganden	55
3.4.1 Simultane Stimulation der MoLC mit LPS, PolyI:C und PolyU	55
3.4.2 Kostimulation der MoLC und MoDC mit LPS, MALP-2 und Flagellin	57
3.4.3 Resümee.....	58
3.5 Stimulation von DC mit unterschiedlichen TLR-Liganden in Kombination.....	59
3.5.1 Der Effekt der kombinierten Stimulation mit PGN, LPS und DNS auf die Zytokinsekretion durch MoLC, MoDC und pDC	59
3.5.2 Der Effekt der kombinierten Stimulation mit PGN, LPS und DNS auf die Ex- pression kostimulatorischer Moleküle und Reifungsmarker auf MoLC.....	62
3.5.3 Resümee.....	64
3.6 Kombiniert TLR stimulierte MoLC und CD4 ⁺ T-Zellen in Kokultur	66
3.6.1 Der Effekt kombiniert TLR stimulierter MoLC auf CD4 ⁺ T-Zellen in der Kokultur.....	66
3.6.2 Resümee.....	68
4 Diskussion	69
5 Zusammenfassung.....	86

6 Literaturverzeichnis.....	88
7 Lebenslauf.....	102
8 Publikationsliste	103
9 Selbständigkeitserklärung.....	104
10 Danksagung.....	105

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AP-1	Aktivatorprotein 1
APC	Antigen präsentierende Zelle
APCy	Allophycocyanin
BNC2	Zinkfingerprotein Basonuklein 2
BSA	Rinderserumalbumin
CCL	CC-Motiv-Chemokinligand
CCR	CC-Motiv-Chemokinrezeptor
CD	Differenzierungskluster
CD40L	CD40-Ligand
cDC	Konventionelle dendritische Zelle
CPDA	Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin
CpG	Immunstimulatorische, unmethylierte Nukleotidsequenz
CXCR	CXC-Motiv-Chemokinrezeptor
DC	Dendritische Zelle
DC-SIGN	DC-spezifisches, ICAM3-aufgreifendes Nicht-Integrin
DNS	Desoxyribonukleinsäure
ds	Doppelsträngig
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia Coli</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	Durchflusszytometer, englisch <i>fluorescence activated cell sorting</i>
Fc	Kristallisierbares Fragment
FCS	Fötale Kälberserum
FGF	Fibroblastenwachstumsfaktor
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FOXO4	Forkhead-Box-Protein O4
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GATA	GATA-bindendes Protein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HEPES	N'-2-Hydroxyethylpiperazin-2-ethan-sulfonsäure

HLA	Humanes Leukozytenantigen
HRP	Meerrettichperoxidase, englisch <i>horseradish peroxidase</i>
HSP	Hitzeschock-Proteine
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IRAK	IL-1-Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	IFN-regulatorischer Faktor
LC	Langerhans-Zellen
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
MACS	Magnetische Zellsortierung
mAk	Mausantikörper
MALP-2	Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid-2
MAPK	Mitogenaktivierte Proteinkinase
MDP	Muramyl Dipeptid
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MoDC	Monozyten-abgeleitete dendritische Zelle
MoLC	Monozyten-abgeleitete Langerhans-Zelle
MoMa	Monozyten-abgeleitete Makrophage
mRNS	<i>Messenger</i> Ribonukleinsäure
M-Tri _{DAP}	MurNAc-L-Ala-g-D-GlumDAP
MyD	Myeloides Differenzierungsprotein
N	Normalität
NF	Nuklearfaktor
NK-Zelle	Natürliche Killerzelle
Pam ₂	S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-Cys-Ser-(Lys) ₄
Pam ₃	N-palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)- Cys-Ser-(Lys) ₄
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBMC	Mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung

pDC	Plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PGLYRP	Extrazelluläres PGN-Erkennungsprotein
PolyI:C	Polyinosine-Polycytidylsäure
PolyU	Einzelsträngiges Polyuridin
proinf	Proinflammatorisch
PRR	Mustererkennungsrezeptor
R848	Resiquimod
RNS	Ribonukleinsäure
RORC2	Retinsäurerezeptor-verwandter Waisenrezeptor C 2
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i> Medium
RT	Raumtemperatur
<i>S. minnesota</i>	<i>Salmonella minnesota</i>
ss	Einzelsträngig
STAT	Signalübersetzer und Aktivator der Transkription
TANK	TRAF-Familienmitglied-assoziiertes NF κ B-Aktivator
T-bet	T-box exprimiert in T-Zellen
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β	Transformierender Wachstumsfaktor β
T _H	T-Helfer-Zelle
TIRAP	TIR-Domäne-enthaltendes Adapterprotein
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
TRAF	Tumornekrosisfaktor-Rezeptor-assoziiertes Faktor
TRAM	TRIF-verwandtes Adaptermolekül
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
TRIF	TIR-Domäne-enthaltendes Adapterprotein-induzierendes IFN- β
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
U	<i>Unit(s)</i> , Einheit für Enzymaktivität

1 Einleitung

Capias, tu modo tende plagas.
Du wirst sie fangen, spanne nur die Netze aus!
Ovid (1)

Die Immunologie ist die Lehre vom Schutz der Körperintegrität. Um diesen zu gewährleisten, verteilen sich die Zellen der Immunabwehr, die Leukozyten, im gesamten Körper. Daher bildet das Immunsystem ein großes und vielseitiges Netzwerk mit den lymphatischen Organen als Zentren. In der Peripherie übernehmen die Antigen präsentierenden Zellen (APC) die Aufgabe der Überwachung der Körpergrenzen (2). So durchziehen die dendritischen Zellen (DC), als wichtigste Vertreter der APC, mit ihren Zytoplasmaprotrusionen die Epithelien und das darunterliegende Stroma. Funktionell wie ein Stellnetz sammeln und bewerten sie stetig Antigene: Bei Aufnahme körpereigener Antigene vermitteln sie Toleranz, bei Aufnahme körperfremder leiten sie eine Immunantwort ein.

Im Fall einer Infektion oder Entzündung durchlaufen DC einen rapiden Wechsel ihres Funktionszustands (2). Bei diesem als Reifung bezeichneten Prozess verlieren sie ihre Wächterfunktion und erlangen immunmodulatorische Fähigkeiten. Über die Sekretion von Zytokinen, die Expression von Oberflächenmolekülen und die Antigenpräsentation orchestrieren sie die Immunantwort – vor allem durch die Induktion von T-Zellpopulationen. Lokal rekrutieren DC vornehmlich T-Gedächtniszellen zur Immunabwehr. Zentral in den Lymphknoten interagieren sie mit T- und B-Zellen und leiten so die adaptive Immunantwort ein. Daher werden DC selber zum Dreh- und Angelpunkt der Immunantwort. Sie können einerseits lokal unter Interaktion mit Fibrozyten, Makrophagen, Monozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zelle) die angeborene Immunabwehr aktivieren. Wegen ihrer Kapazitäten zur Antigenprozessierung und -präsentation können sie andererseits die adaptive Antwort mit antigenspezifischen T-Zellen und passgenauer Antikörperproduktion durch B-Zellen anstoßen. Deshalb sind DC Grenzgänger zwischen der humoralen und zellulären, der angeborenen und adaptiven, der lokalen und zentralen Immunabwehr. Mit ihren vielseitigen Eigenschaften sind sie wichtige Akteure bei Infektions-, Autoimmun- und Krebserkrankungen sowie Allergien und Transplantatabstoßungen (3). Trotzdem sind DC rare Zellen und kaum im Blut nachweisbar.

Vielleicht deshalb konnten DC erst 1973 durch Ralph Steinman und Zanvil Cohn entdeckt und als Immunzellen identifiziert werden (4). Dabei wies bereits 1868 an der Charité der Medizinstudent Paul Langerhans die erste Subpopulation der DC in der Epidermis nach (5), die später nach ihm benannten Langerhans-Zellen (LC). Damals wurden sie jedoch als Neurone verkannt. Ein Grund hierfür war sicherlich, dass die Interpretation der DC als Vermittler zwischen der Immunabwehr und der Peripherie ein tiefes Verständnis immunologischer Prozesse voraussetzt.

Wesentlich zum Verständnis der DC hat die Erforschung der Toll-like Rezeptoren (TLR) beigetragen. Die TLR wurden 1985 von der Forschungsgruppe um Christiane Nüsslein-Volhard entdeckt und 1997 durch Medzhitov, Preston-Hurlburt und Janeway als Teil der Immunabwehr definiert (6, 7). Im Verlauf zeigte sich, dass die Bindung von bakteriellen, viralen oder körpereigenen Produkten an die TLR zur Reifung der DC führt (8). Damit verfügt die immunologische Forschung über Rezeptoren, durch deren Blockierung und Stimulierung der Funktionszustand der DC moduliert werden kann. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der simultanen Stimulation unterschiedlicher TLR auf DC und der anschließenden Interaktion der DC mit naiven T-Zellen.

1.1 Ontogenese der dendritischen Zellen

Ubiquitär im menschlichen Körper vorkommend formen DC eine heterogene Gruppe von Leukozyten. Je nach Lokalisation weisen sie unterschiedliche spezifische Charakteristika auf (9, 10). So beeinflusst das umgebende Gewebe ihre Funktion und auch ihren Phänotyp. Dennoch ist ihnen allen das Knochenmark als Ursprungsort gemein. Dort entwickeln sie sich unter dem Einfluss von zwei Wachstumsfaktoren, Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) und fms-verwandter Tyrosinkinase-3-Ligand, aus Differenzierungskluster (CD)34⁺hämato-poetischen Stammzellen zu Vorläuferzellen. Bemerkenswert ist, dass die Differenzierung von DC-Populationen auf einem myeloiden und auf einem lymphoiden Weg erfolgen kann (10). Aus der Interleukin (IL)-7-Rezeptor positiven lymphoiden Reihe entstammen vornehmlich an lymphatisches Gewebe gebundene DC, die über die Expression von Fas Ligand eine regulatorische Wirkung auf ihr Umfeld ausüben. Die c-kit⁺myeloiden Vorläufer hingegen entwickeln sich zu migratorischen DC, die an den Grenzen des Körpers zur Umwelt ihre Wächterfunktion aufnehmen und nach

Antigenaufnahme primäre Immunantworten auslösen können. Unter migratorischen DC des *steady state* lassen sich LC der Epidermis und interstitielle DC voneinander abgrenzen. Denn LC exprimieren größere Mengen des Birbeck-Granula-assoziierten Moleküls Langerin als andere migratorische DC und lassen sich so anhand des Phänotyps von ihnen unterscheiden (11).

LC repräsentieren das klassische Modell für migratorische DC. Sie sammeln Antigene in ihrer Umgebung und migrieren dann mit diesen Antigeninformationen für das B- und T-Zell-System zu den Lymphknoten (12). Dort induzieren sie als tolerogene LC regulatorische T-Zellen (T_{reg}) und die Deletion bzw. Anergie (Inaktivität) von autoreaktiven T-Zellen. Dieser Prozess findet stetig in niedriger Frequenz statt (13). Denn LC können bis zu 18 Monate in der Haut verweilen, so dass der Eintritt direkter Vorläufer aus dem Blut in den LC-Pfad ein seltenes Ereignis darstellt. Dabei stellen zwei Typen von Blutkörperchen das Reservoir der LC und auch der interstitiellen DC: myeloide DC und unter inflammatorischen Bedingungen Monozyten (14).

Daher verwundert es nicht, dass aus $CD34^+$ Vorläufern und Monozyten unter Stimulation mit GM-CSF und bezüglich der Monozyten zusätzlich IL-4 verschiedene Subpopulationen der interstitiellen DC *in vitro* erzeugt werden können (15). LC betreffend erfolgt die Differenzierung entweder durch Stimulation der $CD34^+$ Vorläufer mit GM-CSF und Tumornekrosefaktor α (TNF- α) (12) oder der Monozyten mit GM-CSF, IL-4 und transformierendem Wachstumsfaktor β (TGF- β) (17). Die so generierten Monozyten-abgeleiteten dendritischen Zellen (MoDC) und Monozyten-abgeleiteten Langerhans-Zellen (MoLC) gelten als Modell für die vermehrte Rekrutierung von DC aus Monozyten unter inflammatorischen Bedingungen (14).

Denn Monozyten exprimieren schon in der frühen Phase der Hämatopoese TLR, Rezeptoren zur Erkennung mikrobieller und viraler Produkte (18). Die Stimulation der TLR kann zu einer Verschiebung des normalen Pfads der Monozyten-Differenzierung hin zu einer gesteigerten DC-Entwicklung führen.

Äquivalent wird die Konversion der plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) in ihre dendritische Form initiiert (19, 20). Diese auch als Interferon (IFN)-produzierende Zellen bekannte DC-Linie tritt im *steady state* als Vorstufe der konventionellen dendritischen Zellen (cDC) auf. So zirkulieren sie zunächst als runde, nicht dendritische und verhältnismäßig langlebige Vorläufer-Zellen im Blut, um nach der Stimulation durch Viren oder andere mikrobielle Infektionen eine dendritische Form aus-

zubilden, Antigen prozessierende und präsentierende Eigenschaften zu erlangen und große Mengen an Typ-1-IFN zu produzieren.

1.2 Verteilungsmuster und Morphologie

Als wichtiger Teil des Immunsystems kommen DC in nahezu allen Organen und Geweben des menschlichen Körpers vor. Dennoch sind sie so rar, dass sie selbst von einem Differentialblutbild nicht erfasst werden. Ihr Anteil an den Leukozyten im Blut beträgt nicht mehr als 0,2%, wobei die Gruppe der pDC die größte Fraktion stellt. Aber auch die Vorläufer der häufig organspezifischen DC gelangen über dieses Transportsystem zu ihren Zielorganen, in denen sie ihren Funktionen nachgehen.

Migratorische DC bevölkern insbesondere jene Orte, an denen das Organsystem Mensch Kontakt zur Umwelt hat, also in allen mit Epithel verkleideten Organen. Dort durchziehen sie mit ihren baumartigen Zytoplasmaprotrusionen das Gewebe und nehmen wie ein großes Netz Antigene auf, um via Lymphe zu den Lymphknoten zu migrieren und hier die gesammelten Informationen an ihrer Oberfläche den Lymphozyten zu präsentieren (21). Hier präsentieren sie die Antigene neben den B-Zellen auch den T-Zellen, fungieren regulierend oder geben die Antigene an Lymphknoten-residierende $CD8^+cDC$ für die Präsentation weiter (10).

Im Respirationstrakt sind DC permanent Luftkeimen ausgesetzt, welche die Barriere überwinden können (22). Um diese Aufgabe zu bewältigen, zeichnen sie sich hier durch eine hohe Endozytose-Aktivität aus und operieren intraepithelial. In der Lamina propria liegende DC sind Ausdruck der Zellwanderung in das und aus dem Epithel. Im Gastrointestinaltrakt hingegen sind DC nicht im Epithel, sondern nur in der Lamina propria lokalisiert (23). Hier sitzen sie und ragen mit Ausläufern transepithelial bis in das Lumen hinein, wo sie unentwegt die gastrointestinale Flora überwachen.

Als Modell für die Verteilung der DC in mit mehrschichtigem Plattenepithel ausgestatteten Organen kann die Haut dienen (Abb. 1). Die Kutis gliedert sich in Epidermis und Dermis. In der Dermis befinden sich interstitielle dermale DC und in der Epidermis LC, die im Stratum spinosum liegen und mit ihren Ausläufern die Epidermis durchspannen können (24, 25). Sie kommunizieren über Zell-Zell-Kontakte mit den sie direkt umgebenden und über ihre Ausläufer auch mit weiter entfernten Keratinozyten. So bilden sie mit Hilfe der Phagozytose und Makropinozytose eine funktionelle Barriere zur Überwachung der Haut.

Letztlich sind sie sogar in immunprivilegierten Regionen, wie dem Zentralnervensystem und der vorderen Augenkammer zu finden, in Geweben, die nicht regenerativ sind und in denen Lymphdrainage sowie Haupthistokompatibilitätskomplex (MHC)-I/II-Moleküle fehlen (26, 27). Dennoch zeigte sich für die vordere Augenkammer, dass MHC-freie interstitielle DC und LC, die im physiologischen Status tolerogen wirken, bei entzündlichen Prozessen MHC-II auf ihrer Oberfläche exprimieren und so sogar eine Transplantatabstoßung bewirken können (27).

Die lymphatischen Organe Thymus und Milz weisen nahezu ausschließlich an lymphatisches Gewebe gebundene DC auf (28). Diese großen lymphatischen Organe sind in die Blutbahn und nicht in die Lymphbahn geschaltet, so dass sie keine mit der Lymphe drainierten migratorischen DC enthalten können. In den Lymphknoten hingegen kommen beide Populationen vor.

Im primär lymphatischen Thymus kontrollieren DC die negative Selektion, das heißt sie induzieren die Apoptose von potentiell autoreaktiven T-Zellen (29). Und in den sekundär lymphatischen Organen Milz, Lymphknoten und Peyer'schen Plaques interagieren DC sowohl mit B- als auch mit T-Lymphozyten (30, 31). So benötigen B-Zellen der Marginalzone zur Immunglobulin (Ig)M-Produktion in der ersten Phase der Immunreaktion die Stimulation durch und Interaktion mit DC (30). In den B-Zell-Zonen sind auch follikuläre DC, die weder MHC-II-Proteine exprimieren noch den Leukozyten angehören, ansässig. Desweiteren unterscheidet man drei Subtypen interdigitierender DC in den T-Zell-Zonen: lymphoide $CD8^+$, myeloide $CD11^+$ und $CD8^-CD11^-$ DC (31). Darüber hinaus werden die Lymphknoten, die die Lymphe drainieren, stark von myeloiden DC frequentiert.

1.3 Aufnahme und Prozessierung von Antigenen

In der Peripherie überwachen migratorische DC in einem unreifen Zustand die Umgebung (32). In diesem Status sind sie zwar nicht fähig T-Zellen zu stimulieren, verfügen jedoch über außergewöhnliche Kapazitäten, Antigene zu sammeln. Stetig durchsuchen sie die extrazelluläre Flüssigkeit durch Makropinozytose und exprimieren eine Reihe von Rezeptoren, die Endozytose und Phagozytose von Antigenen und Pathogenen vermitteln. So nehmen sie durch die Makropinozytose 40% ihres eigenen Volumens pro Stunde auf, um ihre Umwelt zu kontrollieren. Darüber hinaus können sie Mikroben und Partikel phagozytieren und Rezeptor vermittelt Antigene

durch Endozytose aufnehmen (33, 34). Zu diesen Rezeptoren zählen die C-Typ-Lektin-Rezeptoren wie der Makrophagen-Mannose-Rezeptor und CD205 sowie kristallisierbares Fragment (Fc) γ - und ϵ -Rezeptoren. LC zeichnen sich durch die Expression von Langerin aus. Das Zusammenspiel dieser unterschiedlichen Mechanismen führt dazu, dass DC die effizientesten APC sind. Daher reichen Antigenkonzentrationen im piko- und nanomolaren Bereich aus, um eine ausreichende Präsentation zu ermöglichen.

Nachdem die Antigene internalisiert wurden, werden sie zwecks der Präsentation in Peptidfragmente zerlegt und auf MHC-II- und MHC-I-Moleküle geladen (35). Dazu produzieren DC an einem Punkt ihrer Lebensspanne große Mengen MHC-II, die sich in MHC-II reichen Kompartimenten in der Zelle organisieren. Diese sind spät endosomale Strukturen, die MHC-II-DMA-Produkte enthalten, welche die Bindung der Antigenpeptide an die MHC-II-Moleküle katalysieren. Während der Reifung zerfallen diese Strukturen zu nicht-lysosomalen Vesikeln, welche die MHC-II-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche transportieren.

Um aber zytotoxische T-Zellen zu generieren, die es vermögen, infizierte Zellen, Transplantate und Tumorzellen zu eliminieren, müssen sie CD8⁺T-Zellen einen MHC-I-Peptid-Komplex präsentieren (35). Hierzu werden in den Proteasomen Proteine zu Peptiden degradiert und anschließend von einem Transporter aus dem Zytosol zum endoplasmatischen Retikulum befördert, wo sie an MHC-I binden. Schließlich wird der Komplex zur Präsentation an die Zelloberfläche transportiert.

1.4 Reifung der dendritischen Zellen

Nun können DC über diese Mechanismen sowohl Selbstantigene als auch Fremdantigene aufnehmen. Im *steady state* internalisieren DC Selbstantigene und vermitteln Toleranz über deren Präsentation an CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen (36). Sie induzieren, wenn T-Zellen auf das präsentierte Antigen reagieren, deren Apoptose, Anergie oder Differenzierung zu T_{reg}. Während dieses Prozesses gelten sie vom Phänotyp als unreif.

Wenn DC aber einer Entzündung oder Infektion ausgesetzt sind, so setzt ihre Reifung ein, die zur Migration der DC aus der Peripherie in die Lymphknoten, dem Ort der Antigenpräsentation, führt (35, 37). Diese Reifung bringt einen rapiden Wandel von Morphologie, Phänotyp und Funktion mit sich. So bilden sie

charakteristische Zytoplasmaprotrusionen aus, exprimieren Oberflächenmarker (CD40/CD54/CD80/CD83/CD86), durch die sie sich von unreifen DC unterscheiden, und produzieren bestimmte Zytokine. Unmittelbar nach dem Reifungssignal nimmt die Fähigkeit zur Antigenaufnahme und Antigenprozessierung vorübergehend zu, danach erfolgt ein schlagartiger Verlust dieser Funktion (38). Deshalb verlieren DC ihre Wächterfunktion und nehmen ihre Funktion als Antigen präsentierende, immunstimulatorische Zellen auf.

Um eine hinreichende Immunreaktion hervorzurufen, migrieren DC über die Lymphbahnen zu den regionalen Lymphknoten und über das Blut zu den sekundär lymphatischen Organen (39). Hierbei folgen sie Chemokinen via CC-Motiv-Chemokinrezeptor (CCR)7, der bei dem Prozess der Reifung auf der Zelloberfläche hoch reguliert wird, zu den regionalen Lymphknoten.

1.5 Die Gefahrenhypothese

Die Gefahrenhypothese von Matzinger postuliert, dass die Reifung der DC nicht allein durch die Aufnahme von Antigenen bzw. Pathogenen induziert werden könne (40). Es müsse noch ein endogenes oder exogenes Gefahrensignal vorhanden sein. Endogene Faktoren sind beispielsweise die Moleküle TNF- α , IL-1 β und CD40-Ligand (CD40L), die vom Gewebe bei Stress, Verletzung und Nekrose freigesetzt werden. Exogene Faktoren sind die Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMP), die von den Mustererkennungsrezeptoren (PRR) erkannt und gebunden werden. Dabei handelt es sich um evolutionär konservierte Rezeptoren, zu denen unter anderem die C-Typ-Lektin-Rezeptoren und die TLR zählen (41). So besitzen Viren, Bakterien, Pilze, Protozoen und möglicherweise Zellen von Metazoen ein breites Spektrum an Molekülsignaturen, von Proteinen bis hin zu Nukleinsäuren, die als Liganden für einen oder mehrere TLR dienen können (8). Zudem werden nach und nach endogene Liganden der TLR identifiziert. Die Bindung der TLR von Zellen der angeborenen Immunabwehr, wie Makrophagen und neutrophilen Granulozyten, resultiert in Inflammation und der Aktivierung antimikrobieller Effektorpfade. In APC, wie den DC, stößt sie eine Reifung und darüber hinaus eine T-Zell-Aktivierung an, die vor allem in Expressionsanalysen kostimulatorischer Moleküle und T-Zell-Zytokinen nachweisbar sind.

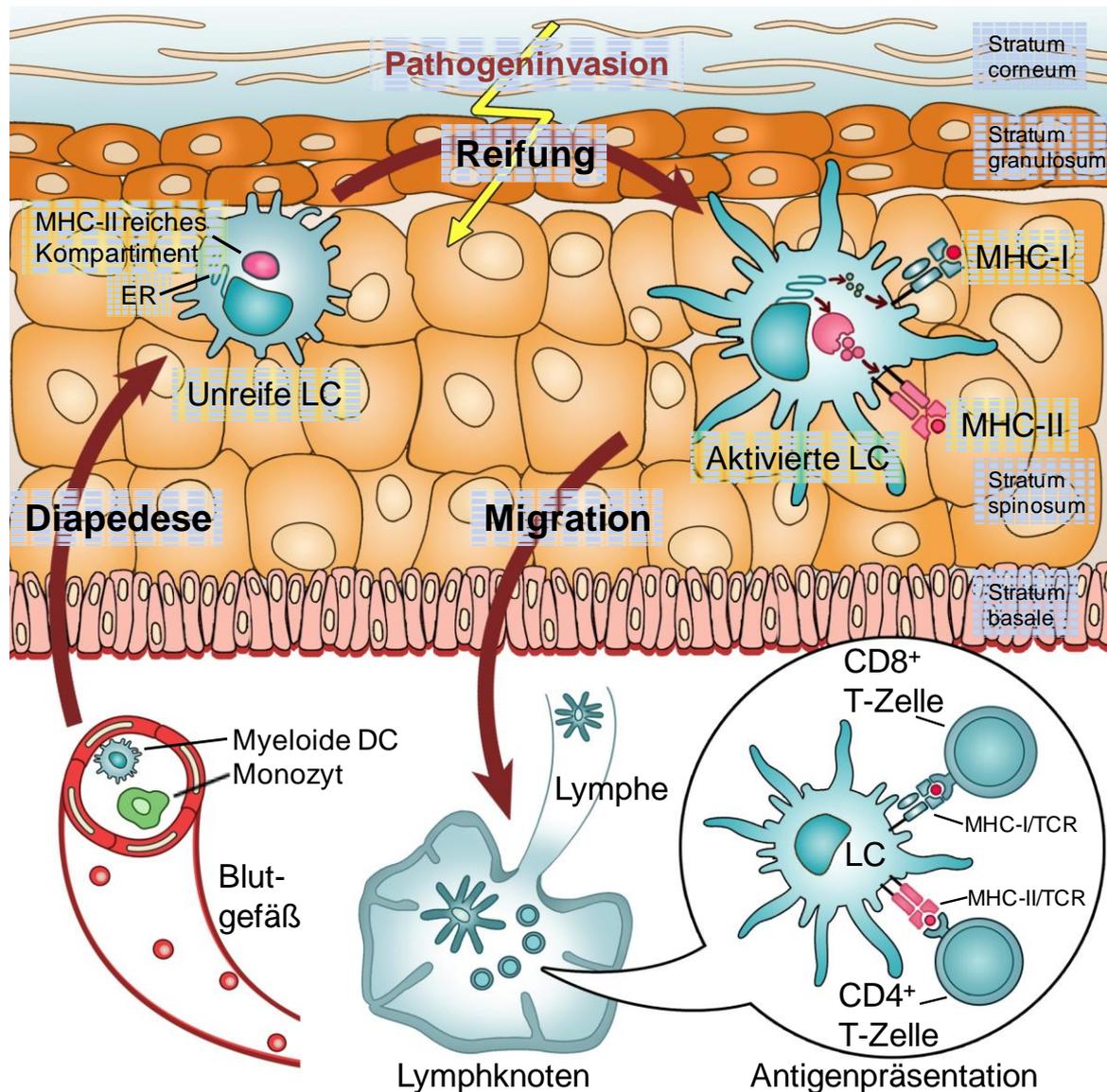


Abb. 1: Lebenszyklus der LC, adaptiert nach Palucka et al. und Nestle et al. (14, 42). LC entwickeln sich aus myeloiden DC und bei Inflammation aus Monozyten, die durch Diapedese aus Kapillaren in die Epidermis einwandern. Im Stratum spinosum überwachen LC in einem unreifen Zustand die Umgebung und sammeln stetig Antigene. Sobald LC einer Pathogeninvasion ausgesetzt sind, setzt ihre Reifung ein. Die LC bilden Zytoplasmaprüktusionen aus, exprimieren Oberflächenmarker und sezernieren bestimmte Zytokine. Unmittelbar nach dem Reifungssignal nimmt die Fähigkeit zur Antigenaufnahme und -prozessierung zu, danach erfolgt ein abrupter Verlust dieser Funktion. Internalisierte Antigene werden zwecks der Präsentation in Peptidfragmente zerlegt und auf MHC-II- und MHC-I-Moleküle geladen. An MHC-I binden degradierte Peptide am endoplasmatischen Retikulum (ER) und werden dann an die Zelloberfläche befördert (grün). MHC-II hingegen ist in spät endosomalen, MHC-II reichen Kompartimenten organisiert (rosa). Bei der Reifung zerfallen diese Strukturen zu nicht-lysosomalen Vesikeln, die die MHC-II-Peptid-Komplexe an die Zelloberfläche transportieren. Via Lymphe migrieren LC zu den Lymphknoten und präsentieren die MHC-I- und MHC-II-Peptid-Komplexe CD8⁺-T-Zellen bzw. CD4⁺-T-Zellen. Bei Erkennung des individuellen Antigenepitops durch den TCR erfolgt eine klonale Expansion der spezifischen T-Zellen, die Differenzierung in Effektorzellen und eine langfristige Steigerung der Vorläuferzellichte.

1.6 Toll-like Rezeptoren

Bisher konnten 10 TLR (TLR1-10) in Menschen und 12 TLR (TLR1-9, 11-13) in Mäusen identifiziert werden (43, Tabelle 1). Die TLR sind Typ-1-Transmembran-Glykoprotein-Rezeptoren, deren extrazelluläre Domäne 19-25 aufeinanderfolgende Leucin-reiche Wiederholungssequenzen enthält (44). Von diesen ist jedes 24-29 Aminosäuren lang und sie sind in die Ligandenbindung involviert. Der intrazelluläre Schwanz enthält eine hochgradig konservierte Region, den Toll-IL-1-Rezeptor (TIR), der die Interaktionen zwischen den TLR und den *downstream signaling* Molekülen vermittelt. Der TLR3 ist intrazellulär, die TLR7-9 sind intrazellulär auf endosomalen Kompartimenten und die TLR1, 2, 4-6 und 10 sind auf der Zelloberfläche lokalisiert (43). Von den erregerklassenspezifischen Liganden sind unter anderem folgende identifiziert: Peptidoglykan (PGN), Lipoteichonsäure und Hitzeschock-Proteine (HSP)60, 70, 96 werden von TLR2, Polyinosine-Polycytidylsäure (PolyI:C) und doppelsträngige Ribonukleinsäure (dsRNS) von TLR3, Lipopolysaccharid (LPS) gramnegativer Bakterien und HSP22, 60, 70, 96 von TLR4, Flagellin von TLR5, Resiquimod (R848) und Guanodin-reiche, einzelsträngige (ss)RNS von TLR7 und TLR8, im Speziellen einzelsträngiges Polyuridin (PolyU) von TLR8, unmethylierte Desoxyribonukleinsäure (DNS) aus Bakterien und CpG-Oligonukleotide von TLR9 und DNS aus uropathogenen Bakterien von TLR11 gebunden (8, 45, 46, 47, 48, 49, 50). Zur Erkennung bakterieller Triacyllipoproteine und des synthetischen Analogon N-pamitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-Cys-Ser-(Lys)₄ (Pam₃) kooperiert TLR2 mit dem strukturell ähnlichen TLR1 und das Diacyllipoprotein Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid-2 (MALP-2) aus *Mycoplasma fermentans* und das synthetische S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-Cys-Ser-(Lys)₄ (Pam₂) werden von Dimeren aus TLR2 und TLR6 erkannt (51, 52, 53). Der Ligand für TLR10 ist zurzeit noch unbekannt.

Neben der Spezifität für bestimmte Liganden unterscheidet die TLR auch die Aktivierung bestimmter Signaltransduktionspfade (54, 55). TLR1, 2, 5-9 sind zur Aktivierung der *downstream signaling* Moleküle an myeloides Differenzierungsprotein (MyD)88 gekoppelt, wobei der TLR2 zudem TIR-Domäne-enthaltendes Adapterprotein (TIRAP) als Sortierungsadapter zur Lokalisation des MyD88 an der Plasmamembran benötigt. MyD88 induziert über IL-1-Rezeptor-assozierte Kinase (IRAK)1, 2 und 4 und Tumornekrosisfaktor-Rezeptor-assozierten Faktor (TRAF)6 die Translokierung

von Nuklearfaktor (NF) κ B und Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinase (MAPK) und damit des Transkriptionsfaktors Aktivatorprotein 1 (AP-1) und leitet somit eine proinflammatorische Antwort ein. Der TLR3 ist an TIR-Domäne-enthaltendes Adapterprotein-induzierendes IFN- β (TRIF, Alternativname TICAM1) gekoppelt. TRIF induziert über TANK-bindende Kinase 1, κ B Kinase (IKK) ϵ die Aktivierung von IFN-regulatorischem Faktor (IRF)3 und leitet so die Typ-1-IFN-Produktion ein, die von IFN- β dominiert wird. Der TLR4 aktiviert sowohl MyD88 als auch TRIF (54). Neben TIRAP für MyD88 benötigt er TRIF-verwandtes Adaptermolekül (TRAM) als Sortierungsadapter für TRIF. Noch an der Plasmamembran initiiert der TLR4 mit Hilfe des TIRAP-MyD88-Komplexes den proinflammatorischen Signalpfad. Nach der Internalisierung des Rezeptorkomplexes realisiert TRAM die Translokation zum Endosom, wo die Typ-1-IFN-Antwort über TRAF3 initiiert wird. Die endosomalen TLR 7-9, die lysosomal degradierte DNS und RNS binden, können im Gegensatz zu dem membrangebundenen TLR2 eine Typ-1-IFN-Antwort, die durch die Produktion von IFN- α dominiert wird, induzieren (55). Denn nur hier kann MyD88 mit dem intrazellulär lokalisierten TRAF3 interagieren und über IRAK und IKK α IRF7 aktivieren.

Das TLR-Profil der DC unterscheidet sich je nach Subtyp. MoDC und MoLC werden generell als Äquivalente der LC und dermalen DC angesehen (56). Beide Zelltypen weisen den Phänotyp unreifer DC mit der Expression von humanem Leukozytenantigen (HLA)-DR, das Teil des MHC-II ist, und von geringen Mengen CD86 auf. Trotzdem können MoLC von MoDC anhand der Expression von E-Cadherin und Langerin unterschieden werden. Das TLR-Profil der MoDC und MoLC entspricht weitestgehend dem der in vivo anzutreffenden dermalen DC und LC. Sie exprimieren prinzipiell alle 10 TLR, im besonderen Maße jedoch TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6 und TLR7 (56, 57). TLR5, TLR8, TLR9 und TLR10 werden weniger stark exprimiert. Von pDC werden nur TLR1, TLR6, TLR7, TLR9 und TLR10 exprimiert, wobei sie TLR7 und TLR9 besonders stark exprimieren (57, 58, 59).

Rezeptor	Lokalisation	Liganden	Adapterproteine	Signaltransduktion	Effekt
TLR1/2	Plasma-membran	Triacyllipoproteine, Pam ₃	MyD88/TIRAP	TRAF6, NFκB, AP-1	proinf
TLR2	Plasma-membran	Lipoteichonsäure, PGN, HSP60, 70, 96	MyD88/TIRAP	TRAF6, NFκB, AP-1	proinf
TLR2/6	Plasma-membran	Diacyllipoproteine Pam ₂ , MALP-2	MyD88/TIRAP	TRAF6, NFκB, AP-1	proinf
TLR3	endosomale Kompartimente	dsRNS, PolyI:C	TRIF	TRAF3, IRF3, NFκB	IFN-β, proinf
TLR4	Plasma-membran	LPS, HSP22, 60, 70, 96	MyD88/TIRAP TRIF/TRAM	TRAF6, NFκB, AP-1 TRAF3, IRF3	IFN-β, proinf
TLR5	Plasma-membran	Flagellin	MyD88	TRAF6, NFκB, AP-1	proinf
TLR7	endosomale Kompartimente	ssRNS, R848	MyD88	TRAF6, NFκB, AP-1 TRAF3, IRF7	IFN-α, proinf
TLR8	endosomale Kompartimente	ssRNS, R848, PolyU	MyD88	TRAF6, NFκB, AP-1 TRAF3, IRF7	IFN-α, proinf
TLR9	endosomale Kompartimente	unmethylierte DNS, CpG-Oligonukleotide	MyD88	TRAF6, NFκB, AP-1 TRAF3, IRF7	IFN-α, proinf
TLR10	Plasma-membran	unbekannt	unbekannt	unbekannt	unbekannt

Tabelle 1: Die unterschiedlichen Qualitäten der bekannten humanen TLR. Proinflammatorisch (proinf), andere Abkürzungen siehe Text.

1.7 Interaktion mit Lymphozyten

DC können die Expansion und Differenzierung von Lymphozyten der erworbenen und angeborenen Immunabwehr auslösen (60). In der frühen Phase der Immunantwort des angeborenen Systems stehen sie im Dialog mit NK-Zellen, zytotoxischen T-Zellen und neutrophilen Granulozyten.

NK-Zellen induzieren die Apoptose Pathogen infizierter Zellen und von Tumorzellen (61). So können sie einerseits über den natürlichen zytotoxischen Rezeptor 3 die Apoptose von DC, die nicht in der Lage sind, den Reifungsschritt abschließend zu vollziehen, einleiten oder deren Reifung durch die Produktion von TNF-α und IFN-γ stimulieren. Andererseits können DC die NK-Zellen durch die Freisetzung diverser Zytokine beeinflussen, wie IL-2, IL-12, IL-18, IL-15 und Typ-1-IFN. In ähnlicher Weise interagieren DC über CD1 und CD40 mit zytotoxischen T-Zellen, über CD1 und TNF-α mit den γ/δ-T-Zellen und über CD209 (Alternativname DC-spezifisches, inter-

zelluläres Adhäsionsmolekül (ICAM)3-aufgreifendes Nicht-Integrin (DC-SIGN)) mit neutrophilen Granulozyten (60, 61, 62). In allen Fällen resultiert dies in der Expansion und Differenzierung der Populationen und in der Reifung der DC.

Auf dem Feld der erworbenen Abwehr ist die Wirkung auf T-Zellen der bedeutendste Mechanismus, mit dem DC eine zielgerichtete, adaptive Antwort induzieren können (Abb. 2). Trotzdem können sie auch naive B-Zellen ohne den Umweg über T-Zellen aktivieren und deren Proliferation und Isotypenwechsel initiieren; dies stellt aber eher die Ausnahme als die Regel dar (63, 64). Denn der wichtigste Ansprechpartner im immunologischen Dialog ist die naive T-Zelle (65). Daher befinden sich DC und T-Zellen in einem ständigen Austausch – in der Peripherie und in den T-Zell-Zonen der lymphatischen Organe. Kanal dieser Kommunikation ist die immunologische Synapse: eine Bindung, die beide Zellen ausbilden, um Interaktionen zwischen den präsentierten MHC-Peptid-Komplexen und dem T-Zell-Rezeptor (TCR) zu ermöglichen. Dieser Prozess ist essentiell, um T-Zellen mit einem gegen das Antigen-epitop hochaffinen TCR unter den Milliarden unterschiedlicher Lymphozyten zu finden. Wenn eine hinreichende Kompatibilität mit dem zufällig arrangierten Antigenrezeptor besteht, dann wird dies als *priming*, Erstkontakt mit einem Antigen, bezeichnet.

Die Erkennung von MHC-Peptid-Komplexen durch TCR wird in der Signalterminologie als Signal 1 bezeichnet (38). Wenn dieses Signal allein auftritt, führt es zur Inaktivierung der naiven T-Zellen durch Anergie, Deletion oder die Determination in Richtung von T_{reg} , womit Toleranz induziert wird. Tritt nun das Signal 2, die Kostimulation, hinzu, so vermitteln die beiden Signale gemeinsam Immunität: Es folgt eine klonale Expansion, die Differenzierung in Effektorzellen und eine langfristige Steigerung der Vorläuferzell-dichte, also der Ausbildung eines immunologischen Gedächtnisses. Das Signal 2 beruht auf einer feinen Balance stimulierender und inhibierender Signale. Hervorzuheben ist dabei die Interaktion von CD28 der T-Zellen mit CD80 und CD86 der DC. Die Polarisierung naiver T-Zellen in $CD4^+$ T-Helferzellen (T_H) oder in $CD8^+$ zytotoxische T-Zellen wird durch das Signal 3 gesteuert, das zumeist über Zytokine oder auch direkte Zell-Zell-Kontakte vermittelt wird.

1.8 Die unterschiedlichen Populationen der CD4⁺T-Zellen

Wenn CD4⁺T-Zellen den Thymus verlassen, unterscheidet man die bereits differenzierten Populationen, wie natürliche T_{reg}, zytotoxische T-Zellen und naive CD4⁺T-Zellen, die in der Peripherie im Rahmen immunologischer Prozesse differenzieren (66). Naive CD4⁺T-Zellen differenzieren zu T_H-Populationen, die unterschiedliche Zytokine sezernieren.

Als das ursprüngliche Konzept der T_H-Zellen 1986 etabliert wurde, unterschied man nur zwischen T_H1 und T_H2 (67). Inzwischen wird die Existenz weiterer T_H-Subpopulationen, den induzierten T_{reg}, T_H9, T_H17 und T_H22 angenommen, die alle über spezifische Transkriptionsfaktoren verfügen, welche die Expression der Oberflächmoleküle, wie der Chemokinrezeptoren, und löslicher Faktoren, den Zytokinen, regulieren (66, 68, 69). Sie wirken auf B-Lymphozyten und CD8⁺zytotoxische Zellen und aktivieren die Zellen der angeborenen Immunabwehr. Nach Pathogenkontakt wird eine spezifische T-Zell-Antwort ausgelöst, die einzelne T-Zell-Populationen dominieren. An inflammatorischen Erkrankungen der Haut sind vor allem die T_H1, T_H2, T_H17 und die jüngst beschriebenen T_H22 beteiligt (70, 71).

1.8.1 Die CD4⁺T_H1-Zellen

Die T_H1-Zelldifferenzierung wird von den linienspezifischen Transkriptionsfaktoren T-box exprimiert in T-Zellen (T-bet) sowie Signalübersetzer und Aktivator der Transkription (STAT)4 gesteuert, welche die Zytokingene aktivieren (66). Die T_H1 sezernieren IFN- γ , Lymphotoxin α und IL-2 (72). Diese ausgewählte Zytokinproduktion ermöglicht es den T_H1, intrazelluläre Pathogene, wie Mykoplasmen und Viren, und Pilze zu eliminieren. Darüber hinaus sind sie auch an Autoimmunerkrankungen beteiligt, wie z. B. der Multiplen Sklerose, bei der Lymphotoxin α als Progressionsmarker dient. Zielzellen des sezernierten IFN- γ sind Makrophagen, deren bakterizide Funktion aktiviert wird, und DC, die in einem Regelkreis zur weiteren Sekretion von IL-12 angeregt werden. Die TCR-Bindung durch DC veranlasst die Expression des IL-12R β 2, der mit der β 1-Untereinheit den IL-12-Rezeptor bildet. IL-12 wiederum induziert in den aktivierten T-Zellen über den Transkriptionsfaktor STAT4 die IFN- γ -Expression und verstärkt so die T_H1-Antwort. Dennoch können IL-12 und STAT4 über die Aktivierung von NF κ B auch unabhängig von einer Stimulation des TCR die

Produktion von IFN- γ induzieren. Die Chemokinrezeptoren CXC-Motiv-Chemokinrezeptor (CXCR)3 und CCR5 werden besonders auf T_H1-Zellen exprimiert.

1.8.2 Die CD4⁺T_H2-Zellen

Während der Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H2, wird durch STAT6 der spezifische Transkriptionsfaktor GATA-bindendes Protein (GATA)3 induziert (73). Die GATA3-Expression wird durch IL-4, STAT6 und durch die TCR-Aktivierung in Verbindung mit IL-2 und STAT5 hoch reguliert. GATA3 hält über die Induktion von IL-5 und IL-13 die T_H2-Antwort aufrecht und reguliert die Expression der Zytokinrezeptoren IL-4R α , IL-2R α und IL-33R α hoch (72).

Die T_H2 sezernieren spezifisch IL-4, IL-5 und IL-13 und darüber hinaus IL-9, IL-10, IL-25 und Amphiregulin (72, 73). Mit diesem Tableau an Zytokinen vermitteln sie die Immunabwehr extrazellulärer Parasiten und beteiligen sich an der Entstehung und Aufrechterhaltung von Asthma, atopischer Dermatitis und anderen allergischen Reaktionen. IL-4 wirkt autokrin stabilisierend auf die T_H2-Antwort und führt zur IgE-Produktion durch B-Zellen. IgE bindet an den hochaffinen IgE-Rezeptor Fc ϵ RI auf basophilen Granulozyten und Mastzellen; bei Kontakt mit multivalenten Liganden erfolgt die Querverbindung von Fc ϵ RI und es werden Histamin, Serotonin und Zytokine wie IL-4, IL-13 und TNF- α sezerniert. Bei allergischen Erkrankungen induziert IL-9 die Muzin-Produktion in Epithelzellen, IL-13 die Hyperreagibilität und Amphiregulin als epidermaler Wachstumsfaktor die epitheliale Hyperplasie. IL-5 und IL-25 bewirken die vermehrte Rekrutierung von eosinophilen Granulozyten. IL-25, das auch von Lungenepithelien bei Allergenexposition sezerniert wird, reguliert über den IL-17-Rezeptor B auf T_H2 die Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13 hoch. Die Chemokinrezeptoren CCR3, CCR4, CCR8 und Chemoattraktansrezeptor-homologes Molekül exprimiert auf T_H2 gelten als T_H2-spezifische Oberflächenmoleküle.

1.8.3 Die CD4⁺T_H17-Zellen

T_H17-Zellen sind durch die Expression der Oberflächenmoleküle CCR6, IL-23-Rezeptor, IL-12-Rezeptor B2 und CD161 charakterisiert (72). Sie differenzieren sich aus naiven T-Zellen unter dem Einfluss von TCR und kostimulatorischen Signalen (74). IL-6 und IL-1 β liefern hierbei das Signal 3, das die Differenzierung zu T_H17-

Zellen determiniert. Dadurch wird der Transkriptionsfaktor STAT3 aktiviert, was zur Expression von IL-21 führt. Gleichzeitig kann TGF- β die Expression von T-bet und so die Polarisierung von T_H1 unterdrücken, wodurch die T_H17-Differenzierung indirekt gefördert wird. IL-21 wiederum stabilisiert die T_H17-Antwort auf autokrinem Weg über STAT3 und Retinsäurerezeptor-verwandtem Waisenrezeptor C 2 (RORC2) (75, 76). RORC2 gilt als der linienspezifische Transkriptionsregulator der T_H17. Zusammen mit STAT3 reguliert er die T_H17-Transkriptionsprogramme hoch. Hierzu zählt auch die Expression von IL-23-Rezeptor und IL-1-Rezeptor 1. Über diese können IL-23 und IL-1 β , die beide von APC sezerniert werden, die T_H17-Antwort aufrechterhalten und die IL-17-Produktion in CD4⁺T-Gedächtniszellen induzieren (77).

Die T_H17 sezernieren IL-17, IL-17F, IL-21, IL-22 und CC-Motiv-Chemokinligand (CCL)20 (75). Sie gelten als proinflammatorisch und rekrutieren neutrophile Granulozyten sowie Makrophagen zu infiziertem Gewebe. Damit nehmen sie eine Schlüsselposition in autoimmun vermittelten und entzündlichen Erkrankungen ein. IL-17 und IL-17F regulieren die Expression von Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsmolekülen in Atemwegsepithel, Gefäßendothel und Fibroblasten. Sie sind mit rheumatoider Arthritis, Asthma, systemischem Lupus erythematodes, experimenteller Autoimmunenzephalomyelitis, allergischer Kontaktdermatitis, atopischer Dermatitis, Psoriasis und Allograft-Abstoßungen assoziiert (78, 79, 42, 71). IL-22 aktiviert STAT3 und induziert so die Expression antimikrobieller Peptide (42, 80). Zudem vermittelt es IL-23 induzierte Akanthose sowie dermale und zervikale Entzündungen über STAT3. In Verbindung mit IL-17 oder IL-17F wirkt IL-22 synergistisch auf die Expression von β -Defensinen und S100 Calcium-bindenden Proteinen in Epithelzellen und subepithelialen Myofibroblasten. IL-22 wirkt protektiv gegen bakterielle Infektionen der Lunge, des Darms und der Haut. IL-21 ist ein potenter Regulator der Proliferation von CD8⁺T-Zellen (75, 76). Zudem reguliert IL-21 die Differenzierung von CD4⁺T-Zellen zu T_H17 auf autokrinem Weg. CCL20 wirkt chemotaktisch und führt zu einer Invasion von Zellen der Immunabwehr in entzündetes Gewebe.

1.8.4 Die CD4⁺T_H22-Zellen

Neben den oben beschriebenen etablierten T_H-Zelllinien wird die Existenz weiterer Subpopulationen diskutiert. Die T_H22 wurden 2009 von zwei unabhängigen Gruppen vorgeschlagen (80, 81). Es handelt sich um eine T_H-Zellpopulation, die IL-22, aber

kein IL-17 oder IFN- γ produziert und weder RORC2 noch T-bet, aber Forkhead-Box-Protein O4 (FOXO4) und Zinkfingerprotein Basonuklein 2 (BNC2) exprimiert, wodurch sie von T_H1 und T_H17 abgegrenzt werden kann. Darüber hinaus exprimieren T_H22 die spezifischen Oberflächenmoleküle kutanes Lymphozyten-assoziiertes Antigen, CCR4, CCR6 und CCR10 und zeigen einen stabilen Phänotyp. Ihre Differenzierung aus naiven T-Zellen wird durch IL-6 und TNF- α initiiert. Im Weiteren fördern IL-6 und IL-23 die Differenzierung humaner T_H22, während TGF- β sie hemmt. Allerdings fördert IL-1 β in Verbindung mit IL-6 und TNF- α die Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H17, die IL-17 und IL-22 produzieren. Insgesamt ist die T_H22/T_H17-Balance komplex und speziesspezifisch reguliert.

Die T_H22 sezernieren Fibroblastenwachstumsfaktor (FGF)1 und 5, CCL7, CCL15 und IL-22 (70). Die FGF1 und 5 regen unter anderem Endothelzellen zur Proliferation an und partizipieren in unterschiedlichen Stadien der Entwicklung und Morphogenese sowie in der Angiogenese und Wundheilung. Auch CCL7 ist an der Wundheilung und Gewebsumgestaltung beteiligt und kann in fibrotischem Gewebe nachgewiesen werden. Zudem wirkt CCL15 chemotaktisch auf die Migration und Differenzierung von Endothelzellen und vermittelt so Angiogenese. IL-22 ist ein Zytokin der IL-10-Familie, das auch von T_H17 und den NK-Zellen 22 sezerniert wird (80). Es wirkt vornehmlich auf Gewebe an den Körpergrenzflächen, wie den Epithelzellen des Gastrointestinaltrakts oder des Respirationstrakts und den Keratinozyten der Haut. Dort führt IL-22 zur Produktion von antimikrobiellen Peptiden und zur Expression von Genen, die die zelluläre Differenzierung und Apoptose regulieren. So aktivieren IL-22 und TNF- α die Keratinozyten der Haut, so dass diese Chemokine und Zytokine, die weitere T-Zellen rekrutieren und aktivieren, freisetzen (70). Im Speziellen sezernieren die aktivierten Keratinozyten IL-32, das wiederum die Produktion von TNF- α durch Zellen der Immunabwehr fördert. Außerdem induziert IL-22 in Keratinozyten promigratorische Gene und fördert so die Wundheilung. Es können aber auch hohe Konzentrationen von IL-22 ebenso wie unterschiedliche FGF im hyperplastischen Epithel bei Psoriasis nachgewiesen werden (42). Über die genaue Rolle von IL-22 bei anderen Hauterkrankungen wie atopischen Ekzemen und allergischer Kontaktdermatitis ist wenig bekannt.

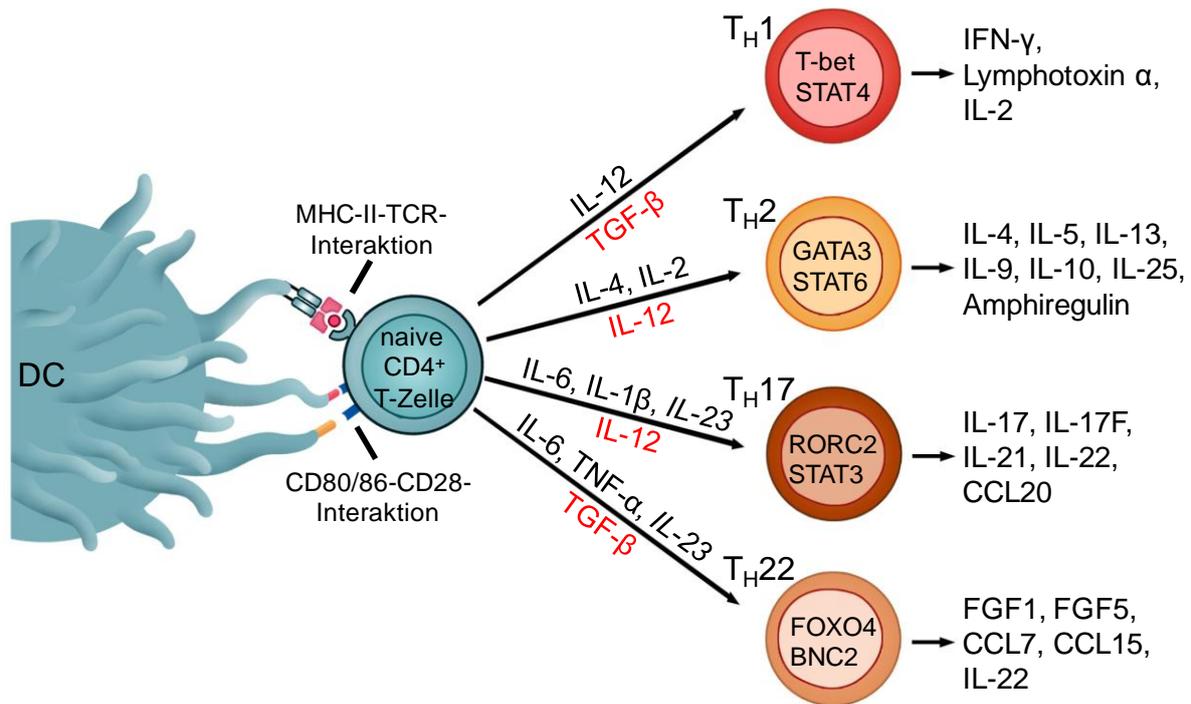


Abb. 2: Priming naiver CD4⁺T-Zellen durch DC, adaptiert nach O'Shea und Paul (66). DC induzieren die Differenzierung unterschiedlicher T_H-Populationen aus naiven CD4⁺T-Zellen. Die Erkennung des MHC-II-Peptid-Komplexes durch den TCR liefert das Signal 1. Das Signal 2 beruht auf einer feinen Balance stimulierender und inhibierender Signale. Hervorzuheben ist dabei die Interaktion von CD28 der T-Zellen mit CD80 und CD86 der DC. Die Polarisierung naiver T-Zellen in die unterschiedlichen T_H-Populationen wird durch bestimmte Zytokine, das Signal 3, gesteuert. Diese Zytokine sind auf den großen Pfeilen aufgetragen: induzierende Zytokine schwarz, stabilisierende kursiv und inhibierende rot. Die T_H1, T_H2, T_H17 und T_H22 exprimieren linienspezifische Transkriptionsfaktoren und sezernieren ein bestimmtes Profil von Zytokinen, Chemokinen und Wachstumsfaktoren. Transkriptionsfaktoren sind auf die Zellen aufgetragen, durch die T_H freigesetzte Zytokine rechts neben den kleinen Pfeilen.

1.8.5 T-Zell-Plastizität

Aktuell wird das Paradigma, nach dem naive CD4⁺T-Zellen deterministisch und irreversibel zu einem T_H-Typ polarisiert werden, diskutiert (66). Es wird mehr und mehr von einer Plastizität der T-Zellen, wie sie bereits in der Darstellung der einzelnen T-Zelllinien angedeutet wurde, ausgegangen. Trotz Beschreibungen, dass die exklusive Expression von Transkriptionsfaktoren die Linie determiniert, haben jüngere Daten gezeigt, dass die Realität wesentlich komplexer ist. Die CD4⁺T_H-

Populationen scheinen in terminal differenzierte Zellen und sich noch differenzierende Zellen, die eine gewisse Flexibilität zeigen, unterteilt werden zu können. So exprimieren T_H17 neben RORC2 auch das T_H1 -spezifische T-bet (74). Eine Subpopulation kann IFN- γ und IL-17 herstellen und könnte somit einen gemischten T_H1/T_H17 -Typ darstellen. Zudem können die nur IL-17-produzierenden T_H17 durch IL-12 zur Expression von IFN- γ angeregt werden. Ebenso konnte eine $CD4^+T_H$ -Population nachgewiesen werden, die sowohl IL-4 als auch IL-17 exprimiert und mit Asthma assoziiert ist – also eine heterogene T_H2/T_H17 -Population. Alle genannten Mechanismen zeichnen ein komplexes Bild der Verflechtungen und Flexibilität der $CD4^+$ T-Zell-Populationen, das wohl auch der Situation in vivo am ehesten entspricht. Denn in vivo ist die adaptive Immunantwort durch eine heterogene Zusammensetzung aus unterschiedlichen T_H und T_{reg} gekennzeichnet, die als Antwort auf Krankheitserreger und in anderen entzündlichen Reaktionen auftreten.

1.9 Die TLR gesteuerte T-Zell-Differenzierung

Die Polarisation naiver T-Zellen wird maßgeblich von DC gesteuert und die T-Zell-Antwort auf diese Weise an molekulare Strukturen verschiedener Pathogenklassen angepasst (35). Um dies zu gewährleisten, verfügt die DC über die Potenz, Antigene auf MHC-I- und MHC-II-Komplexen zu präsentieren und unterschiedlichste Zytokine und Chemokine zu sezernieren.

Die Präsentation von Antigenen im Komplex mit einem MHC-I-Molekül generiert aus $CD8^+$ T-Vorläuferzellen zytotoxische T-Effektorzellen (35). Diese Zellen vermögen es, infizierte Zellen, Transplantate und Tumorzellen zu eliminieren. Werden nun DC von Viren befallen, so können sie Komplexe aus MHC-I und viralen Peptiden an ihren Oberflächen präsentieren und so eine zytotoxische T-Zell-Antwort einleiten, die unter anderem in ihrer eigenen Zerstörung mündet. Werden die Antigene in einem Komplex mit MHC-II präsentiert, wird die Expansion und Differenzierung $CD4^+T_H$ -Zellen und T_{reg} induziert. In diesem Fall determiniert das über Zytokine und Zell-Zell-Kontakte vermittelte Signal 3, welche Population von T-Zellen erzeugt wird. Es steht dabei in Abhängigkeit dazu, welches PAMP oder welcher PRR die Reifung der DC initiiert.

T_H1 entwickeln sich aus naiven T-Zellen unter dem Einfluss von Zytokinen der IL-12-Familie, Typ-1-IFN und CD54 (Alternativname ICAM1) (82). Die Produktion

relevanter Mengen IL-12p70 durch DC erfolgt bei Stimulation mit nur einem einzelnen TLR-Agonisten erst, wenn eine Kostimulation durch ein sezerniertes oder membrangebundenes Signal von T-Zellen oder NK-Zellen, wie IFN- γ oder CD40L, dargeboten wird (55). Nach der Stimulation von TLR3, TLR4 oder TLR7 zeigen die DC eine große Potenz zur T_H1-Induktion: Der Bindung von dsRNS an TLR3 folgt eine starke Sekretion von IL-12p70 und Typ-1-IFN (83), der von LPS aus *Escherichia Coli* (*E. coli*) oder *Salmonella typhimurium* an TLR4 eine etwas geringere Freisetzung von IL-12p70 (55), die jedoch unter der Anwesenheit von IFN- γ hoch reguliert wird. R848 (TLR7/8) führt zu einer Typ-1-IFN vermittelten humoralen und zellulären Antwort, die von DC zusätzlich durch IL-12p70 und von pDC durch IFN- α in Richtung einer T_H1-Antwort gesteuert wird (84). Ebenso setzen pDC nach Stimulation des TLR9 mit CpG-reichen DNS-Motiven variable Mengen an IL-12p70 und IFN- α frei (49).

Demgegenüber zeigt die Bindung der TLR2-Heterodimere nur geringe Effekte auf die Potenz der DC, eine T_H1-Expansion zu induzieren (85, 86). So bewirkt die Stimulation des TLR1/2 durch Pam₃ und des TLR2/6 durch MALP-2 keine Sekretion der T_H1 induzierenden Zytokine. Allerdings folgt der Stimulation mit PGN eine moderate Sekretion an IL-12p70, die mit der Freisetzung größerer Mengen IL-23 und auch IL-10 einhergeht (87). Die TLR2-abhängige IL-10-Produktion kann so eine T_H2-Antwort induzieren.

DC verfügen über unterschiedliche Kapazitäten, T_H1 oder T_H2 zu aktivieren. So induzieren epidermale LC vorwiegend die Differenzierung der CD4⁺T-Zellen zu T_H2, während dermale DC vorwiegend eine T_H1-Antwort induzieren (80). Darüber hinaus gelten LC als die DC-Population der Haut, die hauptsächlich T_H17 induzieren kann (88). T_H17 sind in die Abwehr extrazellulärer Bakterien, von Pilzen sowie in Autoimmunprozesse und die Bekämpfung von Tumoren involviert. Als wichtige Faktoren ihrer Induktion gelten IL-1 β , IL-6, IL-23 und TGF- β (89, 90). DC sezernieren diese Zytokine nach Stimulation des TLR2 (PGN) und des TLR4 (LPS) und können so die T_H17-Differenzierung induzieren (89). Trotzdem induzieren aus der Haut isolierte LC, dermale DC und aus Monozyten oder CD34⁺Stammzellen generierte LC-ähnliche Zellen IL-17 in T-Gedächtniszellen, jedoch nicht in naiven CD4⁺T-Zellen (91).

T_H22 sind spezialisierte T-Zellen, die in die Immunität der Haut involviert sein sollen. Während ihre Differenzierung wie die der T_H17-Zellen durch IL-6 und IL-23 angeregt wird, wird sie durch TGF- β gehemmt (81). Die Induktion erfolgt vor allem durch TLR9

(CpG-2006) stimulierte pDC mittels IL-6 und TNF- α , TLR4 (LPS) stimulierte cDC sind hingegen weniger starke Induktoren.

Auch epidermale LC und dermale DC induzieren T_H22, wobei die epidermalen LC potenter als dermale DC die T_H22 aus peripheren und naiven CD4⁺T-Zellen induzieren (80).

1.10 Die Kooperation der TLR

In einer effektiven Immunantwort auf Mikroorganismen sind viele PRR involviert, hierunter maßgeblich auch die TLR. Die Aktivierung der unterschiedlichen PRR führt zu sich ergänzenden, synergistischen und antagonistischen Effekten, die außer der angeborenen Immunabwehr auch die erworbene lenken.

Bei der Abwehr von eindringenden Pathogenen ist die Notwendigkeit einer Rezeptorkooperation evident, weil die Erreger unterschiedliche pathogene Strukturen enthalten, die von verschiedenen TLR erkannt werden (92). So ist z. B. die Mortalitätsrate und Infektionslast gegen *Salmonella typhimurium* in TLR2^{-/-}TLR4^{-/-}Mäusen und MyD88^{-/-}Mäusen, denen das dem TLR2 und TLR4 gemeinsame Adaptermolekül MyD88 fehlt, wesentlich höher als in einfach TLR2^{-/-}- oder TLR4^{-/-}Mäusen.

Auf zellulärer Ebene kann sich die Kooperation unterschiedlich ausbilden (55). Die Antworten zweier Zelltypen als Reaktion auf unterschiedliche PAMP können sich addieren oder auch in zwei unabhängigen Antworten münden. Ebenso kann ein Zelltyp nach Stimulation mit einem TLR-Agonisten auf parakrinem Weg die Antwort eines zweiten Zelltyps auf einen anderen TLR-Agonisten beeinflussen. Schließlich können in einer Zelle durch die Bindung unterschiedlicher TLR ein Synergismus oder parallele Antworten, die sich auf je einen TLR-Liganden beziehen, hervorgerufen werden.

Napolitani et al. konnten zeigen, dass die simultane Stimulation des TLR7/8 (R848) in Kombination mit dem TLR3 (PolyI:C) oder TLR4 (LPS) zur synergistischen Freisetzung von IL-12p70 durch humane MoDC und CD1⁺DC führt (93). Die Sekretion durch DC erreicht hierbei eine Größenordnung, wie sie bei Stimulation eines TLR sonst nur bei Kostimulation durch T-Zellen oder NK-Zellen beobachtet wird. Auch andere Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IL-23 unterliegen diesem synergistischen Effekt. Dadurch wird die Kapazität der DC, naive CD4⁺T-Zellen zu polarisieren, amplifiziert. So korrelierte die Sekretion von IL-12p70 mit der induzierten T_H1-Zell-

Antwort nach kombinierter Stimulation der MoDC mit LPS und R848. DC seien also erst nach kombinierter Stimulation von TLR, die endosomal, zytosolisch oder an der Plasmamembran lokalisiert sind, dazu befähigt, eine effektive Immunantwort einzuleiten. Durch diese Schwelle könne gewährleistet werden, dass erst eine reale Invasion von Pathogenen eine weitreichende Immunreaktion nach sich zieht. Im Mausmodell und an Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen konnte gezeigt werden, dass dem Synergismus eine Kooperation der TRIF- und MyD88-Signaltransduktionpfade zugrunde liegt (94).

Allerdings hängen die TLR-induzierten, synergistischen Effekte in großem Maße von den TLR-Liganden, Zelltyp und der Kapazität der Zelle, ein spezifisches Zytokin zu exprimieren, ab (95). So nutzen z. B. humane MoDC und Monozyten-abgeleitete Makrophagen (MoMa) gemeinsame und unterschiedliche Wege, um Gene synergistisch zu aktivieren – auf Ebene der TLR und auf Ebene der Signaltransduktion.

1.11 Aufgabenstellung

In der vorgestellten Arbeit sollte untersucht werden, wie LC und DC auf eine multiple PAMP-Exposition, wie sie bei Verlust der Barrierefunktion der Haut auftritt, reagieren. Die Arbeiten von Napolitani et al. legten nahe, dass in humanen DC ein Synergismus von TLR8 in Kombination mit TLR3 oder TLR4 bezüglich der Sekretion von IL-12p70 und der Kapazität zur Induktion einer T_H1 -Zell-Expansion in DC vorhanden sei (93). Desweiteren konnte gezeigt werden, dass sich die Synergismen der TLR in Abhängigkeit vom Zelltyp, TLR-Ligand und zu untersuchendem Oberflächenmolekül oder Zytokin unterschiedlich ausprägen (95, 96, 97). Es kann daher angenommen werden, dass dies bezüglich des Zelltyps auch für LC in Abgrenzung zu konventionellen DC gilt. Insbesondere könnten für die Sekretion von IL-6, IL-1 β , IL-12p70, TGF- β und IL-23 und für die Induktion der Zellen, die unter dem Einfluss dieser Zytokine differenzieren, T_H1 , T_H17 und T_H22 , solche Synergismen angenommen werden.

In dieser Arbeit sollten vornehmlich die Effekte der Stimulation des TLR2, die zur Sekretion proinflammatorischer Zytokine führen können, in Kombination mit der Stimulation anderer TLR an LC und DC im direkten Vergleich untersucht werden. Die Versuche sollten *in vitro* an aus Monozyten generierten LC- und DC-ähnlichen MoLC und MoDC durchgeführt werden. Zunächst sollte die Isolierung der Monozyten durch

Adhärenz mit der Positivselektion und Depletion per magnetischer Zellsortierung (MACS) vergleichend untersucht werden. Bei diesem Teil der Experimente sollte jeder *buffy coat* eines Spenders in drei Teile fraktioniert und die Monozyten mit den genannten Methoden isoliert werden. Zytokine, die nach TLR2-Stimulation von MoLC und MoDC sezerniert werden, sollten identifiziert und im *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA) quantifiziert werden.

Nach der Etablierung der zellbiologischen Arbeitstechniken sollten die Reifung und Sekretion durch MoLC und MoDC nach Stimulation mit PGN, welches das TLR1/2- und das TLR2/6-Heterodimer bindet, mit der Reifung und Sekretion nach Stimulation mit dem TLR2/6-Liganden Pam₂ und dem TLR1/2-Liganden Pam₃ verglichen werden. Hierzu sollte die Konzentration der Zytokine IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-1 β und IL-12p70 in den Überständen per ELISA gemessen werden. Mit Hilfe des Durchflusszytometer (FACS, englisch *fluorescence activated cell sorting*) sollte nach Oberflächenmolekülen gesucht werden, deren Expression auf MoLC nach TLR2-Stimulation hoch reguliert wird. Durch Gabe der TLR2 blockierenden Antikörper Anti-TLR2 T2.5 und 11G7 vor der Stimulation sollte untersucht werden, ob PGN die Sekretion von Zytokinen spezifisch über die Bindung an den TLR2 induziert.

Anschließend sollte untersucht werden, wie MoLC und MoDC auf die simultane Stimulation mit dem TLR2-Liganden PGN und CD40L reagieren und ob sich aus dieser Kostimulation ein synergistischer Effekt auf die Sekretion der Zytokine ergäbe. Desweiteren sollte neben der Sekretion auch die Expression von Oberflächenmarkern auf MoLC und MoDC gemessen werden, um einen Zusammenhang zwischen Reifung der Zellen und der Sekretion herstellen zu können.

Nach der Stimulation mit verschiedenen TLR2-Liganden und CD40L sollten die „wahren Umstände“, wie sie in vivo nach Verlust der epidermalen Barrierefunktion anzutreffen sind, imitiert werden und MoLC und MoDC mit Kombinationen unterschiedlicher mikrobieller TLR-Liganden stimuliert werden. Die Stimulation der TLR auf MoDC und MoLC sollte hierbei simultan erfolgen, um die Entwicklung einer Kreuztoleranz, wie sie nach sequentieller Stimulation von MyD88-gekoppelten TLR vorübergehend auftreten kann, zu verhindern (94, 97). Zunächst sollten auf MoLC der TLR3 mit PolyI:C, der TLR4 mit hoch gereinigtem LPS und der TLR8 mit PolyU einzeln und in Kombination stimuliert werden, um mögliche Synergismen in der Sekretion von IL-6, IL-1 β , IL-12p70 und TGF- β mit den Untersuchungen von Napolitani et al. für humane MoDC und CD1c⁺DC vergleichen zu können. Des-

weiteren sollten MoLC und MoDC mit dem TLR2/6-Liganden MALP-2, dem TLR5-Liganden Flagellin und LPS einzeln und in Kombination stimuliert und die Zytokine IL-6, IL-1 β , IL-12p70 und TGF- β in den Überständen per ELISA quantifiziert werden. Anschließend sollte die Wirkung der kombinierten Stimulation mit dem TLR2-Liganden PGN, dem TLR4-Liganden LPS und dem TLR9-Liganden DNS auf MoLC, MoDC und pDC hinsichtlich Reifung und Sekretion von IL-6, TGF- β , IL-1 β , IL-12p70 und IL-23 untersucht werden. Auf der Oberfläche von MoLC sollte nach kostimulatorischen Molekülen und Reifungsmarkern, die durch TLR-Synergismen direkt beeinflusst werden, per FACS gefahndet und so die Reifung und stimulatorischen Kapazitäten der DC evaluiert werden.

Schließlich sollte in der Kokultur der Effekt der mit PGN, LPS und DNS stimulierten MoLC auf naive CD4⁺T_H-Zellen studiert werden. Naive CD4⁺T_H-Zellen sollten hierzu per MACS hoch rein isoliert werden. Um bei den Untersuchungen möglichst die Gegebenheit in vivo zu simulieren, wurde auf die Zugabe von IL-2, blockierenden Antikörpern und kostimulatorischen CD3/CD28-*beads* verzichtet. Es sollten die Zytokine IFN- γ , TNF- α , IL-17 und IL-22 in den Überständen der Kokultur per ELISA gemessen werden. Durch intrazelluläre FACS-Färbung der Zytokine, IFN- γ , IL-17 und IL-22, in CD4⁺T-Zellen sollte abschließend die Frage geklärt werden, welche der T-Zell-Populationen, T_H1, T_H17 und T_H22, nach multipler TLR-Stimulation differenzieren.

2 Material und Methoden

2.1 Zellbiologisches Material und Arbeitstechniken

<i>Buffy coat</i>	60 ml, mit Anti-Gerinnungsmittel Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin (CPDA); Blutspendedienst
RPMI	1640 mit Ultraglutamin 1; Cambrex, Wiesbaden
L-Glutamin	Biochrom, Berlin
Penicillin	Biochrom, Berlin
Streptomycin	Biochrom, Berlin
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Zellzähler Z1	Beckmann Coulter, Krefeld

Alle Arbeiten mit lebenden menschlichen Zellen erfolgten unter einer Laminar-Flow-Werkbank der Sicherheitsklasse 2 unter sterilen Arbeitsbedingungen. Die verwendeten *buffy-coat*-Konserven stammten von gesunden Spendern. Sie wurden ohne Lymphozytenfiltration vom Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes Wannsee-Heckeshorn, Berlin, bezogen. Hieraus wurden dann Monozyten gewonnen. Diese wurden in RPMI, das mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und mit 10 % FCS versetzt wurde, zu MoLC und MoDC kultiviert. Die Komplementproteine im FCS wurden bei 56 °C über 40 min hitzeinaktiviert. Die Zellen wurden in Brutschränken bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

Die Zellzahl in den Suspensionen wurde durch elektronische Pulsflächenanalyse mit dem vollautomatischen Zellzähler mit einer Messgenauigkeit von 0,1 µm bestimmt. Ebenso erfolgte die tot/lebend-Unterscheidung anhand der Zellgröße (lebende Zellen bei mononukleären Zellen aus dem peripheren Blut (PBMC)/MoLC/MoDC > 10 µm, bei pDC > 8 µm). Zur Messung wurde die Probe 1:1000 mit PBS verdünnt.

2.2 Zellisolierung aus *buffy coat*

2.2.1 Isolierung von PBMC aus *buffy coat* über Dichtegradientenzentrifugation

<i>Buffy coat</i>	60 ml, mit Anti-Gerinnungsmittel CPDA; Blutspendedienst
Histopaque-1077	Dichtegradient aus 5,7 g/dl Ficoll (Typ 400, Sucrose Polymer) und 9,0 g/dl Natriumdiatrizoat; Sigma, Deisenhofen
PBS	Phosphatgepufferte Kochsalzlösung nach Dulbecco, ohne Ca ²⁺ und Mg ²⁺ ; Gibco BRL Life Technologies, Karlsruhe

Als *buffy coat* wird die leukozyten- und thrombozytenreiche Schicht bezeichnet, die nach der Zentrifugation von CPDA-stabilisiertem Vollblut zwischen Plasma und Erythrozyten liegt. Diese werden separiert, so dass der *buffy coat* vom Blutspendedienst zu Forschungszwecken zur Verfügung gestellt werden kann.

Die Population der PBMC wird mit Hilfe der Dichtegradientenzentrifugation isoliert. Als Gradient wird die Ficoll-Natriumdiatrizoat-Lösung verwandt. Während der isopyknischen Zentrifugation verbinden sich Granulozyten und Erythrozyten mit der hochpolymeren Methylzellulose des Ficolls und sedimentieren als schwere Aggregate am Röhrchenboden. Nach Zentrifugation enthält die unterste Phase aggregierte Erythrozyten und Granulozyten. Die PBMC-Zellpopulation sammelt sich in der Grenzschicht zwischen Plasma- und Ficollphase und kann hier vorsichtig abgenommen werden.

Um große Teile der Erythrozyten bereits vor der Dichtegradientenzentrifugation abzutrennen, wurde die *buffy-coat*-Spende in 50 ml Röhrchen überführt, direkt bei 400 g zentrifugiert und der Überstand vorsichtig von dem roten Pellet am Boden getrennt. Dieses Pellet wurde resuspendiert und die Zellen 1:2 mit PBS vermischt, je 25 ml der Zellsuspension vorsichtig auf 15 ml Gradient in 50 ml Röhrchen aufgeschichtet und zentrifugiert (800 g, 20 min bei Raumtemperatur ohne Bremse). Die leukozytenhaltige Grenzschicht konnte mit der 10 ml Pipette vorsichtig abpipettiert werden. PBMC wurden anschließend in PBS (4 °C) überführt, zentrifugiert (400 g, 10 min, mit Bremse) und mehrfach bei 260 g, 5 min und 4 °C thrombozytenfrei gewaschen. Die Zellen eines Spenders wurden vereinigt und in PBS mit

10 % FCS resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und nur Präparationen mit normaler Anzahl an PBMC weiterverarbeitet.

2.2.2 Isolierung von Monozyten aus PBMC durch Adhärenz

Gewebekultur-Schalen	6 cm Durchmesser; Greiner, Frickenhausen
Spülmedium	RPMI ohne FCS

Die Isolierung von Monozyten durch Adhärenz beruht auf ihrer Eigenschaft, auf unphysiologischen Oberflächen zu haften. So können sie von anderen Zellen der PBMC getrennt werden. Für die Adhärenz wurden PBMC gezählt und je 5×10^6 Zellen in Gewebekultur-Schalen mit RPMI und 10 % FCS ausgebracht. Für die aktive Adhärenz auf der Plastikoberfläche wurden die Monozyten unter wiederholter Bewegung der Schalen für 30 min bei 37 °C inkubiert. Es erfolgte die mikroskopische Kontrolle, ob sich Zellen angeheftet hatten. Die Gewebekultur-Schale wurde in schräger Position aufgestellt, mit einem mittelstarken Pipettenstrahl warmen Mediums, 50 ml, gespült und gleichzeitig der Überstand mit einer zweiten Pipette abgesaugt. Nach mikroskopischer Kontrolle auf Kontamination mit T- oder B-Zellen wurden 5 ml Medium mit 10 % FCS zu den Zellen gegeben und diese im Brutschrank inkubiert.

2.2.3 Magnetische Sortierung von Monozyten mit Anti-CD14 Mikrobeads

Anti-CD14 Mikrobeads	direkt gekoppelter Mausantikörper (mAk), IgG2a
LS Säule	Selektionssäule
Isolierungspuffer	PBS mit 2 mM EDTA und 0,5 % BSA
MACS Positivselektionssäulen	<i>large cell separation columns</i>
Separationsfilter	
MiniMACS	Magnetischer Zell-Separator; alle Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Kanüle	23G; BD Biosciences, Heidelberg

Neben der Adhärenz zur Isolierung von Monozyten wurde die MACS-Technik eingesetzt. Die Eigenschaften der MoLC und MoDC, die aus den mit den unterschiedlichen Techniken isolierten Monozyten differenziert wurden, sollten verglichen

werden, um im Anschluss den Versuchsaufbau auszurichten. Es sollten Monozyten durch Anti-CD14 Mikrobeads positiv selektiert werden. Bei dieser Technik sind die Mikrobeads gegen das für Monozyten charakteristische Oberflächenmolekül CD14, ein Molekül, das auch als Rezeptor für LPS fungiert, gerichtet. Die Bindung des Isolierungs-mAk Anti-CD14 über CD14-Kreuzbindung stellt bereits ein Aktivierungssignal für die Zelle dar.

Es wurden 10^7 Zellen der Suspension der PBMC in 80 μ l 4 °C kaltem, entgastem Isolierungspuffer aufgenommen, mit 20 μ l der Anti-CD14 Mikrobeads vermischt und für 15 min bei 6-8 °C inkubiert. Nach zwei Waschschrritten (siehe 2.2.2) mit Isolierungspuffer wurden die Zellen in einer Konzentration von 10^8 Zellen/500 μ l in Isolierungspuffer resuspendiert. Die Säule mit einer Kapazität von 10^8 Zellen wurde in dem Einsatz des MiniMACS-Magneten positioniert, oben die Separationsfilter und unten die Kanülen aufgesetzt. Die Säule wurde dann dreimal mit 500 μ l des Isolierungspuffer vorgespült und anschließend über den Filter mit je 1 ml Zellsuspension beladen. Die aus der Kanüle tretende Zellsuspension wurde als CD14 negative Fraktion in Röhrchen aufgefangen. Nach Absinken des Meniskus der Flüssigkeit in den Säulen auf die Höhe des Fließstopps wurde die Säule dreimalig mit je 1 ml Isolierungspuffer gespült. Die Säule wurde aus dem Einsatz des Magneten genommen und unter Druck durch einen Stempel mit 1 ml Isolierungspuffer eluiert. Die positiv isolierten Zellen wurden in einem Röhrchen gesammelt und gezählt.

2.2.4 Isolierung von Monozyten durch Depletion anderer PBMC-Populationen

Monocyte Isolation Kit II	Biotin-konjugierte Anti-human CD3, CD7, CD16, CD19, CD56, CD123, Glycophorin A und Anti-Biotin Mikrobeads, Klon Bio3-18E7, IgG1
LS Säule	Selektionssäule
MiniMACS	Magnetischer Zell-Separator; alle Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Kanüle	23G; BD Biosciences, Heidelberg

Im Rahmen des Vergleichs der unterschiedlichen Isolierungstechniken wurden auch Monozyten im Zustand von *untouched cells* isoliert. So wurden Monozyten mittels Antikörper-Depletion anderer PBMC-Populationen negativ isoliert.

Mit 100 µl humanem IgG wurden die Fc-Rezeptoren von 10^8 Zellen blockiert und zeitgleich mit 100 µl Biotin-Antikörper-Cocktail für 10 min bei 4-8 °C die kontaminierenden Blutzellen markiert. Nach sekundärer Bindung mit Anti-Biotin Mikrobeads wurden PBMC auf Säulen geladen. Die Passagefraktion wurde als Monozyten zurückgewonnen, während die anderen Zellpopulationen in der Säule verblieben.

2.2.5 Isolierung von pDC durch Depletion anderer PBMC-Populationen und anschließender Sortierung mit Anti-human CD304 Mikrobeads

Cell Isolation Kit	Diamond Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit; Anti-human CD304 (Blut-DC Antigen 4/Neuropilin-1) Mikrobeads; Biotin-konjugierte Anti-human Antikörper, die gegen Antigene, die nicht von pDC exprimiert werden, gerichtet sind; Anti-Biotin Mikrobeads; Anti-CD304 Mikrobeads direkt gekoppelter mAk, IgG1
LD Säule	Selektionssäule
MS Säule	Selektionssäule
MiniMACS	Magnetischer Zell-Separator; alle Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Kanüle	23G; BD Biosciences, Heidelberg

Neben MoLC und MoDC sollten auch pDC als weitere Subpopulation der DC untersucht werden. Die pDC exprimieren charakteristischerweise das Oberflächenmolekül CD304 (Blut-DC Antigen 4/Neuropilin-1), dessen Bindung mit den Anti-CD304 Mikrobeads zu keiner signifikanten Veränderung der pDC bezüglich ihrer Typ1-IFN-Produktion nach Stimulation mit dem Influenza Virus führt, also kein Aktivierungssignal für die Zellen darstellt.

10^8 Zellen der PBMC wurden in 400 µl Puffer suspendiert. Die kontaminierenden Blutzellen wurden mit 100 µl Biotin-Antikörper-Cocktail auf 10^8 Zellen für 10 min bei 4-8 °C markiert. Nach sekundärer Bindung mit Anti-Biotin Mikrobeads wurden PBMC auf LD-Säulen geladen. Die Passagefraktion wurde als pDC reiche Fraktion zurückgewonnen, während die anderen Zellpopulationen in der Säule verblieben.

Anschließend wurde die weitere Isolierung und Anreicherung über positive Selektion mit Anti-human CD304 Mikrobeads fortgesetzt. Dafür wurden 10^8 Zellen der Suspension der PBMC in 100µl Anti-human CD304 Diamond Mikrobeads

resuspendiert und für 15 min bei 6-8 °C inkubiert. Nach zwei Waschschrritten mit Isolierungspuffer wurden 10^8 Zellen in 500 μ l aufgenommen. Die *medium cell* Säule mit einer Kapazität von 10^8 Zellen wurde in dem Einsatz des MiniMACS-Magneten positioniert und oben wurden die Separationsfilter, unten die Kanülen aufgesetzt. Die Säule wurde dann dreimal mit jeweils 500 μ l Isolierungspuffer vorgespült und anschließend über den Filter mit je 1 ml Zellsuspension beladen. Die aus der Kanüle tretende Zellsuspension wurde als CD304 negative Fraktion in Röhrchen aufgefangen. Nach Absinken des Meniskus der Flüssigkeit in den Säulen auf die Höhe des Fließstopps wurde die Säule dreimal mit 1 ml Isolierungspuffer gespült. Die aufgefangene Suspension wurde nochmals auf die Säule gegeben und wie beschrieben gespült. Die Säule wurde aus dem Einsatz des Magneten genommen und mit 1 ml Isolierungspuffer mit einem Stempel durch Druck steril eluiert. Die positiv isolierten Zellen wurden in einem Röhrchen gesammelt und gezählt.

2.3 Generierung von DC und LC aus Monozyten

Gewebekultur-Schalen	Cellstar, 6 cm Durchmesser; Greiner, Frickenhausen
GM-CSF	rekombinant; R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
IL-4	rekombinant; R&D, Wiesbaden-Nordenstadt
TGF- β	rekombinant; R&D, Wiesbaden-Nordenstadt

Aus Monozyten können *in vitro* unter Zugabe der Zytokine GM-CSF und IL-4 (oder IL-13) sogenannte MoDC, unreife DC, generiert werden (33, 98). Zur Kultivierung LC-ähnlicher Zellen, den MoLC, die Birbeck-Granula und Langerin exprimieren, wird den Monozyten, abgesehen von GM-CSF und IL-4, TGF- β 1 zugesetzt (17). Bei der Konversion verlieren die Zellen in der Zellkultur das CD14-Antigen und verstärken die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen. Nach sechs Tagen Kultur sind Zellen eines unreifen DC-Phänotyps differenziert. Zur Generierung der MoDC wurde den Monozyten in der Gewebekultur-Schale 100 ng/ml GM-CSF und 10 ng/ml IL-4 zugegeben. An Tag 2 und 4 wurden 2 ml Medium von den Schalen abgesaugt und 3 ml frisches Medium mit 100 ng/ml GM-CSF zugegeben. An Tag 6 wurden die nicht adhärennten Zellen mit dem Mediumüberstand abgenommen, gewaschen und in den Experimenten eingesetzt. Bei der Generierung von MoLC wurden zusätzlich 10 ng/ml TGF- β 1 an Tag 0, 2 und 4 in das Kulturmedium gegeben.

2.4 Stimulation der DC

24-Napf Gewebekultur-Platte	Greiner, Frickenhausen
CpG	CpG-Oligonukleotid, TLR9-Ligand; InvivoGen, Toulouse, Frankreich
DNS	Endotoxin-freie bakterielle Desoxyribonukleinsäure, TLR9-Ligand; InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Flagellin	Flagellin aus <i>Bacillus subtilis</i> , TLR5-Ligand; InvivoGen, Toulouse, Frankreich
LPS	<i>Ultra Pure</i> Lipopolysaccharid aus <i>Salmonella minnesota</i> , TLR4-Ligand; InvivoGen, Toulouse, Frankreich
MALP-2	Makrophagen aktivierendes Lipopeptid-2 aus <i>Mycoplasma fermentans</i> , TLR2/6-Ligand; Axxora, Lörrach
MDP	Muramyl Dipeptid, NOD2; InvivoGen, Toulouse, Frankreich
M-Tri _{DAP}	MurNAc-L-Ala-g-D-GlumDAP, NOD1/2; InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Pam ₂	S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-Cys-Ser-(Lys) ₄ , TLR2/6-Ligand; InvivoGen, Toulouse, Frankreich
Pam ₃	N-pamitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-(R)-Cys-Ser-(Lys) ₄ , TLR1/2-Ligand; InvivoGen, Toulouse, Frankreich
PGN	Peptidoglykan aus <i>Staphylococcus aureus</i> ; Fluka, Buchs, Schweiz
PolyI:C	Polyinosine-Polycytidylsäure, TLR3-Ligand; InvivoGen, Toulouse, Frankreich
PolyU	einzelsträngiges Polyuridin im Komplex mit dem kationischen Lipid Lyo/Vec (ssPolyU/LyoVec), TLR8-Ligand; InvivoGen, Toulouse, Frankreich
sCD40L-Trimer	rekombinant, löslich; Bender, Wien, Österreich
Anti-TLR2 T2.5 und 11G7	IgG1; eBioscience, Frankfurt am Main und Millipore, Schwalbach am Taunus

Generierte MoLC und MoDC bzw. isolierte pDC wurden zur Stimulation zu 10⁶ Zellen/ml Medium in den Vertiefungen einer Gewebekultur-Platte mit Flachboden ausgebracht. Sie wurden dann über einen Zeitraum von 48 h mit den Stimuli, einzeln

und in Kombination, aktiviert: mit 5 µg/ml CpG, 5 µg/ml DNS, 0,1 µg/ml Flagellin, 500 ng/ml LPS, 0,05 µg/ml MALP-2, 5 µg/ml Muramyl Dipeptid (MDP), 5 µg/ml MurNAc-L-Ala-g-D-GluDAP (M-Tri_{DAP}), 0,1 µg/ml Pam₂, 1 µg/ml Pam₃, 20 µg/ml PGN, 5 µg/ml PolyI:C, 5 µg/ml PolyU bzw. 1 µg/ml CD40L. Die Wahl der Konzentration der Stimuli orientierte sich an der einschlägigen Literatur und Herstellerempfehlungen oder wurde bezüglich PGN nach der Durchführung einer Kinetik festgelegt. Die Zugabe der Anti-TLR2-Antikörper, T2.5 und 11G7 erfolgte 0,5 h vor der Stimulation.

Nach der zweitägigen Inkubation wurde der unverdünnte Kulturüberstand aus den Näpfen abgenommen, zellfrei zentrifugiert und für die Analyse im ELISA direkt verwendet oder bei -80°C weggefroren. Die Pellets wurden mit den in den Näpfen verbliebenen Zellen vereint, gezählt und im FACS analysiert.

2.5 Isolierung und Kultur von CD4⁺T-Zellen durch Depletion anderer PBMC-Populationen

CD4 ⁺ T cell isolation kit II	Biotin-konjugierte Anti-human CD8, CD14, CD16, CD19, CD36, CD56, CD123, TCR γ/δ, Glycophorin A und Anti-Biotin Mikrobeads, mAk IgG1
LS Säule	Selektionssäule
MiniMACS	Magnetischer Zell-Separator; alle Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach
Kanüle	23G; BD Biosciences, Heidelberg
24-Napf Gewebekultur-Platte	Greiner, Frickenhausen

CD4⁺T-Zellen wurden mittels Antikörper-Depletion anderer PBMC-Populationen negativ isoliert. Sie befanden sich so im Zustand von *untouched cells*. Mit 100 µl humanem IgG wurden die Fc-Rezeptoren von 10⁸ Zellen blockiert und zeitgleich mit 100 µl Biotin-Antikörper-Cocktail für 10 min bei 4-8 °C die kontaminierenden Blutzellen markiert. Nach sekundärer Bindung mit Anti-Biotin Mikrobeads wurden die PBMC auf die Säulen geladen. Die Passagefraktion wurde als CD4⁺T-Zellen zurückgewonnen, während die anderen Zellpopulationen in der Säule verblieben. Die isolierten CD4⁺T-Zellen wurden zu 10⁵ Zellen/Napf ausgebracht und mit 10⁴ vorstimulierten allogenen MoLC in 110µl Medium kokultiviert. Um bei den Untersuchungen möglichst die Gegebenheit in vivo zu simulieren, wurde auf die Zugabe

von IL-2, blockierenden Antikörpern und kostimulatorischen CD3/CD28-*beads* verzichtet. Nach 5 Tagen wurde der unverdünnte Kulturüberstand aus den Näpfen abgenommen, zellfrei zentrifugiert und für die Analyse im ELISA direkt verwendet oder bei -80 °C weggefroren. Die Pellets wurden mit den in den Näpfen verbliebenen Zellen vereint, gezählt und im FACS analysiert.

2.6 Zytokinmessung im Sandwich-ELISA

ELISA-Kit	Human IFN- γ DuoSet ELISA-Kit Human IL-1 β /IL-1F2 DuoSet ELISA-Kit Human IL-4 DuoSet ELISA-Kit Human IL-6 DuoSet ELISA-Kit Human IL-12p70 DuoSet ELISA-Kit Human IL-17 DuoSet ELISA-Kit Human IL-22 DuoSet ELISA-Kit Human TGF- β 1 DuoSet ELISA-Kit Human TNF- α DuoSet ELISA-Kit; alle R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt Human IL-23 (p19/p40) (Interleukin-23, IL23) ELISA Ready-SET-Go! Set; eBioscience, Frankfurt am Main
Washer	Columbus Pro <i>washer</i> ; Tecan, Grödig, Österreich
Mikrotiterplatte	96-Napf mit Maxisorp-Oberfläche, Flachboden; Nunc, Roskilde, Dänemark
The Belly Dancer	Stovall Life Science, Asbach
Folie	Verdunstungsschutz; R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Blockpuffer	PBS, 1 % BSA, 5 % Sucrose, 0,05 % NaN ₃
Waschpuffer	PBS, 0,05 % Tween 20
Reagenzverdünnung	PBS, 1 % BSA (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-17, IL-22, TNF- α)
Reagenzverdünnung (IFN- γ , IL-4)	Tris-gepuffertes Salin (20 mM Trizma-Base, 150 mM NaCl), 0,1 % BSA, 0,05% Tween
Reagenzverdünnung (TGF- β 1)	PBS, 1,4 % entfettetes BSA, 0,05 % Tween 20
Streptavidin-HRP	Meerrettichperoxidase, 1:200 in Reagenzverdünnung
Substrat-Lösung	1:1 Farbreagenz A (H ₂ O ₂) und Farbreagenz B (Tetramethylbenzidin); R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

Stopp-Lösung	2 N H ₂ SO ₄
Fänger-Antikörper	Anti-IFN- γ aus der Maus (840101), 4 μ g/ml in PBS Anti-IL-1 β aus der Maus (840168), 4 μ g/ml in PBS Anti-IL-4 aus der Maus (840107), 4 μ g/ml in PBS Anti-IL-6 aus der Maus (840113), 2 μ g/ml in PBS Anti-IL-12 aus der Maus (840177), 4 μ g/ml in PBS Anti-IL-17 aus der Maus (840713), 4 μ g/ml in PBS Anti-IL-22 aus der Maus (841990), 2 μ g/ml in PBS Anti-TNF- α aus der Maus (840119), 4 μ g/ml in PBS Anti-TGF- β 1 aus der Maus (840116), 2 μ g/ml in PBS Anti-IL-23 aus der Maus (eBio473P19) vortitriert; alle ohne Carrier-Protein
Detektions-Antikörper	Anti- IFN- γ Biotin aus der Ziege (840102), 50 ng/ml in Reagenzverdünnung Anti-IL-1 β Biotin aus der Ziege (840169), 100 ng/ml in Reagenzverdünnung Anti-IL-4 Biotin aus der Ziege (840108), 12,5 ng/ml in Reagenzverdünnung Anti-IL-6 Biotin aus der Ziege (840114), 200 ng/ml in Reagenzverdünnung Anti-IL-12 Biotin aus der Ziege (840178), 100 ng/ml in Reagenzverdünnung Anti-IL-17 Biotin aus der Ziege (840714), 75 ng/ml in Reagenzverdünnung Anti-IL-22 Biotin aus der Ziege (841991), 250 ng/ml in Reagenzverdünnung Anti-TNF- α Biotin aus der Ziege (840120), 350 ng/ml in Reagenzverdünnung Anti-TGF- β 1 Biotin aus dem Huhn (840117), 300 ng/ml in Reagenzverdünnung Anti-IL-23 aus der Maus (C8.6) vortitriert
Standard-Protein	rekombinantes humanes IFN- γ (840103), 1000 pg/ml rekombinantes humanes IL-1 β (840170), 250 pg/ml rekombinantes humanes IL-4 (840109), 2000 pg/ml rekombinantes humanes IL-6 (840115), 600 pg/ml rekombinantes humanes IL-12 (840179), 2000 pg/ml rekombinantes humanes IL-17 (840715), 1000 pg/ml

	rekombinantes humanes IL-22 (841992), 2000 pg/ml
	rekombinantes humanes TNF- α (840121), 1000 pg/ml
	rekombinantes humanes TGF- β 1 (840118), 2000 pg/ml
	alle Standards in Reagenzverdünnung. IL-23 2000 pg/ml
Multikanalpipette	200 μ l; Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
ELISA-Reader	Emax, Molecular Devices; MWG Biotech, Ebersberg
Softmax	Software Version SPF2.6; MWG Biotech, Ebersberg

Mittels des ELISA erfolgt die quantitative Messung von Proteinen. Aufgrund seiner hohen Sensitivität und Spezifität eignet er sich zur Analyse der Zellkultur-Überstände. Alle Messungen wurden mit dem Sandwich-ELISA durchgeführt. Bei diesem erfolgt die Bestimmung des Proteins indirekt. Der am Boden der Mikrotiterplatte heftende Fänger-Antikörper bindet ein spezielles Epitop des zu untersuchenden Proteins und hält dieses fest. Nun bindet der Biotin-gekoppelte Detektion-Antikörper an ein zweites Epitop des Proteins. Streptavidin, das eine hohe Affinität gegen Biotin aufweist, wird im Komplex mit dem Enzym Meerrettichperoxidase (HRP, englisch *horseradish peroxidase*) hinzugegeben. Dieses reduziert H_2O_2 zu H_2O und führt so zur Verfärbung des zugegebenen Indikators, Tetramethylbenzidin. Dieser Farbumschlag wird im ELISA-Reader detektiert und quantitativ anhand des Standards (Standard: zweifach Verdünnungsreihen) aufgeschlüsselt.

Die Näpfe der Mikrotiterplatte wurden mit je 100 μ l Fänger-Antikörper befüllt, mit Folie abgedeckt und über Nacht bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Mit dem *washer* wurde die Mikrotiterplatte gewaschen und anschließend mit je 300 μ l Blockpuffer bei RT für 1 h inkubiert, um unspezifische Antikörper-Bindungen zu vermeiden. Nach einem Waschschrift wurden in Doppelansätzen 100 μ l Standard und Proben aufgetragen. Die Proben wurden teilweise vorverdünnt und der Faktor bei der Analyse berücksichtigt. Die Inkubation der Standards und Proben erfolgte abgedeckt für 2 h bei RT. Nach einem Waschschrift wurden die Näpfe mit je 100 μ l des Detektion-Antikörpers gefüllt, abgedeckt und für 2 h bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden je 100 μ l der Enzymverdünnung in die Näpfe pipettiert, die Platte abgedeckt und für 20 min bei RT abgedunkelt inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden je 100 μ l der Substratlösung zugegeben und die Platte für 20 min bei RT abgedunkelt inkubiert. Die Farbreaktion wurde schließlich mit 50 μ l Schwefelsäure (H_2SO_4) gestoppt. Im Anschluss wurde die Absorption in den einzelnen Näpfen im ELISA-Reader bei 450 nm und 570 nm Referenzwellenlänge gemessen. Die

Konzentrationswerte der Proben in pg/ml wurden aus der Standardkurve berechnet und die Mittelwerte gebildet. Der Korrelationskoeffizient der Standards betrug in allen Versuchen $\geq 0,98$.

TGF- β 1 wurde zur Messung im ELISA von seiner latenten in seine immunreaktive Form überführt. Dies erfolgte durch die Inkubation von 500 μ l Probe mit 100 μ l 1 N HCl für 10 min bei RT und anschließender Neutralisierung mit 100 μ l 1,2 N NaOH/0,5 M HEPES.

IL-23 aus den Überständen wurde mittels eines ELISA Ready-SET-Go! Set nach den Gebrauchsempfehlungen des Herstellers detektiert.

2.7 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie stellt ein leistungsfähiges Werkzeug zur Analyse von Oberflächenmolekülen, DNS, Zellzyklen oder auch der Signaltransduktion auf Einzelzellebene dar. Die parallele Detektierung und Quantifizierung von derzeit bis zu 17 Oberflächenmolekülen fußt auf deren Markierung mit Fluorchrom-konjugierten Antikörpern und der anschließenden Messung des von ihnen nach Anregung emittierten Lichts.

Dazu werden die Zellen über einen konstanten Flüssigkeitsstrom hydrodynamisch fokussiert und vereinzelt mit einer Genauigkeit von weniger als 1 μ m am Messpunkt vorbeigeleitet. Dort trifft der Flüssigkeitsstrahl auf das monochromatische Licht eines Lasers (488 nm Argonionenlaser beim FACS Calibur), das beim Auftreffen auf Zellen und Partikel im laminaren Probenstrom abgelenkt wird. Um 180° abgelenktes Licht wird als Vorwärtsstreulicht (*forward scatter*) bezeichnet. Es wird von einer Photodiode detektiert und korreliert mit der Größe der gemessenen Zelle. Mit zunehmender Anzahl und Größe der Organellen in den Zellen wird ein Teil des Laserlichts verstärkt im 90° Winkel seitlich abgelenkt; es wird als Seitwärtsstreulicht (*side scatter*) bezeichnet und gilt als Maß für die Granularität einer Zelle.

Zur Quantifizierung weiterer Eigenschaften können die Zellen direkt mit einem Fluoreszenzfarbstoff gefärbt oder mit Fluorchrom-Antikörpern markiert werden. Die Farbstoffe absorbieren das anregende Laserlicht und emittieren anschließend Licht einer höheren Wellenlänge. Dabei sollten die Maxima der Absorptions- und Emissionsspektren ausreichend voneinander entfernt liegen. Hierbei werden

Laserquellen mit unterschiedlichen Wellenlängen und Fluorochromen, die Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren, eingesetzt.

2.7.1 Färbung der Zellen mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern

Waschpuffer	PBS mit 0,1 % NaN ₃ und 2 % FCS, filtriert, pH 7,4
Blockpuffer	Waschpuffer mit 10 % Humanserum
Mikrotiterplatte	96-Napf-Platte mit Rundboden für die Ak-Inkubation; BD Falcon, Heidelberg
FACS-Röhrchen	12x 75 mm Probenröhrchen; BD Pharmingen, Heidelberg
Antikörper	CD1a- Allophycocyanin (APCy) (HI149) mIgG1, CD40-Phycoerythrin (PE) (5C3) mIgG1, CD80-Fluoreszein-Isothiocyanat (FITC) (L307.4) mIgG1, CD83-PE (HB15e) mIgG1, CD86-PE (FUN-)1 mIgG1, CD181/CXCR1/IL-8RA/CD128a-APCy (5A12) mIgG2, CD182/CXCR2/IL-8RB/CD128b-FITC (6C6) mIgG1, CCR7 (2H4) mIgM, IgG1-Isotyp (MOPC-21), IgG2b-Isotyp (27-35), Anti-IgM-Biotin (G20-127) mIgG1, Streptavidin-APCy (Sav-APCy-Konjugat); alle BD Pharmingen, Heidelberg CD54-PE (84H10) mIgG1, CD207/Langerin-PE (DCGM4) mIgG1, HLA-DR-FITC/PE (B8.12.2) mIgG2b; alle Coulter, Krefeld CD11c-FITC (3.9) mIgG1, CD40-FITC (B-B20) mIgG1; alle Dianova, Hamburg
Substanzen zur intrazellulären Färbung	Brefeldin A, Cytotfix/Cytoperm; BD Biosciences, Heidelberg 12-O-Tetradecanoylphorbol-13-Acetat (TPA), Ionomycin; Sigma-Aldrich, München
Intrazelluläre Antikörper	IFN-γ-APCy (25723.11); BD Biosciences, Heidelberg IL-9-PE (MH9D1), IL-17A-PE (eBio64DEC17), IL-22 Alexa Fluor 647 (22URTI); eBioscience, Frankfurt am Main

Vor der eigentlichen Färbung der Oberflächenmoleküle der Zellen mit den Fluorochrom-konjugierten Antikörpern wurden die Zellen mit Serumproteinen, PBS mit 10% humanem Serum, resuspendiert, in FACS-Röhrchen überführt und zur

Blockierung der Fc-Rezeptoren inkubiert (50 µl Blockpuffer auf 10^5 Zellen für 10 min auf Eis). Anschließend erfolgte die Färbung: In jeden Ansatz wurden 1-10 µl der spezifischen Antikörper pipettiert. Die Suspensionen in den FACS-Röhrchen wurden mittels des Vortexers vermischt und dann für 45 min auf Eis abgedunkelt inkubiert. Danach wurden 10^5 Zellen mit 1 ml Waschpuffer zweimal bei 260 g, 4°C und 4 min gewaschen, in 500 µl Waschpuffer resuspendiert und sofort gemessen. Beim Einsatz biotinylierter Antikörper wurden die Zellen nach der Antikörperinkubation zweimal gewaschen und in 50 µl mit 0,5 µg/ml Streptavidin-APCy für 30 min inkubiert.

Das Natriumazid im Waschpuffer inhibierte die Endozytose sowie Quervernetzung von Zelloberflächenproteinen (*patching*), deren Akkumulation an einem Pol der Zelle (*capping*) und den Abwurf der Komplexe.

Für die intrazelluläre Färbung wurden die Zellen in der Kokultur zunächst für 4 h mit 5 ng/ml TPA und 500 ng/ml Ionomycin in Anwesenheit von 1 µg/ml Brefeldin A restimuliert. TPA und Ionomycin simulieren die Stimulation des TCR und Kostimulation, so dass die T-Zellen unabhängig von ihrer Rezeptorspezifität angeregt werden. Brefeldin A hemmt die Funktion des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi-Apparates, so dass sich die produzierten Zytokine in den Zellen anreichern.

Anschließend wurden die Zellen für 20 min mit Cytofix/Cytoperm, das Paraformaldehyd enthält, durch Denaturierung und Präzipitation von Proteinen und deren Seitenketten fixiert und ihre Zellwand durch Detergenzien permeabilisiert. Schließlich erfolgte die Färbung mit den jeweiligen Farbstoffen für 30 min abgedunkelt auf Eis.

Für jede Stimulations-/Differenzierungssituation der Zellen wurden Isotypen-Kontrollen durchgeführt.

2.7.2 Messung der Zellen und Analyse

FACS Flow	Trägerflüssigkeit; BD Pharmingen, Heidelberg
FACS-Calibur	Durchflusszytometer; BD Pharmingen, Heidelberg
CellQuest	Analyse-Software; BD Pharmingen, Heidelberg

Die Messung der Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer FACS-Calibur durchgeführt. Dieses verfügt über einen 480 nm Argonionenlaser, der FITC, PE und PE-Cyanin5-Fluorochrome anregen kann, sowie über einen Dioden-Laser, der APCy-Farbstoffe bei 635 nm anregt.

Die Signale der Lichtstreuung nach vorn und zur Seite wurden mit linearer Verstärkung, die Signale der Fluoreszenz mit logarithmischer Verstärkung detektiert. Zelltrümmer wurden über die Einstellung des *threshold*-Levels aus der Analyse ausgeschlossen. Vor den Messungen der Proben wurde die Verstärkung der Detektoren-Empfindlichkeit über die Isotypen-Kontrollen individuell für jede Zellpopulation eingestellt, sodass Isotyp-gefärbte Zellen im Histogramm links in der ersten Dekade lagen. Es wurden die Fluoreszenzsignale von 10^4 Zellen aufgenommen bzw. bei Mischpopulationen die Signale von 5×10^3 Zellen. Die Fluoreszenzüberlappungen von den Einzelfärbungen wurden elektronisch kompensiert. Die bei Zellen aus der Kultur auftretende Autofluoreszenz wurde durch eine Region in der zweidimensionalen *dot blot*-Analyse von den positiven Signalen subtrahiert. Es wurden der Messwert „% positive Zellen“ als solche Zellen, die höhere Kanalwerte als die Isotypen-Kontrolle hatten, und die Differenz der mittleren Fluoreszenzintensitäten von Probe zu Isotypen-Kontrolle ausgewertet. Messergebnisse wurden wie in Publikationen üblich grafisch als *overlay*-Histogramm der Probe über die Isotypen-Kontrolle dargestellt.

2.8 Datenverarbeitung und statistische Auswertung

Microsoft Office 2007

Microsoft Deutschland GmbH, Unterschleißheim

Alle Versuche wurden mindestens viermal durchgeführt. Bezüglich der FACS-Analysen wurden repräsentative Darstellungen ausgewählt. Aus den einzelnen Ergebnissen der Messungen im ELISA wurde das arithmetische Mittel gebildet und die Standardabweichung von diesem Mittelwert berechnet. Zur Berechnung statistischer Signifikanzen wurde der zweiseitige t-Test nach Student durchgeführt. P-Werte (Signifikanzwert) kleiner als 0,05 wurden als signifikant angesehen. Die statistische Auswertung und graphische Aufarbeitung wurde mit *Excel* ausgeführt. Die Graphiken wurden in *PowerPoint* überführt, bearbeitet und schließlich in *Word* exportiert.

3 Ergebnisse

3.1 Vergleich der Methoden Adhärenz, Positivisolierung und Depletion in TLR2 stimulierten DC

In der vorliegenden Arbeit wurden MoLC und MoDC aus adhärenzten Monozyten generiert. Die Eigenschaften durch Adhärenz isolierter Monozyten sollten mit denen von Monozyten, die durch die Isolierungsverfahren Positivselektion bzw. Depletion per MACS gewonnen wurden, verglichen werden. Hierbei wurde der *buffy coat* eines Spenders in drei Teile fraktioniert und die Monozyten mit den eingehends genannten Methoden isoliert.

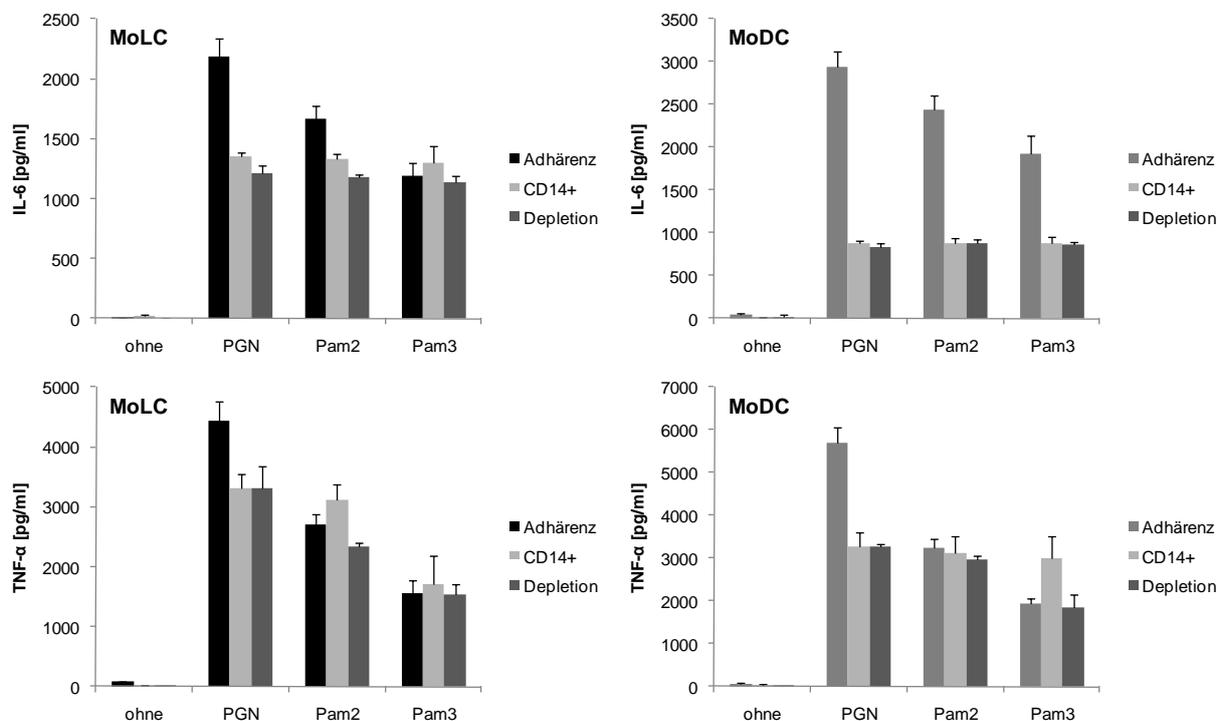


Abb. 3: Sekretion von IL-6 und TNF- α durch MoLC und MoDC nach unterschiedlichen Methoden der Monozyten-Gewinnung und Stimulation mit PGN, Pam₂ und Pam₃ Monozyten wurden erstens durch Adhärenz auf sterilen Gewebekultur-Schalen (schwarz), zweitens durch ein positives Selektionsverfahren über die Markierung von CD14 mit einem monoklonalen Antikörper per MACS (hellgrau) und drittens durch ein negatives Selektionsverfahren, bei dem kontaminierende Leukozytenpopulationen mit Magnetbeads-gekoppelten Antikörpern markiert und im MACS zurückgehalten wurden (dunkelgrau), aus PBMC isoliert. Anschließend wurden sie für 48 h mit PGN, Pam₂ und Pam₃ stimuliert. Die Balken zeigen Mittelwerte, denen Standardabweichungen aufgesetzt sind. Sie sind repräsentativ für drei Experimente mit Zellen unterschiedlicher Spender, für ein Experiment wurden PBMC eines Spenders in drei Teile geteilt und mit den drei Methoden separat präpariert.

Es zeigten sich bei MoLC und MoDC nach Stimulation mit dem TLR2-Liganden PGN, dem TLR2/6-Liganden Pam₂ und dem TLR1/2-Liganden Pam₃ vergleichbare Level in der Sekretion von IL-6 und TNF- α (Abb. 3).

Insgesamt wurde die Sekretion der Zytokine in aus adhärirten Monozyten generierten MoLC und MoDC stärker hoch reguliert und schien sensibler auf die unterschiedlichen Stimuli zu reagieren, als dies bei isolierten Zellen beobachtet werden konnte.

3.2 Vergleich unterschiedlicher TLR2-Liganden

3.2.1 Sekretion von IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-1 β und IL-12p70

Es sollten die Reifung und Sekretion durch MoLC und MoDC nach Stimulation mit PGN, das sowohl das TLR1/2- als auch das TLR2/6-Hetreodimer bindet, mit der Reifung und Sekretion nach Stimulation mit dem TLR2/6-Liganden Pam₂ und dem TLR1/2-Liganden Pam₃ verglichen werden. Hierzu wurden verschiedene Zytokine untersucht. Dabei sollte ermittelt werden, in welchen Mengen IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-1 β und IL-12p70 durch MoLC nach Stimulation des TLR2 sezerniert werden und in welchem Ausmaß die HLA-DR-, CD40-, CD86-, CD1a-, CD80-, CD83-Expression hoch reguliert wird.

Wie vorher in Abb. 3 gezeigt, setzten MoLC und MoDC IL-6 und TNF- α nach Stimulation mit den unterschiedlichen TLR2-Liganden frei, für beide Zelltypen galt: PGN stimulierte stärker als Pam₂ und Pam₂ stärker als Pam₃ die Freisetzung der Zytokine. Die spontane Sekretion von TGF- β wurde durch keinen der Stimuli signifikant beeinflusst (Abb. 4, Daten für MoDC nicht gezeigt). IL-12p70 wurde nach Stimulation mit PGN von beiden Zelltypen in keinen relevanten Mengen sezerniert (Daten nicht gezeigt).

Zudem wurde die Sekretion von IL-1 β durch MoLC untersucht. Während die Stimulation mit PGN zur Sekretion signifikanter Mengen von IL-1 β führte, wurde es nach Stimulation mit Pam₂ oder Pam₃ nicht freigesetzt.

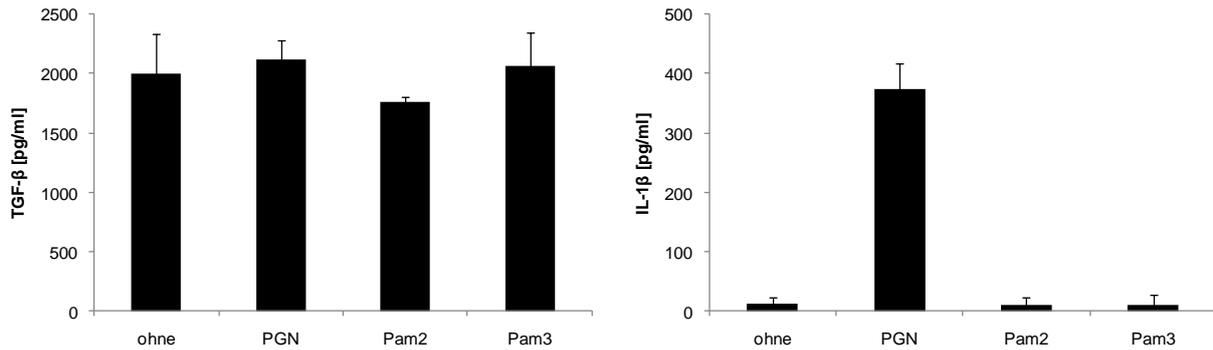


Abb. 4: Sekretion von TGF- β und IL-1 β durch MoLC nach Stimulation mit unterschiedlichen TLR2-Liganden. Nach 48 h Stimulation mit PGN, Pam₂ oder Pam₃ wurde die Konzentration der oben genannten Zytokine im Zellkultur-Überstand mit Hilfe des ELISA gemessen. Die Balken geben einen Mittelwert wieder, dem eine Standardabweichung aufgesetzt ist. Sie sind repräsentativ für vier Experimente mit Zellen unterschiedlicher Spender.

3.2.2 Expression von HLA-DR, CD40, CD86, CD1a, CD80 und CD83 auf MoLC nach Stimulation mit PGN, Pam₂ und Pam₃

Die Oberflächenmoleküle HLA-DR, CD40, CD86, CD1a, CD80 und CD83 wurden auf MoLC bei Aktivierung hoch reguliert detektiert (Abb. 5). Hierbei ließen sich mit großen Anteilen positiver Zellen und hohen mittleren Fluoreszenzintensitäten die deutlichsten Effekte nach der Stimulation mit dem TLR2-Liganden PGN beobachten. Nur bezüglich HLA-DR war der positive Anteil der gemessenen Zellen nach Stimulation mit dem TLR1/2-Ligand Pam₃ am größten. Zudem war Pam₃ ein moderater Induktor von CD1a und CD80. Dagegen war der TLR2/6-Ligand Pam₂ ein moderater von CD40, CD86 und CD83.

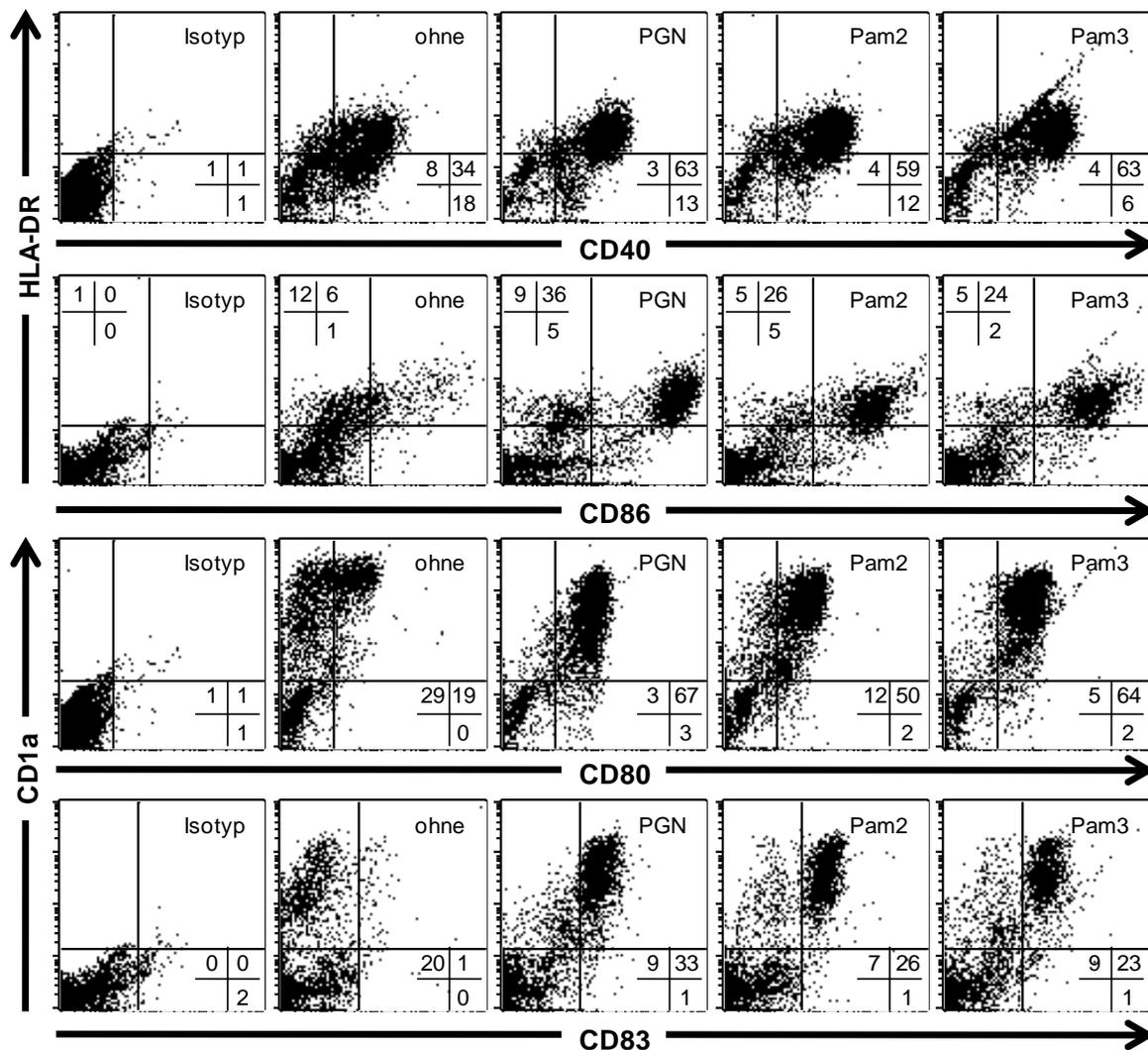


Abb. 5: HLA-DR-, CD40-, CD86-, CD1a-, CD80-, CD83-Expression auf MoLC bei Stimulation mit unterschiedlichen TLR2-Liganden. Nach 48 h Stimulation mit PGN, Pam₂ und Pam₃ wurden die Oberflächenmarker im FACS gemessen. Das ins Bild eingefügte Zahlenkreuz zeigt die prozentuale Verteilung der MoLC-Population in den Quadranten. Die nach dem Isotyp festgelegten Quadranten ermöglichen die Unterscheidung von dem Oberflächenmolekül nach positiven und negativen Zellen: Der untere linke Quadrant zeigt die doppelt negativen Zellen, der obere linke und der untere rechte die einfach positiven und der obere rechte die doppelt positiven Zellen. Die Dotplot repräsentieren Ergebnisse von n=4 Versuchen mit unterschiedlichen Spendern.

3.2.3 Stimulation mit PGN bei Blockade des TLR2

Durch Gabe eines TLR2 blockierenden Antikörpers vor der Stimulation sollte untersucht werden, wie PGN über den TLR2-Rezeptor gebunden spezifisch die Sekretion von Zytokinen beeinflusst. Dazu wurden zwei unterschiedliche Antikörper, die von den Herstellern als TLR2 blockierend beschrieben wurden, verwendet. Nur der T2.5-

Antikörper führte zu einer signifikanten Reduktion der Sekretion von IL-6 und TNF- α (Abb. 6). Dagegen wurde die Sekretion von TNF- α nach Blockierung mit dem Antikörper 11G7 in geringem Maße und die Sekretion von IL-6 gar nicht beeinflusst.

Desweiteren sollte eine Partizipation der NOD1/2-Rezeptoren, an die PGN prinzipiell binden kann, durch die Stimulation der MoLC mit M-Tri_{DAP} (NOD1/2) und MDP (NOD2) untersucht werden. Die Stimulation des NOD1/2-Rezeptors mit M-Tri_{DAP} und des NOD2 mit MDP führte zu keiner relevanten Sekretion von IL-6, IL-1 β oder IL-12p70 (Daten nicht gezeigt).

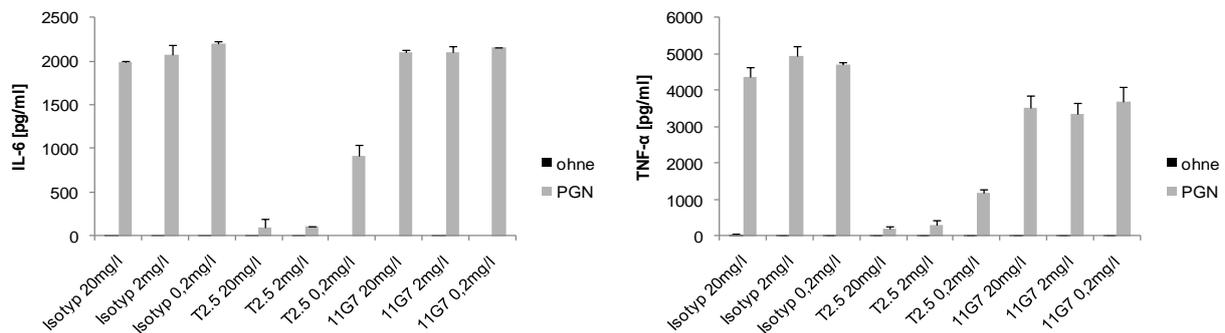


Abb. 6: Die Sekretion von IL-6 und TNF- α nach Stimulation mit PGN nach vorangegangener Inkubation der MoLC mit TLR2-Rezeptor blockierenden Antikörpern T2.5 und 11G7. MoLC wurden für 30 min mit einem Isotyp oder TLR2-Rezeptor blockierenden Antikörpern T2.5 bzw. 11G7 in drei unterschiedlichen Konzentrationen inkubiert. Danach wurden die Zellen für 48 h mit PGN zur Sekretion von IL-6 bzw. TNF- α angeregt und die Konzentration im ELISA gemessen. Die Balken geben einen Mittelwert an, dem eine Standardabweichung aufgesetzt ist. Sie sind repräsentativ für vier Experimente mit Zellen unterschiedlicher Spender.

3.2.3 Resümee

Insgesamt erwies sich PGN unter den verwendeten TLR2-Liganden als stärkster Induktor der Sekretion proinflammatorischer Zytokine und der Hoch-Regulierung der Reifungsmarker auf MoLC. Der sekretorische Effekt von PGN auf MoLC ließ sich durch die Blockierung des TLR2 unterdrücken.

3.3 Stimulation von MoLC und MoDC mit PGN und CD40L

3.3.1 Sekretion von IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-12p70 und IL-1 β durch MoLC und MoDC nach Stimulation mit PGN und CD40L

Nachdem in den oben genannten Versuchen Stimulation und Blockierung des TLR2 etabliert worden waren, sollte untersucht werden, wie MoLC und MoDC auf die simultane Stimulation mit dem TLR2-Liganden PGN und CD40L reagierten und ob sich aus dieser Kostimulation ein synergistischer Effekt auf die Sekretion der Zytokine und Chemokine ergäbe. Desweiteren sollte neben der Sekretion auch die Expression von Oberflächenmarkern auf MoLC und MoDC gemessen werden, um einen Zusammenhang zwischen Reifung der Zellen und der Sekretion herstellen zu können.

Beide Zelltypen sezernierten nach Stimulation mit PGN IL-6 und TNF- α (Abb. 7). Die simultane Stimulation mit PGN und CD40L führte zu keiner Hoch-Regulierung der freigesetzten Menge an IL-6 oder TNF- α durch MoDC und MoLC. Weiter wurde die spontane Sekretion von TGF- β weder durch PGN noch durch die Kombination von PGN und CD40L signifikant beeinflusst. IL-12p70 wurde bei Stimulation mit PGN allein durch MoLC und MoDC nicht freigesetzt. Jedoch führte die simultane Stimulation mit PGN und CD40L sowohl bei MoLC und MoDC zu einer signifikanten Hoch-Regulierung des freigesetzten IL-12p70. Nur MoDC sezernierten IL-12p70 in einer biologisch relevanten Größenordnung aus. Die Freisetzung von IL-1 β wurde bereits durch die Stimulation mit PGN in MoLC und MoDC induziert. Allein in MoLC wurde die Sekretion von IL-1 β durch die Kostimulation mit PGN und CD40L signifikant hoch reguliert.

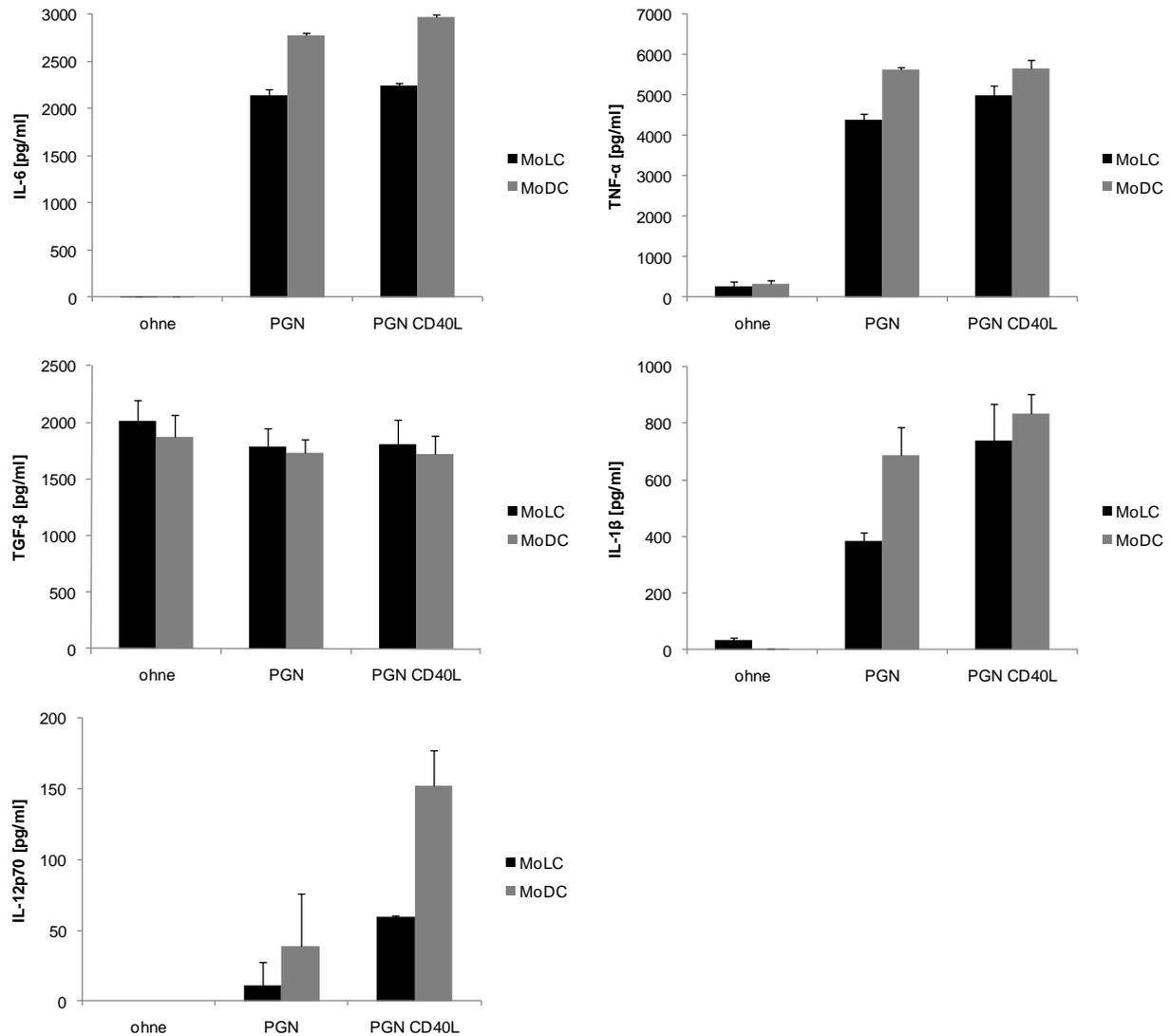


Abb. 7: Sekretion von IL-6, TNF- α , TGF- β , IL-12p70 und IL-1 β durch MoLC und MoDC nach Stimulation mit PGN bzw. PGN und CD40L. MoLC und MoDC wurden für 48 h mit PGN bzw. PGN und CD40L stimuliert. Danach wurde die Konzentration der oben genannten Zytokine im Überstand mit Hilfe des ELISA gemessen. Die Balken geben einen Mittelwert wieder, dem eine Standardabweichung aufgesetzt ist. Sie sind repräsentativ für vier Experimente mit Zellen unterschiedlicher Spender.

3.3.2 Expression der Reifungsmarker CD86, HLA-DR, CD83 und CD80 auf MoLC und MoDC nach Stimulation mit PGN und CD40L

Um die Effekte auf die Sekretion in einen Zusammenhang mit der Reifung der DC setzen zu können, wurde die Expression von Reifungsmarkern auf MoLC und MoDC nach Stimulation mit PGN und CD40L untersucht.

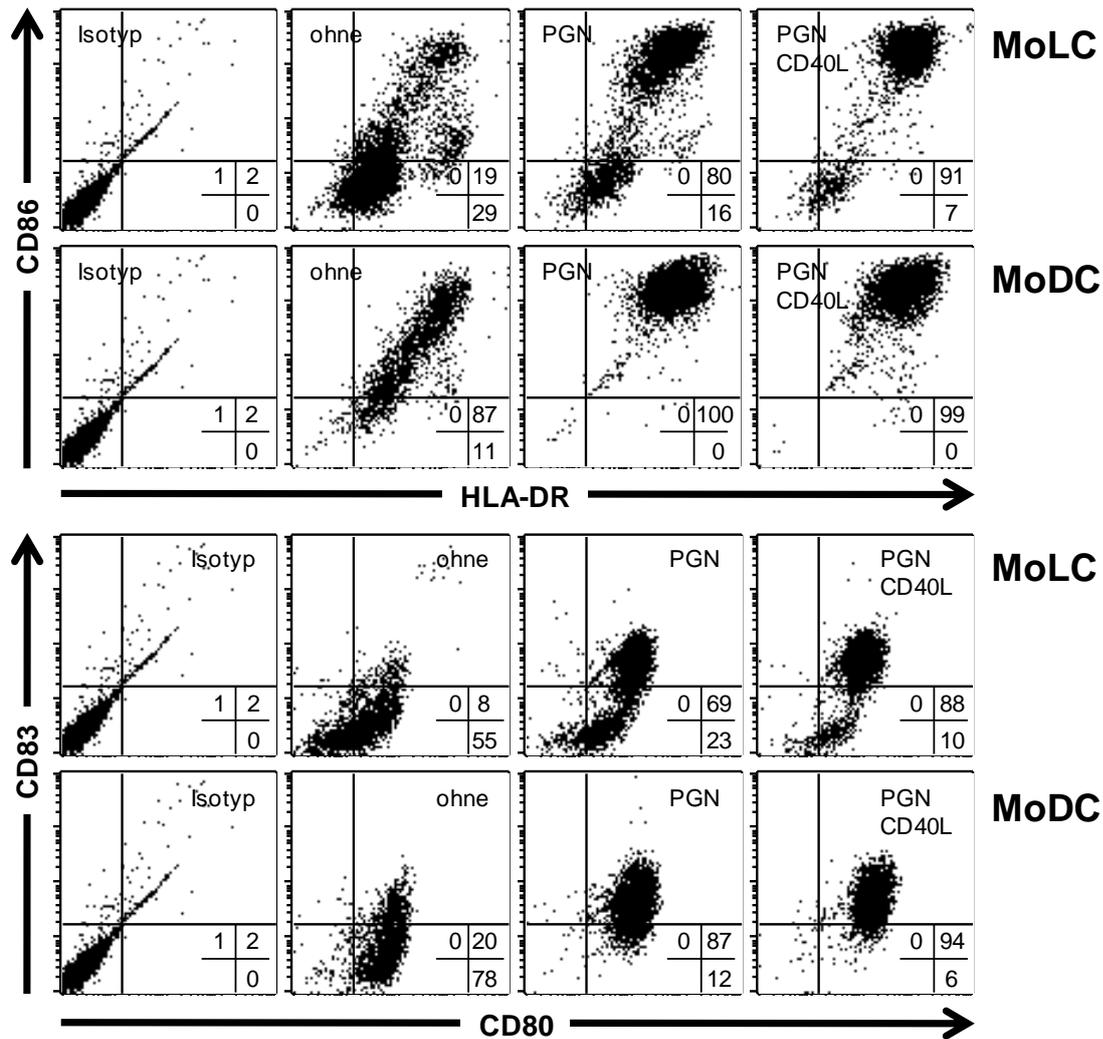


Abb. 8: CD86-, HLA-DR-, CD83- und CD80-Expression auf MoLC und MoDC. MoLC und MoDC wurden für 48 h mit PGN bzw. mit PGN und CD40L stimuliert, die Zellen anschließend mit gegen CD86, HLA-DR, CD83 und CD80 gerichteten fluoreszenzgekoppelten Antikörpern gefärbt und die Fluoreszenzintensität auf den MoLC und MoDC im FACS gemessen. Das ins Bild eingefügte Zahlenkreuz zeigt die prozentuale Verteilung der MoLC- bzw. MoDC-Population in den Quadranten. Die nach der Färbung mit Isotyp festgelegten Quadranten ermöglichen die Unterscheidung von dem Oberflächenmolekül nach positiven und negativen Zellen: Der untere linke Quadrant zeigt die doppelt negativen Zellen, der obere linke bzw. der untere rechte die einfach positiven und der obere rechte die doppelt positiven Zellen. Die Dotplot repräsentieren Ergebnisse von n=3 Versuchen mit unterschiedlichen Spendern.

Auch bezüglich der Expression der mit der Reifung von DC assoziierten Oberflächenmoleküle CD86, HLA-DR, CD83 und CD80 zeigten MoLC und MoDC ein ähnliches, jedoch nicht übereinstimmendes Verhalten: Beide exprimierten nach Stimulation mit PGN die oben genannten Oberflächenmoleküle (Abb. 8). Dieser Effekt wurde durch die Kostimulation mit CD40L noch verstärkt. Bei MoLC steigerte sich der Prozentsatz der für CD86 und HLA-DR doppelt positiven Zellen von 80% auf 91% und der für

CD83 und CD80 doppelt positiven Zellen von 69% auf 88%. Im Gegensatz dazu waren MoDC bezüglich der Expression von CD86 und HLA-DR schon durch die Stimulation mit PGN voll aktiviert (100%). Der Anteil der für CD83 und CD80 doppelt positiven Zellen stieg von 87% auf 94% an. Als Ergebnis ließ sich festhalten, dass sich MoLC und MoDC bis auf die vollständige Aktivierung der MoDC bezüglich der Expression von CD86 und HLA-DR gleichsinnig verhalten.

3.3.3 Resümee

Insgesamt verhielten sich MoLC und MoDC durchaus gleichsinnig. So führte die kombinierte Stimulation mit PGN und CD40L in beiden Zelltypen zu einer signifikanten Hoch-Regulierung der Reifungsmarker und der IL-12p70-Sekretion. IL-6 und TNF- α blieben von diesem Effekt unberührt. IL-1 β hingegen konnte nur in MoLC induziert werden.

3.4 Sekretion von Zytokinen nach simultaner Stimulation der DC mit LPS und anderen TLR-Liganden

3.4.1 Simultane Stimulation der MoLC mit LPS, PolyI:C und PolyU

In den bisher vorgestellten Versuchen wurden MoLC und MoDC nach Stimulation mit verschiedenen TLR2-Liganden und nach der simultanen Kombination mit dem TLR2-Liganden PGN und CD40L untersucht. Nun sollte die Wirkung der kombinierten Stimulation mit unterschiedlichen TLR-Liganden auf MoLC und MoDC hinsichtlich der Sekretion unterschiedlicher Zytokine untersucht werden. Die kombinierte Stimulation der TLR sollte hierbei simultan erfolgen, um die Entwicklung einer Kreuztoleranz, wie sie vorübergehend nach sequentieller Stimulation von MyD88-gekoppelten TLR auftreten kann, zu verhindern. Zunächst sollten auf MoLC der TLR3 mit PolyI:C, der TLR4 mit hoch gereinigtem LPS aus *Salmonella minnesota* (*S. minnesota*) und der TLR8 mit PolyU einzeln und in Kombination stimuliert werden und die Sekretion von IL-6, IL-1 β , IL-12p70 und TGF- β in den Überständen gemessen werden.

Die Einzelstimulation mit PolyI:C führte nur bezüglich IL-1 β zu einer signifikanten Sekretion durch MoLC, nicht bei IL-6 und IL-12p70 (Abb. 9). Unter der Stimulation mit

PolyU wurden weder IL-6, IL-1 β noch IL-12p70 freigesetzt. Die kombinierte Stimulation der MoLC mit PolyI:C und PolyU führte zu einer relevanten Sekretion von IL-6, die nicht größer als der additive Wert der Einzelstimuli war. Die simultane Stimulation mit PolyI:C und LPS führte zu einer signifikanten Hoch-Regulierung der Freisetzung von IL-6 durch MoLC im Sinne eines Synergismus – die sekretierte Menge an IL-6 nach kombinierter Stimulation war also größer, als die Summe der Einzelstimuli zu erwarten ließ. Die kombinierte Stimulation der MoLC mit LPS und PolyU oder mit PolyI:C, PolyU und LPS führten zu keiner relevanten Veränderung der freigesetzten Menge an IL-6. Ebenso wurde IL-1 β nach Stimulation mit PolyI:C und LPS vermehrt sezerniert, während die gleichzeitige Gabe aller drei Stimuli keinen Synergismus zeigte.

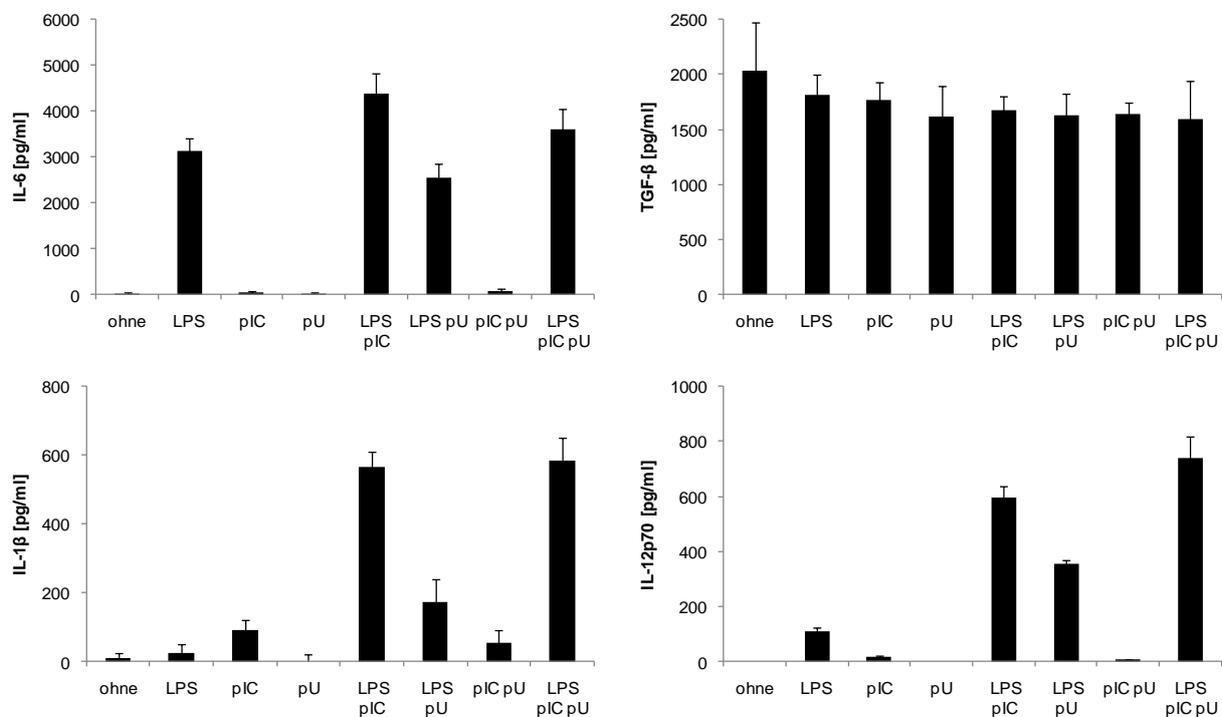


Abb. 9: Sekretion von IL-6, TGF- β , IL-1 β und IL-12p70 durch MoLC und MoDC nach Einzelstimulation und Stimulation in Kombination mit unterschiedlichen TLR-Liganden. MoLC wurden 48 h mit LPS, PolyI:C (pIC) und PolyU (pU) einzeln und in Kombination stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration von IL-6, TGF- β , IL-1 β und IL-12p70 im Überstand mit Hilfe des ELISA gemessen. Die Balken geben einen Mittelwert wieder, dem eine Standardabweichung aufgesetzt ist. Sie sind repräsentativ für vier Experimente mit Zellen unterschiedlicher Spender.

Die Sekretion von IL-12p70 wurde durch die Stimulation der MoLC mit LPS induziert; nach Stimulation mit PolyI:C oder PolyU wurden keine relevanten Mengen an IL-12p70 sezerniert. Die simultane Stimulation der MoLC mit LPS in Kombination mit PolyI:C oder PolyU führte zur Sekretion großer Mengen an IL-12p70. Die Sekretion

wurde nach simultaner Stimulation mit LPS, PolyI:C und PolyU gegenüber der nach Stimulation mit LPS und PolyI:C nicht weiter hoch reguliert. Die sekretierte Menge an TGF- β änderte sich nach Stimulation der TLR nicht.

3.4.2 Kostimulation der MoLC und MoDC mit LPS, MALP-2 und Flagellin

Im Vergleich der Einzelstimuli wurde bezüglich MoLC die größte Menge an IL-6 nach Stimulation mit LPS sezerniert; die sezernierte Menge nach Stimulation mit dem TLR2/6-Liganden MALP-2 betrug etwa ein Drittel (Abb. 10). Nach der Stimulation mit Flagellin aus *Bacillus subtilis* fand keine signifikante Sekretion von IL-6 statt. Bei kombinierter Stimulation der MoLC mit LPS und MALP-2 wurde die freigesetzte Menge an IL-6 synergistisch hoch reguliert. Die dreifache Stimulation mit LPS, MALP-2 und dem TLR5-Liganden Flagellin führte zu keiner signifikanten Hoch-Regulierung der sezernierten Menge IL-6 gegenüber der Kostimulation mit LPS und MALP-2. Flagellin schien im Allgemeinen keinen Effekt auf die durch MoLC freigesetzte Menge an IL-6 auszuüben.

Ähnlich wurde die Sekretion von IL-1 β in MoLC durch die Stimulation mit LPS, MALP-2 und Flagellin beeinflusst. MoLC setzten erst nach der simultanen Stimulation mit LPS und MALP-2 bzw. LPS, MALP-2 und Flagellin große Mengen IL-1 β frei. Die sekretierte Menge an IL-1 β war hierbei im Sinne eines Synergismus größer, als die Summe der Einzelstimuli erwarten ließ. Darüber hinaus zeigte die Kombination von LPS und Flagellin einen synergistischen Effekt auf die Sekretion von IL-1 β durch MoLC. Hingegen sezernierten MoLC bei kombinierter Stimulation mit LPS und MALP-2 keine relevanten Mengen an IL-12p70.

Bezüglich der von MoDC sezernierten Menge IL-6 konnte bei keiner Kombination von LPS mit MALP-2 oder Flagellin eine signifikante Änderung der unter Einzelstimulation sezernierten Menge beobachtet werden. MALP-2 in Kombination mit Flagellin schien die Sekretion zu hemmen.

Die Sekretion von IL-1 β durch MoDC wurde durch die Kombination von LPS und MALP-2 sowie die Dreierkombination aus LPS, MALP-2 und Flagellin synergistisch hoch reguliert. Die dreifache Stimulation mit LPS, MALP-2 und Flagellin führte hierbei zu keiner Hoch-Regulierung der sezernierten Menge IL-1 β gegenüber der simultanen Stimulation mit LPS und MALP-2. Die Sekretion von IL-12p70 in MoDC wurde nur durch die kombinierte Stimulation mit LPS und MALP-2 synergistisch hoch reguliert.

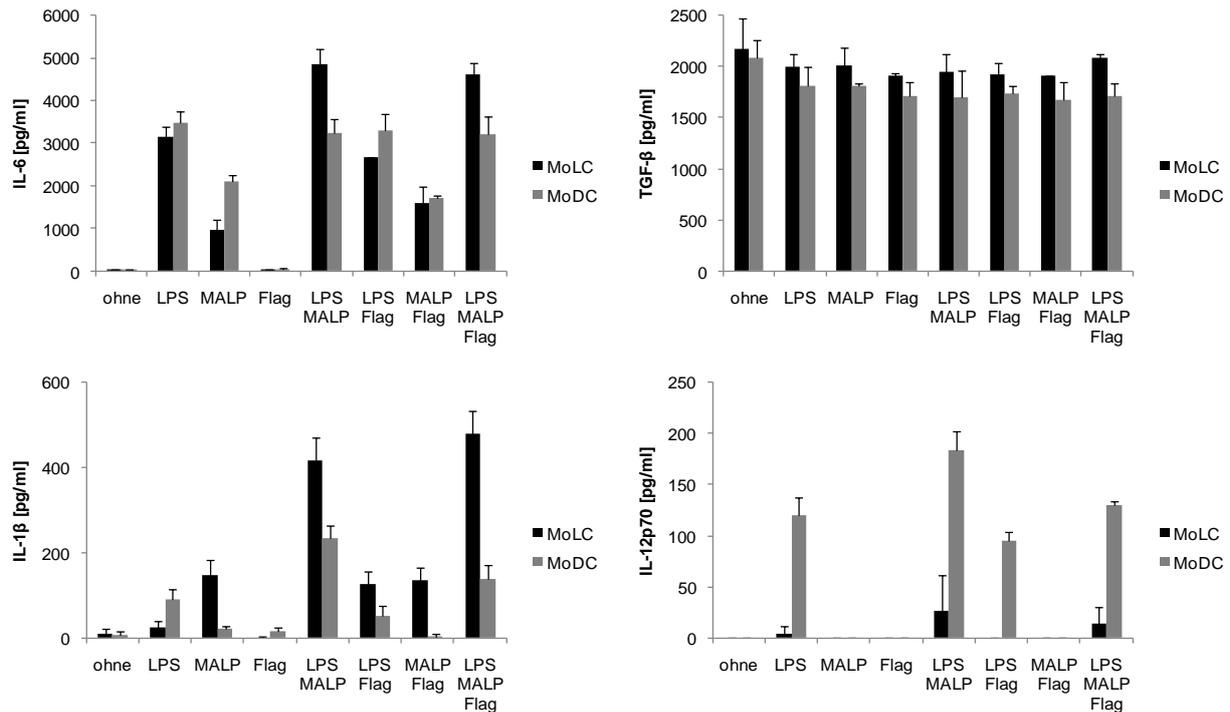


Abb. 10: Sekretion von IL-6, TGF- β , IL-1 β und IL-12p70 durch MoLC und MoDC nach Einzelstimulation und Stimulation in Kombination mit unterschiedlichen TLR-Liganden. MoLC und MoDC wurden 48 h mit LPS, MALP-2 (MALP) und Flagellin einzeln und in Kombination stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration von IL-6, TGF- β , IL-1 β und IL-12p70 im Überstand mit Hilfe des ELISA gemessen. Die Balken zeigen Mittelwerte, denen Standardabweichungen aufgesetzt sind. Sie sind repräsentativ für vier Experimente mit Zellen unterschiedlicher Spender.

3.4.3 Resümee

Bei der simultanen Stimulation mehrerer TLR zeigte sich, dass die Kombination der Stimulation des TLR3 und des TLR4 eine synergistische Wirkung auf die Sekretion von IL-6, IL-1 β und IL-12p70 und die des TLR3 und TLR8 eine synergistische auf die Sekretion von IL-12p70 durch MoLC ausübt.

Die kombinierte Stimulation des TLR2 und TLR4 mit MALP-2 und LPS unterschied sich in ihrem Effekt je nach stimuliertem Zelltyp. Bei kombinierter Stimulation mit LPS und MALP-2 wurde in MoLC die freigesetzte Menge an IL-6 und IL-1 β synergistisch hoch reguliert, während diese Kombination in MoDC zur synergistischen Hoch-Regulierung von IL-1 β und IL-12p70 führte. Der zu beobachtende Effekt auf die Sekretion variiert also je nach stimulierten Rezeptoren, Zelltyp und gemessenem Zytokin.

3.5 Stimulation von DC mit unterschiedlichen TLR-Liganden in Kombination

3.5.1 Der Effekt der kombinierten Stimulation mit PGN, LPS und DNS auf die Zytokinsekretion durch MoLC, MoDC und pDC

Nach der Identifikation einer synergistischen Wirkung der Kombination des TLR2/6-Liganden MALP-2 und des TLR4-Liganden LPS auf die Sekretion durch MoLC und MoDC sollte die Wirkung der kombinierten Stimulation mit dem TLR2-Liganden PGN, dem TLR4-Liganden LPS und dem TLR9-Liganden DNS auf MoLC, MoDC und pDC hinsichtlich Reifung und Sekretion von IL-6, TGF- β , IL-1 β , IL-12p70 und IL-23 untersucht werden.

Bei MoLC, MoDC und ebenso pDC führte der TLR4-Ligand LPS als Einzelstimulus zur größten Freisetzung von IL-6, dessen Sekretion nach Stimulation mit dem TLR9-Liganden DNS ausblieb (Abb. 11). Die simultane Stimulation mit DNS in Kombination mit PGN oder LPS führte zu keiner relevanten Hoch-Regulierung der Sekretion von IL-6, TGF- β und IL-12p70 in MoLC, MoDC und pDC. Die sezernierte Menge an IL-6 wurde bei der Zweierkombination von PGN und LPS gegenüber der Einzelstimulation für MoLC, MoDC und pDC signifikant hoch reguliert, die Sekretion durch MoLC im Sinne eines Synergismus. Eine signifikante Hoch-Regulierung der Freisetzung von IL-6 nach der kombinierten Stimulation mit PGN, LPS und DNS im Vergleich zur simultanen Stimulation mit PGN und LPS fand ausschließlich in MoDC statt; die Freisetzung durch MoLC und pDC änderte sich nicht.

Die Sekretion von IL-1 β wurde in den verschiedenen DC-Populationen unterschiedlich stark induziert. Grundsätzlich war MoLC, MoDC und pDC gemeinsam, dass sie größere Mengen an IL-1 β nach der Stimulation mit PGN und keines nach der Stimulation mit DNS freisetzen. Dabei war sowohl für MoLC als auch MoDC PGN der stärkste Einzelstimulus. Für pDC war dies LPS. Mit LPS stimulierte MoDC setzten nur geringe Mengen IL-1 β frei. Desweiteren führte die kombinierte Stimulation der MoDC zu keiner Änderung der sezernierten Mengen an IL-1 β . Die Sekretion von IL-1 β durch pDC und MoLC hingegen wurde nach der simultanen Stimulation mit PGN und LPS hoch reguliert; die Sekretion der MoLC wurde sogar synergistisch hoch reguliert. Die kombinierte Stimulation mit PGN und DNS führte nur bei MoLC zu einer signifikanten Hoch-Regulierung des freigesetzten IL-1 β . Bei der

gleichzeitigen Stimulation mit PGN, LPS und DNS war die sezernierte Menge an IL-1 β bezüglich MoLC im Vergleich zur simultanen Stimulation mit PGN und LPS nicht signifikant größer und bezüglich pDC sogar kleiner.

Die spontane Sekretion von TGF- β wurde wie in den vorangegangenen Versuchen von der Stimulation nicht beeinflusst. Die Menge an freigesetztem TGF- β war bei MoLC und MoDC vergleichbar und bei pDC am geringsten.

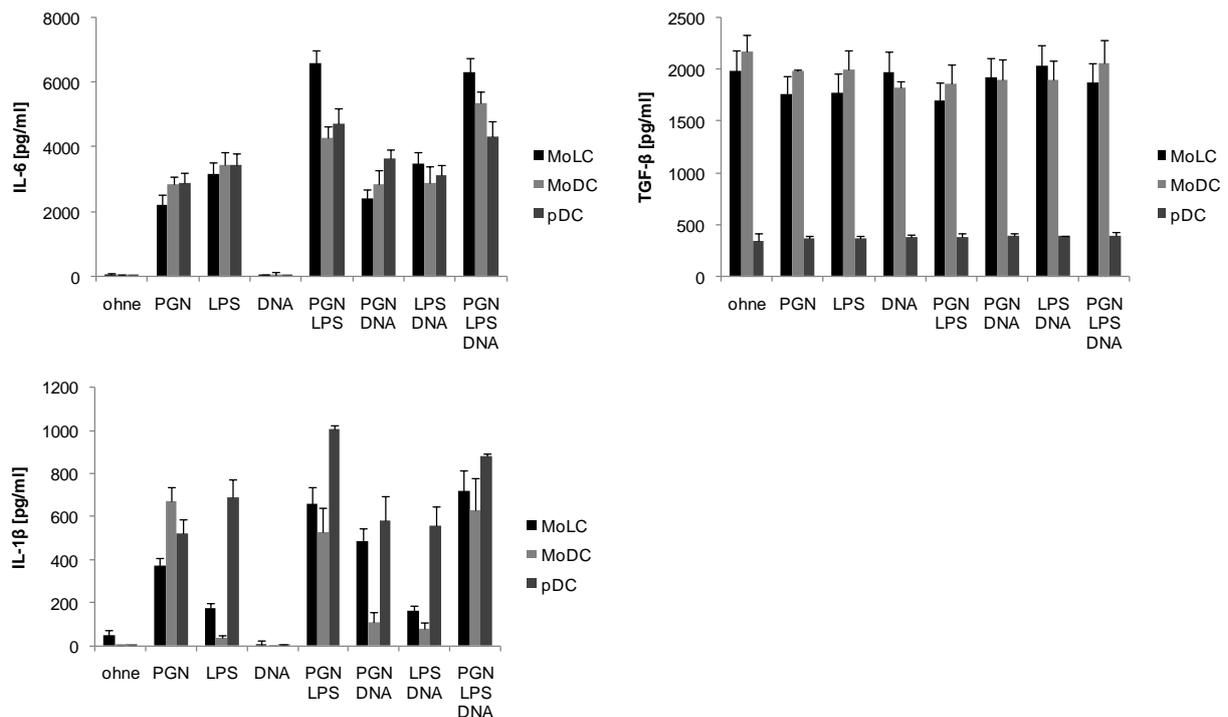


Abb. 11: Sekretion von IL-6, TGF- β und IL-1 β durch MoLC, MoDC und pDC nach Einzelstimulation und Stimulation in Kombination mit diversen TLR-Liganden. MoLC, MoDC und pDC wurden 48 h mit PGN, LPS bzw. DNS (DNA) einzeln und in Kombination stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration der oben genannten Zytokine im Überstand mit Hilfe des ELISA gemessen. Die Balken geben einen Mittelwert wieder, dem eine Standardabweichung aufgesetzt ist. Sie sind repräsentativ für vier Experimente mit Zellen unterschiedlicher Spender.

Nach Stimulation der MoLC mit PGN, LPS und DNS wurde keine relevante Freisetzung von IL-12p70 beobachtet (Abb. 12). MoDC hingegen sezernierten nach der Stimulation mit LPS und mit LPS in Kombination mit PGN und/oder DNS größere Mengen IL-12p70. Die Kombination von LPS und DNS zeigte keinen Unterschied zur Einzelstimulation mit LPS. Jedoch wurde die Sekretion von IL-12p70 durch MoDC nach der simultanen Stimulation mit LPS und PGN synergistisch hoch reguliert. Die gleichzeitige Gabe von LPS, PGN und DNS führte zu keiner weiteren Hoch-Regulierung.

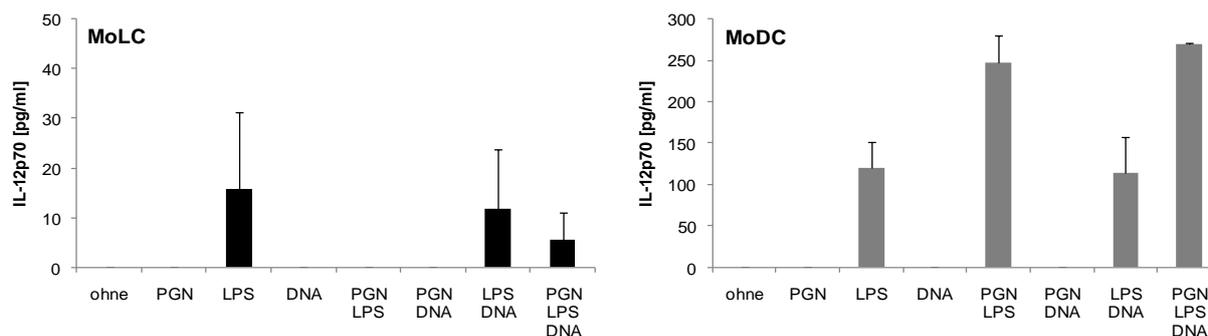


Abb. 12: Sekretion von IL-12p70 durch MoLC und MoDC nach Einzelstimulation und Stimulation in Kombination mit unterschiedlichen TLR-Liganden. MoLC und MoDC wurden 48 h mit PGN, LPS und DNS (DNA) einzeln und in Kombination stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration von IL-12p70 im Überstand mit Hilfe des ELISA gemessen. Die Balken geben einen Mittelwert wieder, dem eine Standardabweichung aufgesetzt ist. Sie sind repräsentativ für vier Experimente mit Zellen unterschiedlicher Spender.

Auch die Sekretion von IL-23 wurde nach der kombinierten Stimulation der MoLC und pDC hoch reguliert (Abb. 13). So führte die simultane Gabe von PGN und LPS zu einer synergistischen Hoch-Regulierung der Sekretion durch MoLC. Nach der Stimulation mit DNS setzten MoLC keine relevanten Mengen IL-23 frei. Die Kombination von PGN oder LPS mit DNS zeigte keinen Effekt auf die Sekretion im Vergleich zur Einzelstimulation. Demgegenüber wurde bei Einzelstimulation der pDC die größte Menge IL-23 nach Gabe von DNS sezerniert, während PGN nur eine geringe sekretorische Wirkung zeigte. Andererseits führte auch bei pDC die kombinierte Stimulation mit PGN und LPS zu einer synergistischen Hoch-Regulierung der Sekretion bis auf das Niveau nach kombinierter Stimulation mit LPS und DNS. In der Dreierkombination fiel die Sekretion auf das Niveau der Einzelstimuli zurück.

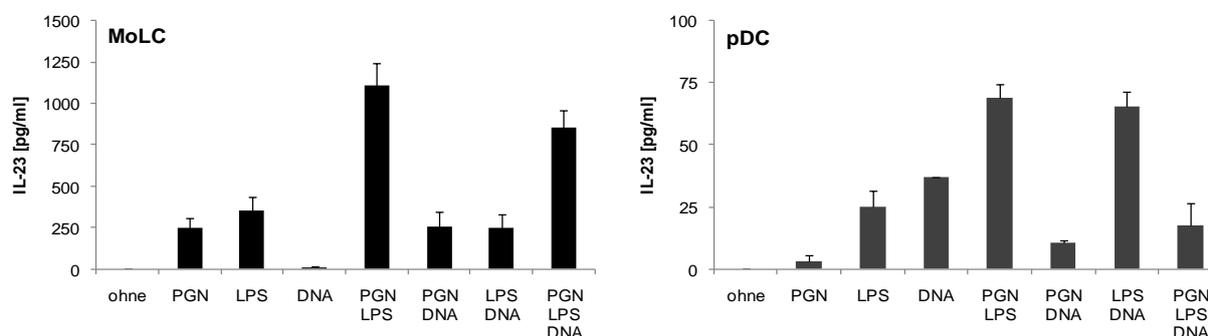


Abb. 13: Sekretion von IL-23 durch MoLC und pDC nach Einzelstimulation und Stimulation in Kombination mit verschiedenen TLR-Liganden. MoLC und pDC wurden 48 h mit PGN, LPS und DNS (DNA) einzeln und in Kombination stimuliert. Anschließend wurde die Konzentration von IL-23 im Überstand per ELISA gemessen. Die Balken geben einen Mittelwert wieder, dem eine Standardabweichung aufgesetzt ist. Sie sind repräsentativ für vier Experimente mit Zellen unterschiedlicher Spender.

3.5.2 Der Effekt der kombinierten Stimulation mit PGN, LPS und DNS auf die Expression kostimulatorischer Moleküle und Reifungsmarker auf MoLC

Ebenso wie in der vorangegangenen Untersuchung der Zytokinsekretion durch DC führte die Kombination unterschiedlicher TLR-Liganden zu einer Hoch-Regulierung der Expression kostimulatorischer Moleküle und Reifungsmarker auf der Oberfläche von MoLC.

In Bezug auf die Chemokinrezeptoren CXCR1 und CXCR2 zeigten sich zwar keinerlei Veränderungen der Expression nach Stimulation; jedoch wurde die Expression der Reifungsmarker CD86 und CD80 sowie des Chemokinrezeptors CCR7 hoch reguliert (Abb. 14). So waren nach Gabe von PGN und LPS als Einzelstimuli 65% bzw. 62% der gemessenen Zellen für HLA-DR und CD86 doppelt positiv gegenüber 8% ohne Stimulation. Und nach Kombination der beiden Stimuli waren sogar 74% der Zellen doppelt positiv. Die Kombination mit DNS, das als Einzelstimulus keinen Effekt gezeigt hatte, zeigte einen positiven Effekt: Bei der kombinierten Stimulation mit PGN und DNS waren es 70% und mit LPS und DNS 67% doppelt positive Zellen. Die meisten doppelt positiven wurden dann auch bei der Kombination aller drei Stimuli detektiert: Hier waren es 80%.

Bei der Änderung der Expression von CD86 ließen sich nur geringe prozentuale Änderungen des Anteils positiver Zellen beobachten. Denn bereits bei der Einzelstimulation lag der relative Anteil der CD86 positiven Zellen bei 98% (PGN) und 99% (LPS). Dennoch ließ sich auf einen Effekt der kombinierten Stimulation bezüglich der Expression von CD86 schließen. So lässt sich bei Betrachtung der Verschiebung und Konzentration der Zellpopulation erkennen, dass diese an Dichte gewann und sich immer weiter in den positiven Bereich verschob. Am deutlichsten ließ sich dies bei der kombinierten Stimulation mit PGN, LPS und DNS erkennen. Am geometrischen Mittel (Geo Mean) zeigte sich die Hoch-Regulierung der Expression von CD86 auf den MoLC bei kombinierter Stimulation mit PGN und LPS und mit PGN, LPS und DNS im Vergleich zu der Einzelstimulation mit PGN oder LPS (siehe Tabelle des Geo Mean in Abb. 14).

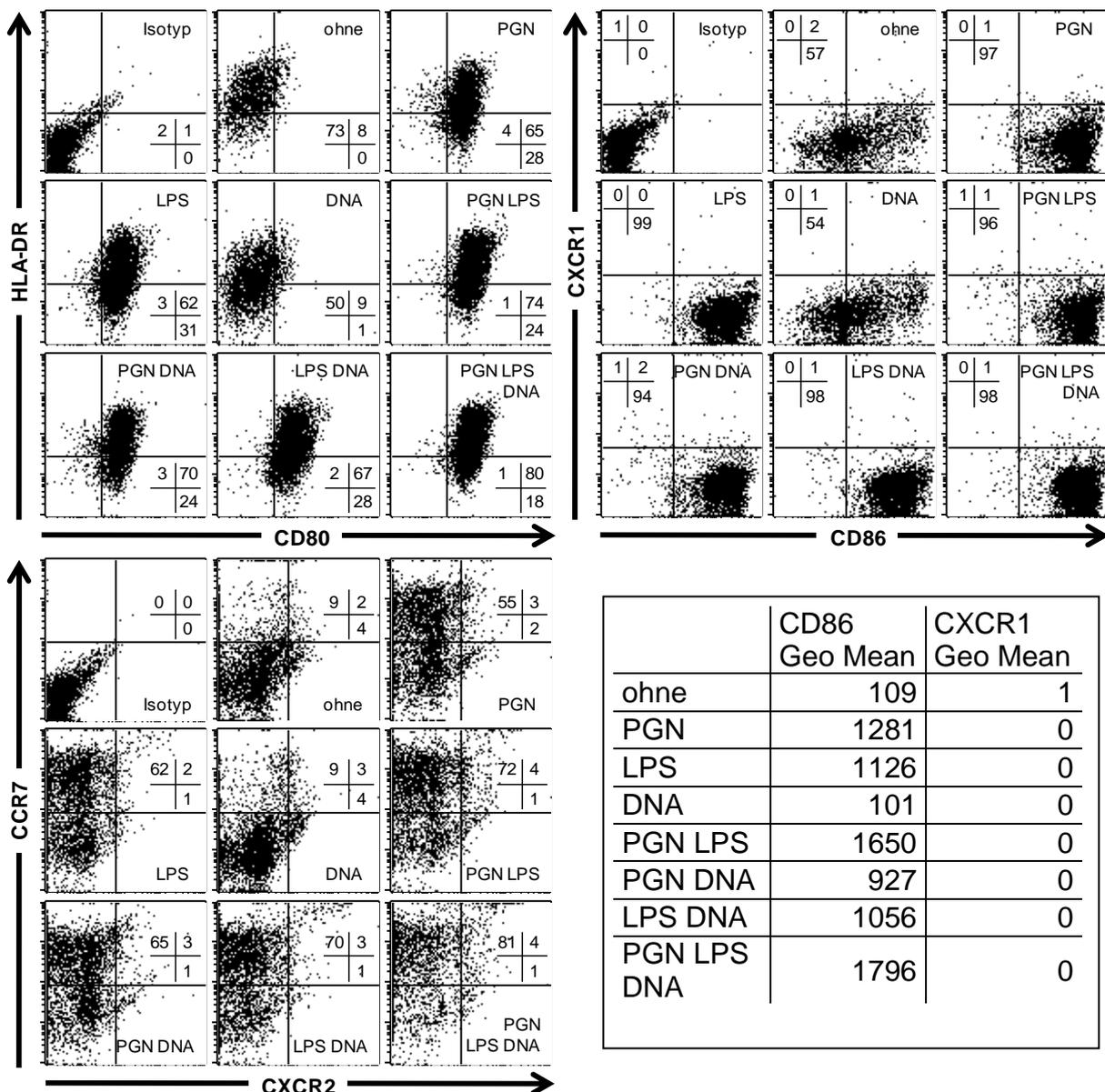


Abb. 14: Expression von HLA-DR, CD80, CXCR1, CD86, CCR7 und CXCR2 auf MoLC. MoLC wurden 48 h vor der Messung im FACS mit PGN, LPS bzw. DNS (DNA) einzeln und in Kombination stimuliert und anschließend die oben genannten Oberflächenmarker im FACS gemessen. Das ins Bild eingefügte Zahlenkreuz zeigt die prozentuale Verteilung der MoLC-Population in den Quadranten. Die nach dem Isotyp festgelegten Quadranten ermöglichen die Unterscheidung von dem Oberflächenmolekül nach positiven und negativen Zellen: Der untere linke Quadrant zeigt die doppelt negativen Zellen, der obere linke bzw. der untere rechte die einfach positiven und der obere rechte die doppelt positiven Zellen. Die Tabelle gibt den geometrischen Mittelwert auf der Abszisse(CD86) bzw. Ordinate(CXCR1) aus dem rechtsoben stehenden Diagramm wieder. Die Dotplot repräsentieren Ergebnisse von n=4 Versuchen mit unterschiedlichen Spendern.

Die Hoch-Regulierung der Expression des CCR7 ließ sich an dem Prozentsatz der positiven Zellen nachvollziehen (Abb. 14). Zunächst waren nur 11% der gemessenen Zellen ohne Stimulation positiv. Unter der Gabe von PGN und LPS stieg der Anteil

der CCR7 exprimierenden Zellen auf 58% (PGN) und 64% (LPS) an. Nach der simultanen Stimulation mit PGN und LPS exprimierten bereits 76% der Zellen CCR7. Und auch die Stimulation mit DNS, das als Einzelstimulus keine Auswirkungen auf die Expression hatte, führte in Kombination mit PGN oder LPS zu einer Zunahme der CCR7 positiven MoLC im Vergleich zur Einzelstimulation: 68% positiver Zellen in Kombination mit PGN und 73% in Kombination mit LPS. Wiederum ließ sich der stärkste Effekt nach der Dreierstimulation beobachten. Dabei stieg der Anteil der positiven Zellen auf 85% an.

Die Expression von CD54 und bedingt auch die von CD40 wurde auf MoLC nach der kombinierten Stimulation hoch reguliert (Abb. 15). So stieg der Anteil CD54 positiver Zellen von 32% nach Stimulation mit PGN über 48% nach kombinierter Stimulation mit PGN und LPS und 47% nach der mit PGN und DNS bis auf 83% nach der kombinierten Stimulation mit PGN, LPS und DNS an.

Ein weniger einheitliches Bild ergab sich für die Expression von CD40. In der CD40-gegen-CCR7-Färbung war nach der simultanen Stimulation mit PGN und LPS der Anteil LPS CD40 positiver Zellen mit 77% am größten. Bei Einzelstimulation mit PGN waren 41% CD40 positiv und bei der mit LPS 45%. Zudem wurde auch nach kombinierter Stimulation mit PGN und DNS die Expression von CD40 auf MoLC hoch reguliert: Es waren 68% der gemessenen Zellen CD40 positiv. Demgegenüber führte die Dreierstimulation nur bei 63% der Zellen zur Expression von CD40. Und wie auch schon bei der CXCR2-gegen-CCR7-Färbung zeigte sich eine Hoch-Regulierung der Expression von CCR7 nach kombinierter Stimulation. Diese überschritt bezüglich der Stimulation mit PGN in Kombination mit LPS oder DNS die additiv zu erwartende relative Menge an CCR7 positiven und doppelt positiven Zellen.

3.5.3 Resümee

In Zusammenschau von Zytokinsekretion und Expression der Oberflächenmoleküle zeigte sich, dass die Kombination der Stimuli PGN und LPS zu einer Hoch-Regulierung der Sekretion von IL-6, IL-1 β und IL-23 und der Expression von CD40, CD80, CD86 und CCR7 in MoLC führte. In MoDC wurde die Sekretion von IL-12p70 und in den pDC die von IL-23 nach der Stimulation mit LPS und PGN synergistisch hoch reguliert. Die kombinierte Stimulation mit PGN, LPS und DNS führte zu keiner

weiteren Hoch-Regulierung. Auch hier zeigte sich, dass die synergistischen Effekte je nach Zelltyp und Zytokin variieren.

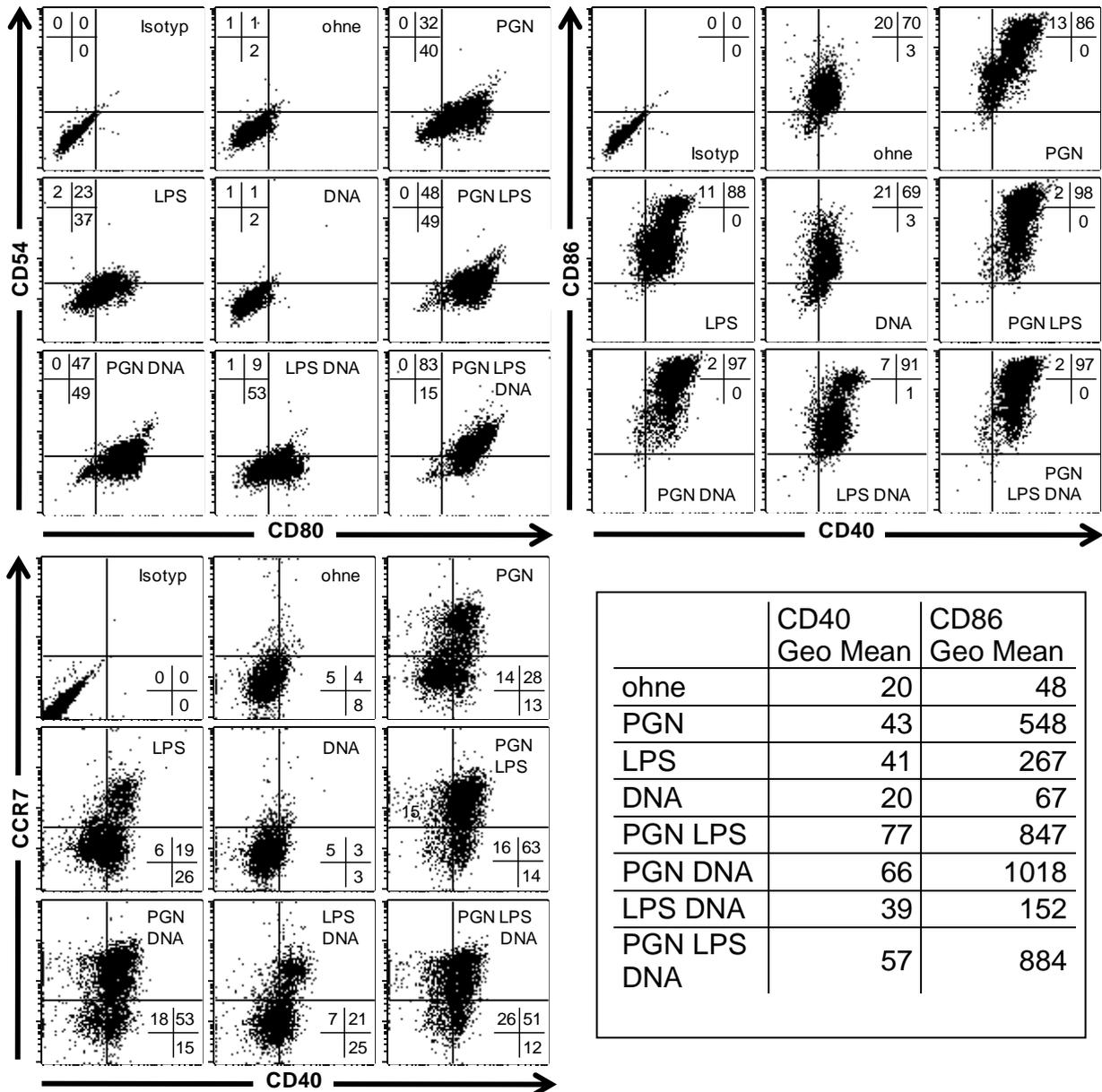


Abb. 15: CD54-, CD80-, CD86-, CD40- und CCR7-Expression auf MoLC nach Stimulation mit unterschiedlichen TLR-Liganden einzeln und in Kombination. MoLC wurden 48 h vor der Messung im FACS mit PGN, LPS bzw. DNS (DNA) einzeln und in Kombination stimuliert und anschließend die oben genannten Oberflächenmarker im FACS gemessen. Das ins Bild eingefügte Zahlenkreuz zeigt die prozentuale Verteilung der MoLC-Population in den Quadranten. Die nach dem Isotyp festgelegten Quadranten ermöglichen die Unterscheidung von dem Oberflächenmolekül nach positiven und negativen Zellen: Der untere linke Quadrant zeigt die doppelt negativen Zellen, der obere linke bzw. der untere rechte die einfach positiven und der obere rechte die doppelt positiven Zellen. Die Tabelle gibt den geometrischen Mittelwert auf der Abszisse (CD86) bzw. Ordinate (CD40) aus dem rechtsoben stehenden Diagramm wieder. Die Dotplot repräsentieren Ergebnisse von n=3 Versuchen mit unterschiedlichen Spendern.

3.6 Kombiniert TLR stimulierte MoLC und CD4⁺T-Zellen in Kokultur

3.6.1 Der Effekt kombiniert TLR stimulierter MoLC auf CD4⁺T-Zellen in der Kokultur

Nachdem der Effekt der kombinierten Stimulation mit unterschiedlichen TLR auf die Zytokinsekretion und Reifung der MoLC untersucht worden war, sollte nun in der Kokultur der Effekt der so stimulierten MoLC auf CD4⁺T_H-Zellen studiert werden. Um bei den Untersuchungen möglichst die Gegebenheit *in vivo* zu simulieren, wurde auf die Zugabe von IL-2, blockierenden Antikörpern und kostimulatorischen CD3/CD28-*beads* verzichtet.

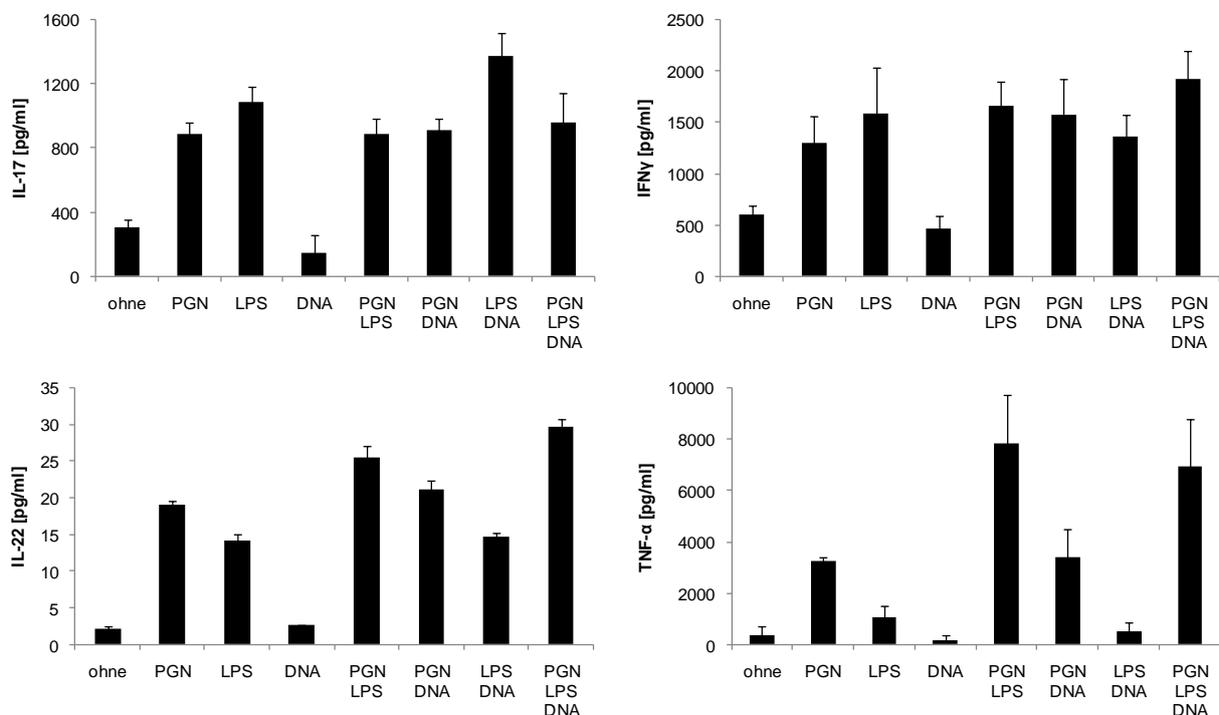


Abb. 16: IL-17, IFN- γ , IL-22 und TNF- α in den Überständen der Kokultur aus CD4⁺T-Zellen und TLR stimulierten MoLC. MoLC wurden 48 h mit PGN, LPS und DNS (DNA) einzeln und in Kombination stimuliert. Anschließend wurden die MoLC gewaschen und in eine Kokultur mit allogenen CD4⁺T-Zellen überführt. Nach fünf Tagen Kokultur wurde die Konzentration der oben genannten Zytokine im Überstand mit Hilfe des ELISA gemessen. Die Balken geben einen Mittelwert wieder, dem eine Standardabweichung aufgesetzt ist. Sie sind repräsentativ für vier Experimente mit Zellen unterschiedlicher Spender.

IL-17 und IFN- γ konnte bereits in der Kokultur nicht stimulierter MoLC und CD4⁺T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 16). Bei der Einzelstimulation konnten die größten Mengen IL-17 und IFN- γ nach Stimulation mit LPS und die größten Mengen IL-22 und TNF- α nach Stimulation mit PGN nachgewiesen werden. Nur nach der kombi-

nierten Stimulation mit LPS und DNS wurde die Sekretion von IL-17 signifikant hoch reguliert. Die Sekretion von IFN- γ wurde durch kombinierte Stimulation im Vergleich zur Einzelstimulation mit LPS oder PGN nicht hoch reguliert. Nur LPS führte zum prozentualen Anstieg der gemessenen IL-17⁺IFN- γ ⁺Zellen, der mit einer Abnahme des Anteils der IL-17⁺Zellen und einer Zunahme der IFN- γ ⁺Zellen einherging (Abb. 17). Während der Anteil der IFN- γ ⁺Zellen nach kombinierter Stimulation mit LPS und DNS zunahm, wurde die Sekretion von IFN- γ nicht hoch reguliert (Abb.17, Abb. 16).

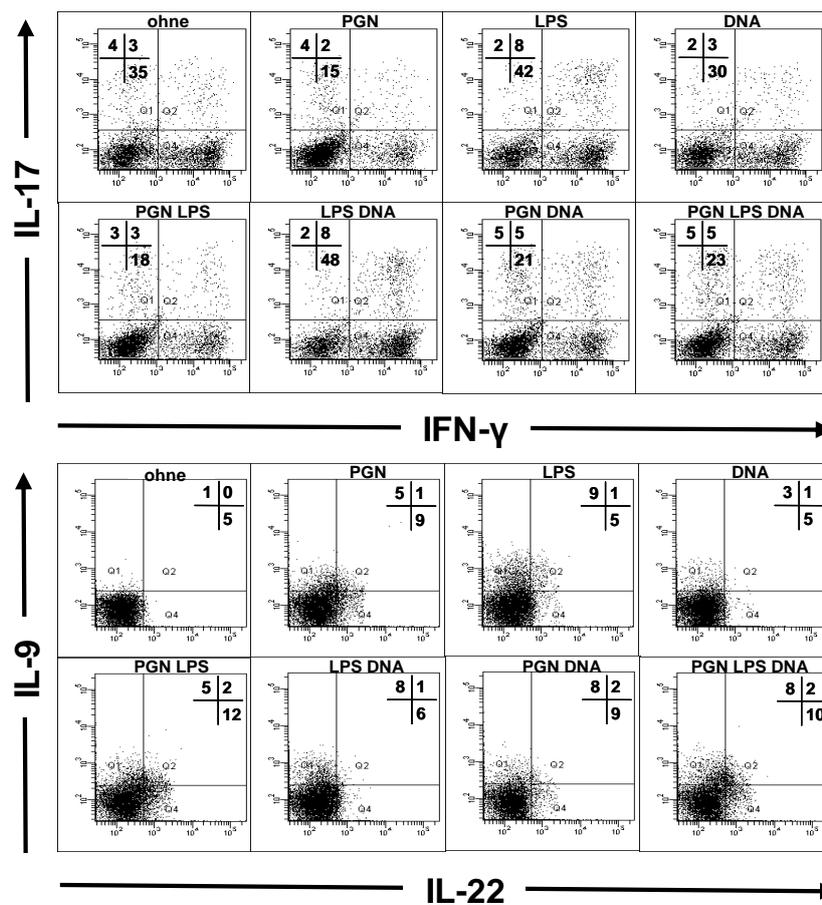


Abb. 17: Intrazelluläre Färbung von IL-17, IFN- γ , IL-9 und IL-22 in CD4⁺T-Zellen nach Kokultur mit TLR stimulierten MoLC. MoLC wurden 48 h mit PGN, LPS und DNS (DNA) einzeln und in Kombination stimuliert. Anschließend wurden die MoLC gewaschen und in eine Kokultur mit allogenen CD4⁺T-Zellen überführt. Nach fünf Tagen Kokultur erfolgte die intrazelluläre Färbung von IL-17, IFN- γ , IL-9 und IL-22 und die anschließende Analyse im FACS. Das ins Bild eingefügte Zahlenkreuz zeigt die prozentuale Verteilung der CD4⁺T-Zellen in den Quadranten. Die nach dem Isotyp festgelegten Quadranten ermöglichen die Unterscheidung von positiven und negativen Zellen: Der untere linke Quadrant zeigt die doppelt negativen Zellen, der obere linke bzw. der untere rechte die einfach positiven und der obere rechte die doppelt positiven Zellen. Die Dotplot repräsentieren Ergebnisse von n=3 Versuchen mit unterschiedlichen Spendern.

Die kombinierte Stimulation mit PGN und LPS führte zu einer Hoch-Regulierung der freien Mengen an IL-22 und TNF- α in den Überständen der Kokultur (Abb. 16). Die kombinierte Stimulation mit PGN, LPS und DNS führte zu keiner weiteren Hoch-Regulierung. Auch bei der intrazellulären Färbung stieg der Anteil IL-22 positiver Zellen nach Stimulation mit PGN an (Abb. 17). Und die kombinierte Stimulation mit PGN und LPS führte zu einer noch stärkeren Induktion IL-22 positiver Zellen. Zellen, die ausschließlich IL-9 exprimierten, konnten nach der Stimulation mit LPS detektiert werden. Der Anteil der IL-9 positiven Zellen wurde durch die Kombination von LPS mit PGN oder DNS nicht beeinflusst. In den Überständen der Kokulturen mit den IL-9 oder IL-22 positiven Zellen konnte mit Hilfe des ELISA kein IL-4 nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

3.6.2 Resümee

Die Ergebnisse zeigten keine Korrelation zwischen intrazellulär in den T-Zellen nachweisbaren Zytokinen und der Menge in den Überständen der Kokultur. Die kombinierte Stimulation mit LPS und DNS führte zur Hoch-Regulierung des freien IL-17 und des Anteils der IFN- γ ⁺Zellen, während der Anteil der IL-17⁺Zellen und die Sekretion von IFN- γ nicht hoch reguliert wurden. Die kombinierte Stimulation mit PGN und LPS hingegen führte zu einer Hoch-Regulierung der freien Mengen an IL-22 und TNF- α und starken Induktion IL-22 positiver Zellen.

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit sollten die Effekte von Kombinationen unterschiedlicher TLR-Liganden auf Reifung und Zytokinsekretion von MoLC und MoDC untersucht werden. Weiter sollte die Fähigkeit von DC betrachtet werden, T_H-Zellen zu aktivieren und dadurch ein Zytokinmilieu *in vitro* zu erzeugen, wie es auch bei den entzündlichen Erkrankungen der Haut Psoriasis, atopischer Dermatitis und allergischer Kontaktdermatitis gefunden werden kann (42).

MoDC und MoLC werden generell als Äquivalente der epidermalen LC bzw. dermalen DC angesehen. Sie weisen einen unreifen Phänotyp mit geringer Expression von CD83 und CD86 auf (56). Diese Zellen reifen unter dem Einfluss externer Stimuli, zu denen mikrobielle Bestandteile zählen, die von den TLR erkannt werden. Epidermale LC und dermale DC exprimieren in besonderem Maße TLR1, TLR2, TLR3, TLR4, TLR6 und TLR7, während die Expression von TLR9 vor allem für pDC charakteristisch ist (57, 59). Der TLR9 wird ebenso wie der TLR5 und TLR8 nur in geringer Rezeptordichte von LC und DC exprimiert (57, 59). Um *in vivo* Situationen, wie sie nach Verlust der epidermalen Barrierefunktion anzutreffen sind, zu imitieren, wurden Kombinationen unterschiedlicher TLR-Liganden in direkter Exposition gegenüber den Zellen eingesetzt. Diese multi-PAMP-Exposition der DC wurde mit der Stimulation mit dem TLR2/6-Agonisten MALP-2, dem TLR4-Agonisten LPS und dem TLR5-Agonisten Flagellin, mit der Stimulation mit dem TLR3-Liganden PolyI:C, LPS und dem TLR8-Liganden PolyU, und mit der Stimulation mit dem TLR2-Liganden PGN, LPS und dem TLR9-Liganden bakterielle DNS simuliert. Diese Kombinationen sind gegen Rezeptoren des endosomalen Kompartiments und der Zelloberfläche gerichtet. Von den in dieser Arbeit relevanten Rezeptoren ist der TLR9 intrazellulär in endosomalen Kompartimenten und die TLR2 und 4 auf der Zelloberfläche lokalisiert (55).

PGN bindet im Gegensatz zu anderen Lipopeptiden sowohl das TLR1/2-Dimer als auch das TLR2/6-Dimer, während MALP-2 und das synthetische Analogon Pam₂ nur das TLR2/6-Dimer und Pam₃ nur das TLR1/2-Dimer bindet (45, 52, 43). Der gemeinsame Signaltransduktionsweg der TLR2-Komplexe führt über MyD88 zur Phos-

phorylierung von IRAK1, 2 und 4 und mündet in der Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie NF- κ B (86). Beide Stimulationswege induzieren eine Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α durch MoLC und MoDC. Desweiteren wurde die Expression der Reifungsmarker CD40, D80, CD83, CD86 und HLA-DR durch CD1a positive MoLC induziert (52). Durch Inhibition der Rezeptorfunktion mit einem gegen TLR2 gerichteten Antikörper (Klon T2.5) konnte die Menge des sezernierten IL-6 und TNF- α bei Ligand stimulierten Zellen bis auf das Niveau von nicht stimulierten Zellen gesenkt werden. In Übereinstimmung mit diesen in vitro Befunden ist für den T2.5-Antikörper bereits eine Verhinderung von TLR2-induzierten, dem septischen Schock ähnlichen Syndromen in klinischen Studien nachgewiesen worden (52, 99). Mit dem vom Hersteller als blockierend beschriebenen Antikörperklon 11G7 konnte keine signifikante Senkung der Sekretion erreicht werden. Daher ist anzunehmen, dass die vom Antikörper 11G7 gebundenen Epitope keinen funktionalen Einfluss auf nachgeschaltete Reaktionen wie Zytokinsekretion und T-Zell-Differenzierung haben.

Desweiteren führte neben der Stimulation mit PGN nur die Stimulation mit dem TLR2/6-Liganden MALP-2 zu einer signifikanten Sekretion von IL-1 β . Dies legt einen TLR2/6-abhängigen Mechanismus in der Induktion der IL-1 β -Freisetzung nahe. IL-6 und TNF- α hingegen werden sowohl nach Stimulation des TLR1/2 als auch des TLR2/6 sezerniert (52). Dennoch kann über die detaillierten Prozesse der Zytokininduktion und die differenzierte Aktivierung bedingt durch strukturelle Unterschiede der beiden TLR2-Heterodimere nur spekuliert werden. Denn zur weiteren Aufklärung der Frage, in welchem Ausmaß die jeweiligen TLR2-Heterodimere an der Induktion der IL-1 β -Sekretion nach Stimulation mit PGN beteiligt sind, bedürfte es weiterer Untersuchungen mit spezifisch TLR1/2 und TLR2/6 blockierenden Antikörpern und weiteren TLR2-Agonisten. Andererseits könnten sich intrazellulär gelegene PGN-Erkennungsrezeptoren an der Stimulation von MoLC durch PGN beteiligen, im Sinne einer Induktion. Eine Partizipation von NOD1/2-Rezeptoren scheint allerdings unwahrscheinlich, da M-Tri_{DAP} (NOD1/2) und MDP (NOD2) IL-1 β in unseren und anderen Untersuchungen (52, 100) nicht induzierten. Die extrazellulären PGN-Erkennungsproteine (PGLYRP) erkennen spezifisch das MurNAc-Pentapeptid-Fragment des PGN (101). PGLYRP-1, PGLYRP-3 und PGLYRP-4 wirken direkt bakterizid, während PGLYRP-2 PGN hydrolisiert. PGLYRP-1, PGLYRP-3 und PGLYRP-4 sollen an das PGN der bakteriellen Zellwand binden und Zwei-

komponentensysteme aktivieren, die extrazytoplasmatische, falsch gefaltete Proteine erkennen. Die Zweikomponentensysteme CsxR-CsxS in grampositiven und CpxA-CpxR in gramnegativen Bakterien würden eine Membrandepolarisation und OH^- -Produktion induzieren, was zur Inhibition der Makromolekülsynthese und dem Zelltod führe. Die PGLYRP können über TLR2 und TLR4 bzw. IL-1 β und TNF- α in Epithelzellen bzw. in der Leber induziert werden (102, 103). Eine Sekretion durch DC ist jedoch nicht bekannt. Ebenso ist keine direkte Wirkung der PGLYRP auf Zellen der Immunabwehr bekannt. Somit scheint eine Mitwirkung der PGLYRP an der Zytokinsekretion und Aktivierung von DC und im Folgenden der T-Zell-Differenzierung in der vorgestellten Arbeit sehr unwahrscheinlich.

Die Sekretion von TGF- β wurde durch die Stimulation des TLR2 nicht signifikant beeinflusst. Sie erscheint bereits konstitutiv durch MoLC und MoDC in gleich großen Mengen zu erfolgen und wurde durch zusätzliche Stimulation nicht weiter beeinflusst. Ein Bias in Folge des Einsatzes von TGF- β zur Generierung der MoLC ist aufgrund der erfolgten extensiven Waschschriffe zwischen Generation und Stimulation auszuschließen. Dass LC (104) und DC (105) TGF- β produzieren, ist bekannt. Es wird vermutet, dass unreife DC durch die Sekretion von TGF- β unter Ausbleiben weiterer Zytokinsekretion im *steady state* T-Zell-Anergie gegenüber nicht-Pathogen-assoziierten Antigenen vermitteln (106).

In der Interaktion von DC und T-Zellen wirkt die Bindung des CD40-Rezeptors wie eine Rückmeldung (38, 107). Aktivierte T-Zellen exprimieren CD40L auf ihrer Oberfläche, dessen Bindung zur Reifung der DC führt: Die Antigenaufnahme wird herunter reguliert, kostimulatorische Moleküle und Reifungsmarker werden ebenso wie MHC-II auf der Zellmembran hoch reguliert. Diese Effekte führen insgesamt zu einer Steigerung der Antigenpräsentation und der Potenz, T-Zellen zu stimulieren. In diesem Zusammenhang ist bereits ein Synergismus des CD40L und bakterieller Noxen beschrieben worden (108, 109). So führt die Kokultur von TLR stimulierten DC mit CD4⁺T_H-Zellen bei paralleler CD40L-CD40 Interaktion zu einer deutlichen Vervielfachung des sekretierten IL-12p70 und damit zu einer Steigerung der Induktion einer T_H1-Antwort (109). Dieser Synergismus ist dabei abhängig vom applizierten Stimulus: Während der Effekt des starken IL-12p70-Induktors LPS nur in geringem Ausmaß durch CD40L verstärkt wird, konnte in Übereinstimmung mit den hier vorgestellten Ergebnissen eine deutliche Multiplikation der Zytokinsekretion und

Induktion von T_H1 -Zellen durch PGN stimulierte DC bei Zugabe von CD40L beobachtet werden (110). Die Stimulation des TLR2 in Verbindung mit CD40 auf MoLC beeinflusste vornehmlich die Expression des kostimulatorischen CD86 und des Reifungsmarkers CD83. Selbst bei höheren Konzentrationen von PGN wurden CD83 und CD86 auf MoLC weniger stark hoch reguliert als auf MoDC vom selben Spender. Erst bei Kostimulation mit CD40L konnten ähnliche Expressionsniveaus von CD83 und CD86 auf MoDC und MoLC beobachtet werden. Das Hsp70 wird in Publikationen sowohl als CD40L als auch als TLR2/6- und TLR4-Agonist beschrieben (8). In Arbeiten zu MoDC, die mit Hsp70 als CD40L und dem TLR-4-Agonisten Ribomunyl unter hyperthermen Bedingungen ($39,5^\circ\text{C}$) stimuliert werden, führte die Kostimulation ähnlich wie bei den vorliegenden Befunden zu keiner signifikanten Hoch-Regulierung der Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie $\text{TNF-}\alpha$ und IL-6 (111). Allerdings zeigte sich im Kontrast zu dieser Studie ein synergistischer Effekt von PGN und CD40L bezüglich der Freisetzung von IL-1 β durch MoLC.

Dies gibt bereits erste Hinweise darauf, dass die Fähigkeit von MoDC und MoLC, CD4^+ T-Zell-Antworten zu induzieren, insbesondere durch die Sekretion von IL-1 β , IL-6 und IL-12p70, multifaktoriell und auch differenziert reguliert wird. Zusammen mit der Aktivierung durch bakterielle Noxen greifen verschiedene Mechanismen. Bezogen auf den CD40-Rezeptor ist dies die Rückkopplung in der Interaktion mit T-Zellen oder die Aktivierung durch Hsp in pathologischen Situationen. Dabei wirkt auch die Sekretion ähnlich wie auf autokrinem Weg, wenn IL-1 β die Freisetzung von IL12p70 durch die CD40L stimulierten MoLC steigert (112).

Obwohl DC nach der Exposition gegenüber bakteriellen Produkten und der Kostimulation mit CD40L als voll ausgereift gelten, konnten Napolitani et al. zeigen, dass die simultane Stimulation mit verschiedenen TLR-Agonisten zu synergistisch Effekten in DC führt (93). Dieser Synergismus äußert sich in der Hoch-Regulierung der Zytokin-Sekretion über den additiven Wert der einzelnen Stimuli und einer hoch regulierten Potenz zur Induktion von T_H -Zell-Antworten. Die Kombination der TLR-Liganden kann hierbei zu einer synergistischen Sezernierung von $\text{TNF-}\alpha$, IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 und IL-23 führen. *Microarray*-Analysen zeigten, dass bei Stimulation mit mehreren TLR-Liganden nur etwa 1% der Gene, die potentiell durch Stimulation mit nur einem TLR-Liganden induziert werden können, in ihrer Expressionsstärke beeinflusst wird.

Nach simultaner Stimulation des endosomal lokalisierten TLR8 und des an Zelloberflächen gelegenen TLR4 oder des endosomalen TLR3 werden Zytokine synergistisch durch DC sezerniert (93). In humanen MoDC und MoMa wird die Sekretion von IL-6, IL-1 β und IL-12p70 synergistisch beeinflusst, wenn sie mit LPS (TLR4) oder PolyI:C (TLR3) in Kombination mit dem TLR7/8-Liganden R848 stimuliert werden (93, 95).

Neben der Lokalisation unterscheiden sich diese TLR auch in der Signaltransduktion. Der TLR3 ist an TRIF, TLR4 an TRIF und MyD88 und TLR8 nur an MyD88 gekoppelt (54). Im Modell mit C57BL/6, C3H/HeJ und C57BL/6 MyD88-knockout Mäusen und Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen konnte gezeigt werden, dass die TRIF- und MyD88-Signaltransduktionspfade synergistisch auf die Kerntranslokation von NF κ B und im Folgenden auf die transkriptionelle Regulation und Sekretion von IL-6 und TNF- α wirken (94). Untersuchungen an humanen MoDC und MoMa, die aus adherierten Monozyten generiert wurden, zeigen Synergien zwischen TLR3 (PolyI:C) oder TLR4 (LPS aus *E. coli* (0111:B4)) und TLR8 (R848), aber keine Synergie bei Kombination des TLR4 (LPS) mit TLR1/2 (Pam₃) oder TLR5 (Flagellin) (95). In MoMa wird lediglich die Expression der Zytokin-mRNS hoch reguliert, die Sekretion von IL-6 und IL-12p70 hingegen bleibt unverändert. Unter den gleichen Bedingungen weisen MoDC eine verstärkte Sekretion von IL-6, IL-10, IL-12p70, IL-23 und TNF- α auf.

Die hier vorgestellten Untersuchungen wurden mit MoLC, die LC sehr ähnlich sind, und MoDC als direkte Kontrolle durchgeführt. Der Synergismus der TLR3, 4 und 8 bezüglich der Sekretion von IL-6, IL-12p70 und IL-1 β durch MoLC wich von den an MoDC beobachteten Synergismen ab. Ähnlich wie MoDC in der Studie von Napolitani et al. sezernierten MoLC nach Stimulation des TLR4 mit hoch gereinigtem LPS große Mengen IL-6 und geringe Mengen IL-1 β und IL-12p70 (93). Die zeitgleiche Stimulation des TLR4 (LPS aus *S. minnesota*) und des TLR8 (PolyU) auf MoLC führte jedoch allein zu einem Synergismus bezüglich der Sekretion von IL-12p70. In den bisherigen Studien an MoDC und MoMa, die den TLR4 mit LPS aus *E. coli* (055:B5 und 0111:B4) und den TLR7/8 mit R848 stimulierten, erstreckte sich der Synergismus auf IL-6, IL-12p70 und IL-1 β (93, 95). Im Weiteren wurde bei kombinierter Stimulation des TLR3 (PolyI:C) und TLR4 (LPS aus *S. minnesota*) die Sekretion von IL-6, IL-12p70 und IL-1 β durch die MoLC synergistisch hoch reguliert. Die zeitgleiche Stimulation des TLR3 (PolyI:C), TLR4 (LPS aus *S. minnesota*) und

TLR8 (PolyU) führte zu einem Synergismus in der Sekretion von IL-12p70 gegenüber der Stimulation mit nur zwei TLR-Liganden.

Die Sekretion der MoLC bei Stimulation eines TLR entsprach besonders bei Einsatz von hoch gereinigtem LPS weitgehend dem für MoDC beschriebenen Zytokinmuster. Jedoch zeigten sich deutliche Unterschiede im Verhalten der MoLC gegenüber den MoDC bei kombinierter Stimulation.

Zwar wurden in der vorliegenden Arbeit andere TLR-Liganden als bei Napolitani et al. verwendet, aber es wurde auch PolyI:C als TLR3-Agonist und mit hoch gereinigtem LPS, wenn auch aus *S. minnesota* und nicht *E. coli*, ebenfalls ein TLR4-Agonist eingesetzt (93). Einzig PolyU als TLR8-Agonist unterscheidet sich in seiner Spezifität von R848, das als TLR7/8-Agonist gilt. Napolitani et al. führten eine CD14⁺-Selektion mit magnetischen Mikrobeads zur Gewinnung der Monozyten durch. Trotz der in der vorgestellten Arbeit erfolgten optischen Kontrolle kann eine Kontamination der MoLC mit B- und T-Zellen im Allgemeinen nicht vollständig ausgeschlossen werden. Dennoch ist eine Kontamination durch T-Zellen unwahrscheinlich, da die FACS-Analysen in den *scatter*-Plots keine T-Zell-Population anzeigten und T-Zellen in Kultur bereits bei der Stimulation der MoLC mit nur einem TLR-Liganden die Freisetzung großer Mengen IL-12p70 begünstigt hätten (113).

Schließlich wurden die Versuche an aus adhärenierten Monozyten generierten MoLC, also einer Subpopulation von DC, die phänotypisch und funktionell LC entsprechen, durchgeführt. Es ist bekannt, dass synergistische TLR-Effekte abhängig vom eingesetzten Zelltyp und der Art des TLR-Liganden sind und die Auswirkungen auf Genexpression und Zytokinfreisetzung selektiv variieren. So benutzen zum Beispiel Makrophagen und DC gemeinsame und unterschiedliche TLR und Signalpfade, um Zytokingene zu aktivieren (95). Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Signaltransduktionswege in MoLC im Detail anders als in MoDC und Makrophagen kooperieren und folglich andere Synergismen hervorbringen. So zeigte TLR4 als Schnittstelle zwischen der Signaltransduktion von TRIF und MyD88 Synergismen mit dem TRIF-assoziierten TLR3 in MoLC, während in MoDC eine synergistische Kooperation des TLR4 mit den MyD88-assoziierten TLR7 und 8 stattfindet (93). Die spezifische Induktion der Signaltransduktion kann dabei durch Unterschiede in der TLR-Rezeptordichte auf MoLC und MoDC beeinflusst werden.

Diese Beobachtung wird weiter dadurch gestützt, dass in der vorgestellten Arbeit unterschiedliche MyD88-Induktoren mit LPS synergistisch kooperierten. Dieser

Mechanismus wurde bereits an MoDC und anderen APC wie Knochenmark-abgeleiteten DC und Knochenmark-abgeleiteten Makrophagen aus der Maus nachgewiesen (93, 94). Hier existiert eine Synergie zwischen den MyD88-assoziierten TLR2 (Peptidoglykan-assoziiertes Lipoprotein), TLR1/2 (Pam₃), TLR9 (CpG) und TLR5 (Flagellin) und dem TRIF-assoziierten TLR4 (LPS aus *E. Coli* (0111:B4)) in der Produktion von IL-6 und TNF- α . Die sequentielle Stimulation mit unterschiedlichen MyD88-Induktoren führte dabei zu keiner Synergie, allerdings zur Kreuztoleranz mit Ausnahme von LPS (94).

Im Speziellen wird in peritonealen Makrophagen von C57BL/BJ Mäusen nach simultaner Stimulation des TLR2/6 (MALP-2) und TLR4 (LPS aus *S. minnesota* (Re595) oder *E. coli* (055:B5)) die Sekretion von TNF- α und Transkription von IL-6-mRNS hoch reguliert (97). In den vorgestellten Untersuchungen sezernierten humane MoLC, die über den TLR2 (PGN) und im Speziellen das Heterodimer TLR2/6 (MALP-2) in Kombination mit dem TLR4 (LPS aus *S. minnesota*) stimuliert wurden, synergistisch IL-6, IL-1 β und IL-23. Bei humanen MoDC wurde die Sekretion von IL-12p70 durch simultane Stimulation des TLR2 und TLR4 synergistisch hoch reguliert.

Bisherige Studien an humanen MoDC und MoMa hatten keinen Synergismus zwischen dem TLR4 (LPS aus *E. coli*) und dem TLR-Heterodimer TLR1/2 (Pam₃) gezeigt (95). Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das TLR-Heterodimer TLR2/6 von kritischer Bedeutung für die synergistischen Effekte auf die Zytokinsekretion ist. Denn auch die Stimulation des TLR4 in Kombination mit anderen MyD88-gekoppelten TLR, dem TLR1/2 (Pam₃) (Daten nicht gezeigt), dem TLR5 (Flagellin) und TLR9 (bakterielle DNS), führte zu keiner synergistischen Zytokinsekretion in MoLC, MoDC oder pDC (95). Ausschließlich die simultane Stimulation des TLR2 (PGN) und TLR4 (LPS) führte zu einer synergistischen Hoch-Regulierung der Sekretion von IL-23 in pDC.

In Bezug auf PGN ist auch alternativ zu TLR2 die Bindung an intrazelluläre NOD-Rezeptoren möglich. Der NOD1-Agonist FK565 und der NOD2-Agonist MDP wirken in Kombination mit PolyI:C (TLR3), Lipid A (LA-15-PP, synthetisch hergestellt vom *E. Coli*-Typ) (TLR4) und CpG (TLR9) synergistisch auf die Sekretion von IL-12p70 und IFN- γ durch humane MoDC (114). Allerdings können die NOD-Rezeptoren nur durch kleine Fragmente des PGN, nach dessen Degradierung durch PGN-lytische Enzyme, aktiviert werden. Eine solche Lyse wurde in der hier vorgestellten Arbeit

nicht forciert und ist daher unwahrscheinlich. Zudem ist eine Öl-Wasser-Emulsion als Vehikel notwendig, um die NOD-Agonisten an die intrazellulär gelegenen Rezeptoren zu führen.

Eine TLR-abhängige, synergistische Zytokinenexpression kann aus Überschneidungen und Verflechtungen der Signaltransduktionspfade der TLR resultieren. Es werden prinzipiell der MyD88- und TRIF-Pfad unterschieden (55). TLR1, TLR2, TLR5, TLR6, TLR8 und TLR9 sind an MyD88 gekoppelt, wobei der TLR2 zudem TIRAP als Sortierungsadapter-Protein zur Lokalisation des MyD88 an der Plasmamembran benötigt. MyD88 induziert über die Aktivierung von MAPK und NFκB eine proinflammatorische Antwort. TLR3 ist an TRIF gekoppelt. TRIF induziert über TANK-bindende Kinase 1 und IKKε die Typ-1-IFN-Produktion. Der TLR4 aktiviert sowohl MyD88 als auch TRIF, der TLR4 ist wie der TLR2 auf der Zelloberfläche lokalisiert. TRAM dient als Sortierungsadapter für TRIF.

Napolitani et al. konnten zeigen, dass durch den TRIF-Pfad induziertes IFN-β die Synergismen der TLR nicht erklärt; denn exogen zugeführtes IFN-β führte zu keinen synergistischen Sekretionszunahmen (93). Vielmehr erzeugt die simultane Stimulation des MyD88- und des TRIF-Pfads eine gesteigerte Aktivierung und Kooperation von NFκB, IRF, MAPK, Phosphoinositid-3-Kinase und STAT Signalpfaden. So werden Synergismen in der IL-12p70-Produktion in mit NFκB-, MAPK p38- und Phosphoinositid-3-Kinase-Inhibitoren-behandelten MoDC unterdrückt (95). Zum anderen konnten Lombardi et al. zeigen, dass die Expression des TLR7, der unter normalen Bedingungen in MoDC nicht nachweisbar ist, durch die Stimulation des TLR4 (LPS) hoch reguliert wird (96). Auch dieser Mechanismus kann eine wichtige Rolle in TLR-vermittelten Synergismen spielen.

Napolitani et al. vermuten, dass der erste Kontakt mit einem TLR ein temporales Fenster öffne, in dem weitere TLR-Liganden das Signal intensivieren, komplettieren und verstärken können (93). Diese Vorstellung trägt dem Umstand Rechnung, dass bei sequentieller Stimulation der MyD88-gekoppelten TLR und des TLR4 eine Kreuztoleranz induziert wird, der eine hemmende Wirkung des ersten Stimulus auf die Signalpfade des folgenden zugrundeliegt (94, 97). Erst die kombinierte Stimulation mehrerer TLR führt zu einer nachhaltigen Zytokinproduktion (115). Hierbei wird die Kapazität der APC, CD4⁺T-Zellen zu polarisieren, amplifiziert und so eine effektive Immunantwort ermöglicht. Die notwendige Integration unterschiedlicher TLR-Stimuli, die an der Plasmamembran und intrazellulären Kompartimenten wirken, wird von

Napolitani et al. als kombinatorischer Sicherheitscode bezeichnet (93). Dieser Sorge dafür, dass starke Effektorzellen nur als Reaktion auf eine tatsächliche Invasion von Pathogenen generiert würden.

Neben den Synergismen bezüglich der Zytokinsekretion wurden auch die Reifungsmarker und kostimulatorischen Moleküle CD40, CD54, CD86, CCR7 und HLA-DR bei Stimulation mit Kombinationen auf MoLC vermehrt exprimiert. Diese Moleküle vermitteln Antigenpräsentation und Kostimulation und sind zur vollständigen T-Zell-Aktivierung und Einleitung der Populationsexpansion notwendig. Darüber hinaus treiben IL-1 β , IL-6, IL-12p70 und IL-23 die Generierung von potentiell gefährlichen Effektorzellen voran und müssen folglich unter strikter Kontrolle gehalten werden (93).

In der vorgestellten Arbeit konnte auf Ebene der DC-Reifung und Sekretion von T_H1, T_H17 und T_H22 polarisierenden Zytokinen ein starker Synergismus der kombinierten Stimulation der TLR beobachtet werden. Folglich kann eine Stimulationshierarchie, welche die Übertragung der Reifungssignale der DC auf T-Zellen umfasst, postuliert werden. So korreliert die Sekretion von IL-12p70 mit der induzierten T_H1-Zell-Antwort nach Stimulation des TLR4 (LPS) und TLR7/8 (R848) von MoDC (93). Neben den sezernierten Zytokinen gehören auch direkte Zell-Zell-Kontakte zu den Mechanismen, über die CD4⁺T-Zellen aktiviert werden können. Als Beispiel seien die Notch-Liganden genannt, deren Expression auch in Folge der kombinierten Stimulation des TLR4 und des TLR7/8 reguliert wird: Während der Notch-Ligand Delta-4 als T_H1-Promotor hoch reguliert wird, wird der T_H2-fördernde Notch-Ligand Jagged-1 herunter reguliert. Dies führt zu einer Verschiebung der T_H1/T_H2-Balance und fördert die Expansion der IFN- γ -produzierenden T_H-Zell-Population, während die Expansion der IL-4-produzierenden Population gehemmt wird. In der vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die simultane Stimulation mit PGN, LPS oder DNS zu einer Hoch-Regulierung der Expression von CD40, CD54, CD86, CCR7 und HLA-DR auf der Plasmamembran von MoLC im Vergleich zur Einzelstimulation führt. Dies ist als ein Indiz dafür zu werten, dass die Reifung der MoLC unterstützt wird und diese eine größere Potenz zur Induktion einer T-Zell-Antwort erlangen. An dieser Stelle ist vor allem DNS (TLR9) hervorzuheben. DNS zeigte allein kaum einen Effekt auf die Sekretion der Zytokine, aber förderte in Kombination die Expression von CD40, CD54, CD80 und CCR7.

LC gelten als die DC-Population der Haut, die T_H17 am effektivsten induzieren können (88). Hierbei ist zu beachten, dass unberührte LC und dermale DC noch keine IL-17-produzierende T-Zellen aktivieren (80). Erst die geeignete Stimulation der LC und dermalen DC verleiht ihnen die Fähigkeit, die IL-17-Produktion in $CD4^+$ T-Zellen zu induzieren. Als Einzelstimuli förderten LPS und PGN die MoLC-induzierte Sekretion von IL-17 durch $CD4^+$ T-Zellen. Ein synergistischer Effekt konnte für die Kombination von LPS und DNS nachgewiesen werden. Den Umstand berücksichtigend, dass keine Antikörper zur Inhibition der T_H1 - und T_H2 -Generierung verwendet wurden, können 1,5 ng/ml IL-17 als physiologisch relevant angesehen werden. IFN- γ hingegen wurde nicht durch die kombinatorische Stimulation der TLR beeinflusst. Als Einzelstimulus und in Kombination führte LPS zu einer Hochregulierung der $IL17^+IFN\gamma^+$ Zellen, die einen gemischten T_H1/T_H17 -Phänotyp repräsentieren können. So können zum Beispiel T_H17 in vivo die Fähigkeit zur IFN- γ -Produktion erwerben (66).

Es überraschte, dass die kombinierte Stimulation des TLR4 (LPS) und TLR9 (DNS) der MoLC zur stärksten Induktion der IL-17-Produktion führte und damit die Sekretion von IL-6, IL-1 β und IL-23 durch MoLC nicht mit der IL-17-Produktion der $CD4^+$ T-Zellen korrelierte. Denn Untersuchungen an humanen naiven $CD4^+$ T-Zellen zeigten eine Korrelation der Polarisation RORC2 exprimierender T_H17 mit der Sekretion von IL-1 β , IL-6, IL-23 durch PGN und LPS stimulierte APC (91, 89). IL-23 gilt als wichtiger Faktor für die Aufrechterhaltung des T_H17 -Phänotyps und für die T_H17 -Gedächtniszell-Aktivierung (77). Duraisingham et al. konnten jedoch zeigen, dass TLR stimulierte LC und dermale DC im Gegensatz zu MoDC die Induktion der IL-17- und IFN- γ -Produktion in T-Gedächtniszellen in Gegenwart nur geringer Mengen sekretierter Faktoren wie IL-12p70 und IL-23 effizient einleiten können (91). Diesem Phänomen liegt möglicherweise ein direkter Zellkontakt als Mechanismus der IL-17-Induktion zugrunde.

Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass IL-17 und ROR γ auch in Abwesenheit von DC und LC durch direkte Stimulation des TLR2 in T-Zellen hoch reguliert werden können (116). Hierbei ersetzen aber die polarisierenden Zytokine TGF- β und IL-6 in Verbindung mit Anti-IFN- γ und Anti-IL-4 die APC und stellen einen Differenzierungsgrad der T_H17 her, der eine direkte Stimulation durch TLR-Agonisten erst ermöglicht. T_H17 -Zellen können auch IL-22 sezernieren und dies in deutlich größerem Umfang als IL-22-produzierende T_H1 (80, 66). Außerdem existieren T_H -Zellen, die IL-22,

jedoch nicht IL-17 produzieren (66). Epidermale LC und dermale DC polarisieren diese T_H22 aus naiven CD4⁺T-Zellen, wobei die LC die potenteren Induktoren sind (80). Vorausgesetzt, dass IL-22 de novo in naiven CD4⁺T-Zellen durch allogene MoLC induziert wird, müssten CD4⁺T-Zellen zur IL-22-Produktion durch TLR stimulierte MoLC aktiviert werden können. Tatsächlich wurden in den vorgestellten Untersuchungen bis zu 30 ng/ml IL-22 nach der kombinierten Stimulation mit PGN, LPS und DNS der MoLC und Kokultur sezerniert gefunden. Die simultane Stimulation des TLR2 und TLR4 oder des TLR2, TLR4 und TLR9 zeigte synergistische Effekte. Durch die intrazelluläre Färbung des IL-22 gegen IL-9 konnte eine leichte Expansion der T_H22 gezeigt werden. Aber ob die Hoch-Regulierung der IL-22-Sekretion direkt mit der Induktion einer größeren T_H22-Population zusammenhängt oder ob die IL-22-Produktion in einer konstanten Subpopulation verstärkt hoch reguliert wurde, bleibt offen. Die IL-22-Produktion korrelierte mit dem durch MoLC freigesetzten IL-6 und dem TNF- α . Und sowohl IL-6 als auch TNF- α konnten als essentielle Faktoren der Polarisierung von T_H22 aus naiven T-Zellen durch pDC identifiziert werden (81). Das TNF- α in den Überständen der Kokultur wurde wahrscheinlich durch MoLC sezerniert, weil CD4⁺T-Zellen keine größeren Mengen TNF- α sezernieren (66). Die Sekretion von IL-9 unterlag keinem synergistischen Effekt. Zellen mit einer exklusiven Expression von IL-9 waren nach Stimulation mit LPS vorhanden. Sowohl T_H2 als auch T_H17 können IL-9 produzieren (66). Allerdings konnte in den Überständen der Kokulturen, die IL-9 enthielten, kein IL-4 nachgewiesen werden. IL-4 gilt aber als T_H2-spezifisches Zytokin und seine Abwesenheit ist ein Indiz gegen T_H2 als Quelle des IL-9 (66).

In humanen Hauterkrankungen wie Psoriasis, atopischer Dermatitis und allergischer Kontaktdermatitis sind unterschiedliche Mengen an T_H17- und T_H22-Zellen nachweisbar, was eine krankheitsspezifische Partizipation dieser Subpopulationen nahelegt (70, 71). Bei Psoriasis und allergischer Kontaktdermatitis auftretende Hautläsionen enthalten sowohl T_H17 als auch T_H22. Die Pathogenese der atopischen Dermatitis geht sogar mit noch größeren Vorkommen ausschließlich IL-22-produzierender T-Zellen einher (80). Bezüglich der Aktivierung der T_H22 wurde die Hypothese aufgestellt, dass LC die Hauptinduktoren seien (80). In einem in vitro Ansatz konnte hier gezeigt werden, dass unter der simultanen Stimulation des TLR2 und TLR4 die freigesetzte Menge IL-22 und TNF- α in den Überständen der Kokultur synergistisch

hoch reguliert wird und die zusätzliche Stimulation mit DNS zu einer weiteren Hoch-Regulierung von IL-22 führt. Die Sekretion von IL-17 und IFN- γ wurde durch die kombinierte Stimulation nicht signifikant beeinflusst. Die Diskrepanz der Sekretion von IL-17 und IL-22 lässt sich dadurch erklären, dass die Induktion der IL-22-Produktion laut publizierter Befunde geringere Mengen an TGF- β als die der IL-17-Produktion verlangt (75). Die Sekretion von TGF- β unterlag im Gegensatz zu der von IL-1 β , IL-6 und IL-23 keiner Regulation durch die Stimulation mit TLR.

IL-17 und IL-22 kooperieren in wichtigen Mechanismen der Immunabwehr der Haut. Sie stimulieren die Expression proinflammatorischer Zytokine und Chemokine in Makrophagen, Endothelzellen und Epithelzellen, wodurch T-Gedächtniszellen und neutrophile Granulozyten mobilisiert und aktiviert werden (71). Über diesen Mechanismus werden während der frühen Hautreaktion auf Pathogene und Allergene schnell spezifische T-Zellen rekrutiert, welche die dermale Entzündung fördern. IL-22 sowie IL-17 induzieren in Epithel und speziell in Keratinozyten die Produktion antimikrobieller Proteine, der Defensine, und partizipieren in der frühen Abwehr mikrobieller Pathogene (42, 80). In der Haut vermittelt IL-22 die Proliferation von Keratinozyten und epidermale Hyperplasie durch die Inhibition der terminalen Differenzierung der Keratinozyten. Ein weiterer wichtiger Faktor ist IL-23, das die Proliferation und Sekretion der T_H17 und T_H22 beeinflusst. Diese drei Zytokine IL-17, IL-22 und IL-23 sind offensichtlich entscheidende Faktoren der Entstehung und Progression inflammatorischer Hauterkrankungen (71). Bei der Psoriasis im Speziellen seien IL-22 und IL-23 von entscheidender Bedeutung für die Pathogenese, während IL-17 nur eine untergeordnete Rolle einnehme (117, 118).

Bei Erkrankungen, die mit epidermaler Akanthose einhergehen, ist IL-22 wohl das wichtigste Effektorzytokin. In vitro induziert IL-22 Akanthose und Hypogranulose und supprimiert die terminale Ausdifferenzierung der Epidermis (42, 80). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass die Überexpression von IL-22 zur Hyperplasie und Entzündung der Haut führt (119). Diese ähnelten den bei Psoriasis und anderen ekzematösen Hauterkrankungen vorzufindenden Hautläsionen. Zur Pathogenese der Psoriasis tragen eine Vielzahl von Umwelt- und genetischen Faktoren bei, die zu einer Dysregulation der Immunabwehr der Haut führen. Unter anderem können auch bakterielle Infektionen einen Schub der Psoriasis-assoziierten Hautläsionen auslösen. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die kombinierte Stimulation des TLR2, TLR4 und TLR9 auf MoLC zu einer Expansion der

IL-22-produzierenden CD4⁺T-Zellen führt. Desweiteren war in den Überständen der Kokulturen mit IFN- γ , TNF- α , IL-17 und IL-22 ein Zytokinmilieu nachweisbar, wie es auch in der Haut bei Psoriasis anzutreffen ist (42). Zudem wurde die Sekretion von IL-6 synergistisch beeinflusst, was, wie im Mausmodell anhand der simultanen Stimulation des TLR3 (PolyI:C) und des TLR7/8 (R848) bereits gezeigt, zum Durchbrechen der T_{reg}-vermittelten Suppression von CD4⁺ und CD8⁺T-Zellen beitragen könnte (115). Es ist also möglich, dass die epidermalen LC als Äquivalent der MoLC in vivo an der Entstehung und Progression der Psoriasis und anderer entzündlichen Hauterkrankungen mitwirken. Diese Hypothese wird auch durch die exponierte Lage der LC in der Epidermis gestützt. Hier können die LC die Produktion der oben genannten T-Zell-Zytokine in direkter Umgebung zu den Zielzellen, den Keratinozyten, induzieren. Zudem sind die LC in hohem Maße dazu befähigt, IL-22-produzierende T-Zellen in der Umgebung zu aktivieren (80). Weitere Untersuchungen insbesondere hinsichtlich der gegenseitigen Einflussnahme der LC und Keratinozyten sowie Versuche an Mäusen in vivo könnten die Rolle der TLR und der LC bei Homöostase und Erkrankungen der Haut weiter aufklären.

Die hier vorgestellten Ergebnisse sind nicht nur in Bezug auf entzündliche Erkrankungen der Haut relevant. Auch andere inflammatorische Erkrankungen wie Morbus Crohn oder rheumatoide Arthritis weisen ähnliche Pathomechanismen auf. Speziell bei der rheumatoiden Arthritis sind der TLR2, der TLR4 und der TLR7 in der Synovia hoch reguliert (96, 120). Eine kombinierte Stimulation der TLR auf DC könnte die synoviale Entzündung fördern. Diese ist durch einen massiven Einfall von T-Zellen, B-Zellen, Makrophagen und eben DC gekennzeichnet und führt in der Folge zum Zerfall des Knorpels und zur Schädigung des Knochens.

Eine genaue Definition der an den genannten Erkrankungen beteiligten T-Zell-Populationen, Zytokinen und DC-Subpopulation sowie deren Interaktion könnte zur weiteren Aufklärung der Pathomechanismen bei Haut- und Autoimmunerkrankungen und zur Entwicklung spezifischer therapeutischer Strategien beitragen. Denn die TLR-Agonisten und Antagonisten können die Induktion, Förderung und Suppression von T_H-Antworten vermitteln (8). In der pharmazeutischen Forschung werden TLR-Agonisten und Antagonisten präklinisch und klinisch evaluiert. Sie sollen bei allergischen Erkrankungen, Neubildungen, Infektionskrankheiten und Autoimmunerkrankungen zum Einsatz kommen (121).

Die vorgestellten Ergebnisse legen nahe, dass gegen den TLR2, 4 oder 9 gerichtete Antagonisten die Krankheitsaktivität der Psoriasis, atopischen Dermatitis und allergischen Kontaktdermatitis modulieren könnten. Bei der Psoriasis wird neben dem TNF- α blockierenden Antikörpern bereits der gegen IL-12p40 gerichtete, blockierende Antikörper Ustekinumab (Experimentalname CNTO 1275) erfolgreich zur Therapie eingesetzt (122). Dieser bindet an die IL-12p40-Untereinheit des IL-23-Heterodimers und blockiert die T_H17 und T_H22 induzierende Wirkung des IL-23 (118). In der vorgestellten Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von IL-6, IL-1 β und IL-23 durch MoLC nach der kombinierten Stimulation des TLR2, 4 und 9 synergistisch hoch reguliert wird. Und im Folgenden konnten in den Überständen der Kokultur der stimulierten MoLC und naiven CD4⁺T-Zellen IFN- γ , IL-22 und TNF- α synergistisch hoch reguliert gemessen und IL-17 nachgewiesen werden. Alle genannten Zytokine sowie die T_H1, T_H17 und T_H22 werden mit der Pathogenese der Psoriasis in Verbindung gebracht (118). Mit der atopischen Dermatitis sind neben IL-6, IL-23, IL-22, TNF- α und T_H22 auch die T_H2 und in der chronischen Phase die T_H1 assoziiert (125). An der Pathogenese der allergischen Kontaktdermatitis sind neben IL-17, IL-22, IL-23, T_H1, T_H17 und T_H22 besonders IL-1 β und TNF- α beteiligt (70, 71, 123). Darüber hinaus konnte im Kontakthypersensitivitätsmodell an knockout Mäusen gezeigt werden, dass der TLR2 und der TLR4 bei der Entstehung der allergischen Kontaktdermatitis kooperieren (124). Es ist also möglich, dass die Aktivierung des TLR2, 4 und 9 auf LC an der Pathogenese der Psoriasis, atopischen Dermatitis und allergischen Kontaktdermatitis beteiligt ist. Mit der Inhibition des TLR2, 4 und 9 könnte man bereits einen Schritt vor der Inhibition von IL-23 oder TNF- α bei der Therapie dieser Erkrankungen ansetzen. Denn die TLR stehen am Anfang der immunologischen Kaskade und durch ihre Blockierung könnten die inflammatorischen Reaktionen im Ansatz gehemmt werden. Ein ähnlicher Therapieansatz wird bereits bei der Behandlung des systemischen Lupus erythematodes und der rheumatoiden Arthritis verfolgt. Hier reduziert Hydroxychloroquin, ein Inhibitor des TLR9 und in geringerem Maße des TLR7 und 8, die Zahl der Autoantikörper und lindert die Symptomatik (126). Aufgrund der Lage der LC in der Epidermis käme eine topische Gabe der Inhibitoren des TLR2, 4 und 9 in Frage. Die Antagonisten müssten hierzu in der Lage sein, die Hornschicht bis zu den Zielzellen, den LC, in der Epidermis zu durchdringen. In diesem Anwendungsbereich wären somit kleine inhibierende Moleküle den Antikörpern überlegen. Die topische Anwendung wiese

gegenüber einer systemischen den Vorteil der Reduktion der systemisch wirksamen Dosis und damit der Toxizität und unerwünschten Nebenwirkungen auf. Ein Beispiel für die topische Anwendung eines TLR-Liganden an der Haut ist Imiquimod (127). Dieser TLR7/8-Agonist ist für die Therapie von mit dem humanen Papillomvirus assoziierten Warzen, Basalzellkarzinomen und der aktinischen Keratose zugelassen und in klinischer Erprobung.

Desweiteren könnten die vorgestellten Ergebnisse für die Entwicklung neuer Adjuvantien zur Vakzination von Relevanz sein. So werden zur Steigerung des Impferfolgs bereits TLR-Agonisten als Adjuvantien eingesetzt: der TLR4-Agonist AS04 bei den Impfungen gegen humanes Papillomvirus-16 und -18 und Hepatitis B und der TLR2-Agonist Tripalmitoyl-S-glyceryl-Cystein bei der Impfung gegen *Borrelia burgdorferi* (121, 127). In Vorbereitung der Zulassungsstudien untersuchten Chen et al. die Sepsisvakzine J5dLPS-OMP, einen Komplex aus LPS von *E. coli* O111:B4 (J5dLPS) und Außenmembranproteinen von *Neisseria meningitidis* der Gruppe B, und dessen Adjuvans CpG, das Oligodesoxynukleotide enthält (128). Sie konnten zeigen, dass erst die kombinierte Stimulation des TLR2, 4 und 9 durch J5dLPS-OMP und das Adjuvans CpG große Mengen polyklonaler Antikörper gegen Epitope des Glykolipidkerns des LPS gramnegativer Bakterien induziert. Hierbei bewegt sich der Effekt im Spannungsfeld zwischen Impfverstärkung und unerwünschten Nebenwirkungen wie Pruritus, Fieber, Myalgie oder sogar septischem Schock. In der vorgestellten Arbeit konnte ein Synergismus der TLR auf die MoLC und MoDC nachgewiesen werden. Übertragen auf die Verwendung unterschiedlicher TLR-Adjuvantien bei einer Impfung könnte die hervorgerufene verstärkte Immunreaktion beim Gesunden überschießend, beim Immunsupprimierten jedoch erwünscht sein. Beim Immunsupprimierten ist eine adäquate Impfreaktion aufgrund der supprimierten Abwehrzellen nur schwer zu erzielen. Durch eine Kombination unterschiedlicher TLR-Adjuvantien könnte die Impferfolgsrate in dieser Patientengruppe gesteigert werden.

Auch in der Krebsimmuntherapie werden TLR zielgerichtet stimuliert. Bereits 1893 begründete William Coley die Krebsimmuntherapie, als er Patienten mit inoperablem Krebs eine Mixtur aus Toxinen abgetöteter Bakterien der Arten *Streptococcus pyogenes* und *Serratia marcescens* direkt in den Tumor injizierte, um eine Tumor-

regression zu erreichen (121). Das *Bacillus Calmette-Guérin*, das den TLR2, 4 und 9 stimuliert, wird zur Durchbrechung der lokalen Immunsuppression beim Blasenkarzinom intravesikal eingesetzt (126). Ein anderer Ansatz in der Krebsimmuntherapie beruht auf der Entwicklung von Krebsvakzinen (129). Hierbei werden zum einen tumorspezifische Antigene und zum anderen Zellen der Immunabwehr als Vakzine genutzt. Bei beiden Ansätzen werden DC als Zielzellen in Studien genutzt. Beim *DC-targeting* wird das tumorspezifische Antigen an einen Anti-DC-Rezeptor-Antikörper gekoppelt, um so das Antigen direkt zur DC zu bringen. An Mäusen konnte gezeigt werden, dass das *targeting* von DC und LC zu einer Potenzierung der antigenspezifischen CD4⁺ und CD8⁺T-Zell-Immunität führt und eine therapeutische Antitumorimmunität generieren kann. Beim zweiten Ansatz werden reife, antigenbeladene DC injiziert, die eine antigenspezifische T-Zell-Antwort anregen sollen (129). In diesem Bereich werden die ex vivo generierten DC mit einer Kombination von Zytokinen und TLR stimuliert. So konnte gezeigt werden, dass die Gabe von LPS, IFN- γ und IL-4 als Reifungssignale zu einer stabilen, langanhaltenden IL-12p70-Produktion im DC-Mausmodell führt (130). Sowohl bei dem *DC-targeting* als auch bei der Verabreichung antigenbeladener DC werden Adjuvantien für die Induktion einer nachhaltigen Immunität und der Überwindung der lokalen Immunsuppression durch den Tumor gebraucht (129).

DC sollen CD4⁺T-Effektorzellen induzieren, welche die Tumorprogression und Metastasierung über folgende Mechanismen eindämmen: Induktion der Expansion tumorantigenspezifischer zytotoxischer T-Zellen, Aktivierung von Makrophagen und aktive Elimination von Tumorzellen (129). Durch T_H1 und T_H17 sezernierte IFN- γ und IL-17 stimulieren die Expression der Chemokine, CXCL9 und CXCL10, welche die Einwanderung weiterer T_H1, zytotoxischer CD8⁺T-Zellen und NK-Zellen vermitteln (131). T_H17 werden aber durch lokale T_{reg} supprimiert und stellen nur eine kleine Fraktion der T-Zellen bei epithelialen Malignomen, obwohl hohe Konzentration der T_H17 induzierenden Zytokine, IL-6, TGF- β und IL-1 β , in der Tumorumgebung nachgewiesen werden können (131, 132). Und Untersuchungen an DC aus der Milz von Mäusen zeigten, dass die Stimulation des TLR2 eher T_{reg} und keine T_H1 oder T_H17 induziert und somit als Adjuvans ungeeignet sei (129, 133). In der vorliegenden Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass MoLC nach kombinierter Stimulation mit PGN, LPS und DNS große Mengen immunstimulierenden IL-6, IL-23, IL-1 β und TNF- α sezernieren und die Produktion von IFN- γ , IL-17 und IL-22 in naiven CD4⁺T-

Zellen induzieren. Bei Tumoren der Haut wie Melanomen könnte also eine Gabe eines TLR2-Agonisten in Kombination mit TLR4- und TLR9-Agonisten bei der Krebsimmuntherapie von Nutzen sein, um die lokale Immunsuppression zu durchbrechen und eine zelluläre Immunantwort mit T_H1 , zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen und NK-Zellen zu induzieren. Desweiteren vermitteln aktivierte LC nicht nur regionale Immunität, sondern migrieren auch in die drainierenden Lymphknoten und können dort eine antigenspezifische T-Zell-Expansion und humorale Immunantwort induzieren (134). Die Migration der LC in die regionalen Lymphknoten könnte also bei den früh metastasierenden Melanomen zur Eindämmung der Tumorzellausbreitung beitragen. Es erscheint also möglich, TLR2-Agonisten in Kombination mit TLR4- und TLR9-Agonisten als Adjuvans bei der Tumorstimulation und zur topischen Immunstimulation ähnlich *Bacillus Calmette-Guérin* einzusetzen. Aufgrund der exponierten Lage der LC in der Epidermis wäre zur topischen Therapie eine Creme oder eine intrakutane Injektion der TLR2-, 4- und 9-Agonisten von Vorteil. Zunächst sollte in Versuchen der Effekt auf $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen detaillierter untersucht werden. In einem zweiten Schritt könnte man die Wirkung der kombinierten Stimulation des TLR2, 4 und 9 auf LC aus dem exidierten Gewebe von Melanom- und Basaliompatienten untersuchen. Nach Prüfung der Toxizität wäre in weiteren Studien zu untersuchen, ob diese in vivo eine geeignete Immunantwort auslöst, die folgende Kriterien umfasst: die Induktion zytotoxischer T-Zellen und einer geeigneten $CD4^+$ T_H -Antwort, die Suppression von T_{reg} und die Durchbrechung der Immunsuppression durch den Tumor (129).

Die kommenden Jahre werden Weiterentwicklungen in der Immunologie mit sich bringen. Wie jüngst die Antikörper werden neue immunologische Therapieansätze, seien es TLR-Antagonisten oder die extrakorporale DC-Stimulation, Einzug in den breiten Klinikalltag halten. Diese neuen Techniken zu entwickeln und zu etablieren, wird eine große Herausforderung für Forscher und praktizierende Mediziner sein. Sicherlich werden viele Rückschläge auftreten, aber ebenso werden sich Behandlungsverfahren zum Wohle der Patienten herauskristallisieren.

5 Zusammenfassung

Die Antigen präsentierenden Zellen der Haut sind die dermalen DC und die epidermalen LC. Obwohl LC die erst beschriebenen DC darstellen und in vielen Versuchen als Modell für diese fungieren, ist wenig über ihre physiologische Funktion und Partizipation bei Erkrankungen der Haut bekannt.

Nun können bei inflammatorischen Erkrankungen wie Psoriasis, atopischer Dermatitis und allergischer Kontaktdermatitis vermehrt T_H17- und T_H22-Zellen in der Haut nachgewiesen werden. Besonders die Psoriasis wird mit einem bestimmten Zytokinmilieu, bestehend aus IFN- γ , TNF- α , IL-17 und IL-22, assoziiert. In Versuchen an LC konnte bereits nachgewiesen werden, dass diese prinzipiell dazu befähigt sind, T_H17- und T_H22-Zellen zu induzieren. Speziell die Stimulation des TLR2 führt zur Sekretion induktionskritischer Zytokine, wie IL-6 und IL-1 β .

In der vorliegenden Arbeit wurde an aus adhärenzten Monozyten generierten MoLC und MoDC die multi-PAMP-Exposition, wie sie in vivo bei Verlust der epidermalen Barrierenfunktion und direkter Exposition der Erreger anzutreffen ist, untersucht. Es konnte auf Ebene der DC-Reifung und Sekretion von T_H1, T_H17 und T_H22 induzierenden Zytokinen, wie IL-6, IL-1 β und IL-23, ein Synergismus unterschiedlicher TLR-Liganden nachgewiesen werden. Dieser hatte eine synergistische Hochregulierung der Sekretion von TNF- α und IL-22 in der Kokultur der MoLC mit CD4⁺T-Zellen zur Folge. Die Induktion der IL-17-Produktion in CD4⁺T-Zellen korrelierte nicht mit der Sekretion von IL-6, IL-1 β oder IL-23 durch die MoLC.

Es konnte gezeigt werden, dass die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-6, TNF- α sowie IL-12p70, IL-23 und IL-1 β nach TLR2-Stimulation in MoDC und MoLC unterschiedlich reguliert wird. Interessanterweise fehlte MoLC im Gegensatz zu MoDC die Fähigkeit zur Produktion von IL-12p70. Nach Stimulation mit PGN in Verbindung mit CD40L sezernierten MoLC geringe Mengen IL-12p70. Die Freisetzung von IL-1 β wurde synergistisch beeinflusst. In MoDC hingegen wurde die Sekretion von IL-12p70 und nicht IL-1 β synergistisch hoch reguliert. Auch die kooperativen Effekte unterschiedlicher TLR-Agonisten bei simultaner Stimulation prägten sich in MoDC und MoLC verschieden aus. So führte die gleichzeitige Stimulation des TLR4, der Schnittstelle zwischen der Signaltransduktion von TRIF

und MyD88, mit LPS und des TRIF-assoziierten TLR3 mit PolyI:C in MoLC zur synergistischen Sekretion von IL-6, IL-1 β und IL-12p70 und damit zu einem Synergismus, der sich bei bisherigen Untersuchungen anderer DC-Populationen nicht einstellte. Ebenso konnte erstmalig an humanen Zellen ein synergistischer Effekt der simultanen Stimulation des TLR2 und des TLR4 nachgewiesen werden. MoLC, die über den TLR2 durch PGN oder im Speziellen das Heterodimer TLR2/6 durch MALP-2 in Kombination mit dem TLR4 durch LPS stimuliert wurden, setzten synergistisch IL-6, IL-1 β und IL-23 frei. In MoDC wurde die Sekretion von IL-12p70 und in pDC die Sekretion von IL-23 durch simultane Stimulation des TLR2 und TLR4 synergistisch hoch reguliert. Das Heterodimer TLR2/6 schien hierbei von kritischer Bedeutung für die synergistischen Effekte zu sein. Die Stimulation anderer MyD88-gekoppelter TLR, wie des TLR1/2 durch Pam₃, des TLR5 durch Flagellin oder des TLR9 durch bakterielle DNS, zeigten bei gleichzeitiger Stimulation des TLR4 durch LPS keine Synergismen. Wie die Synergismen auf Signaltransduktionsebene und ob sie durch eine mögliche Hoch-Regulierung der TLR-Expression entstehen, wird in weiteren Studien zu untersuchen sein. Neben den Synergismen bezüglich der Zytokinsekretion wurde auch die Expression der Reifungsmarker und kostimulatorischen Moleküle CD40, CD54, CD86, HLA-DR und CCR7 auf der Plasmamembran der MoLC bei kombinierter Stimulation durch PGN mit LPS oder DNS hoch reguliert.

In der Kokultur förderten LPS oder PGN stimulierte MoLC die IL-17-Produktion durch CD4⁺T-Zellen. Ein synergistischer Effekt konnte für die Kombination von LPS und DNS nachgewiesen werden, was eine über Zell-Zell-Kontakte vermittelte Induktion der IL-17-Produktion suggeriert. IFN- γ hingegen wurde nicht durch die kombinatorische Stimulation der TLR beeinflusst. Als Einzelstimulus und in Kombination führte LPS zu einer Hoch-Regulierung der IL-17⁺IFN- γ ⁺Zellen, die einen gemischten T_H1/T_H17-Phänotyp repräsentieren können. Die simultane Stimulation des TLR2 und TLR4 oder des TLR2, TLR4 und TLR9 zeigte synergistische Effekte auf die Expansion der T_H22-Population und die Hoch-Regulierung der IL-22-Sekretion. Die IL-22-Produktion korrelierte mit TNF- α und dem durch MoLC freigesetzten IL-6, zwei essentiellen Faktoren der T_H22-Differenzierung.

PGN und LPS, zwei Moleküle der Bakterienzellwand, zeigten insgesamt stark unterstützende Wirkung in der Aktivierung von DC und der nachgeschalteten T_H-Differenzierung und Zytokinfreisetzung.

6 Literaturverzeichnis

1 Naso PO, von Albrecht M. *Ars amatoria – Liebeskunst*. Reclam 1992;1:22-23.

2 Ueno H, Klechevsky E, Morita R, et al. Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunol Rev* 2007;219:118-142.

3 Steinman RM, Banchereau J. Taking dendritic cells into medicine. *Nature* 2007;449:419-426.

4 Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973;137:1142-1162.

5 Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Arch* 1868;44:325-337.

6 Anderson KV, Jürgens G, Nüsslein-Volhard C. Establishment of dorsal-ventral polarity in the *Drosophila* embryo: genetic studies on the role of the *Toll* gene product. *Cell* 1985;42:779-789.

7 Medzhitov R, Preston-Hurlburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-397.

8 Kanzler H, Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007;13:552-559.

9 Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nat Immunol* 2001;2:585-589.

10 Shortman K, Naik SH. Steady-state and inflammatory dendritic-cell development. *Nat Rev Immunol* 2007;7:19-30.

- 11 Romani N, Clausen BE, Stoitzner P. Langerhans cells and more: langerin-expressing dendritic cell subsets in the skin. *Immunol Rev* 2010;234:120-141.
- 12 Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:685-711.
- 13 Merad M, Manz MG, Karsunky H, et al. Langerhans cells renew in the skin throughout life under steady-state conditions. *Nat Immunol* 2002;3:1135-1141.
- 14 Palucka AK, Banchereau J. Langerhans cells: daughters of monocytes. *Nat Immunol* 2006;7:265-273.
- 15 Yrlid U, Jenkins CD, MacPherson GG. Relationships between distinct blood monocyte subsets and migrating intestinal lymph dendritic cells in vivo under steady-state conditions. *J Immunol* 2006;176:4155-4162.
- 16 Caux C, Dezutter-Dambuyant C, Schmitt D, Banchereau J. GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 1992;360:258-261.
- 17 Geissmann F, Prost C, Monnet JP, Dy M, Brousse N, Hermine O. Transforming growth factor β 1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med* 1998;187:961-966.
- 18 Nagai Y, Garrett KP, Ohta S, et al. Toll-like receptors on hematopoietic progenitor cells stimulate innate immune system replenishment. *Immunity* 2006;24:801-812.
- 19 Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol* 2005;23:275-306.
- 20 Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ. The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med* 1997;185:1101-1111.

- 21 Villadangos JA, Schnorrer P. Intrinsic and cooperative antigenpresenting functions of dendritic-cell subsets in vivo. *Nat Rev Immunol* 2007;7:543-555.
- 22 Cook DN, Bottomly K. Innate immune control of pulmonary dendritic cell trafficking. *Proc Am Thorac Soc* 2007;4:234-239.
- 23 Niess JH, Reinecker HC. Dendritic cells in the recognition of intestinal microbiota. *Cell Microbiol* 2006;8:558-564.
- 24 Banchereau J, Briere F, Caux C, et al. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
- 25 Valladeau J, Saeland S. Cutaneous dendritic cells. *Semin Immunol* 2005;17:273-283.
- 26 McMahon EJ, Bailey SL, Miller SD. CNS dendritic cells: critical participants in CNS inflammation? *Neurochem Int* 2006;49:195-203.
- 27 Novak N, Siepmann K, Zierhut M, Bieber T. The good, the bad and the ugly – APCs of the eye. *Trends Immun* 2003;24:570-574.
- 28 Villadangos JA, Heath WR. Life cycle, migration and antigen presenting functions of spleen and lymph node dendritic cells: limitations of the Langerhans cells paradigm. *Semin Immunol* 2005;17:262-272.
- 29 Wu L, Shortman K. Heterogeneity of thymic dendritic cells. *Semin Immunol* 2005;17:304-312.
- 30 Kraal G, Mebius R. New Insights into the cell biology of the marginal zone of the spleen. *Int Rev Cytol* 2006;250:175-215.
- 31 Sato A, Iwasaki A. Peyer's patch dendritic cells as regulators of mucosal adaptive immunity. *Cell Mol Life Sci* 2005;62:1333-1338.

- 32 Sabatté J, Maggini J, Nahmod K, et al. Interplay of pathogens, cytokines and other stress signals in the regulation of dendritic cell function. *Cytokine Growth Factor Rev* 2007;18:5-17.
- 33 Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-1118.
- 34 Sallusto F, Lanzavecchia A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate antigen in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J Exp Med* 1995;182:389-400.
- 35 Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998;392:245-252.
- 36 Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003;21:685-711.
- 37 Macagno A, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Duration, combination and timing: the signal integration model of dendritic cell activation. *Trends Immunol* 2007;28:227-233.
- 38 Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 2006;6:476-483.
- 39 Dieu MC, Vanbervliet B, Vicari A, et al. Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J Exp Med* 1998;188:373-386.
- 40 Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994;12:991-1045.

- 41 Janeway CA. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 1989;54:1-13.
- 42 Nestle FO, Di Meglio P, Qin JZ, Nickoloff BJ. Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* 2009;9:679-691.
- 43 Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Semin Immunol* 2007;19:24-32.
- 44 Bowie A, O'Neill LA. The interleukin-1 receptor/Toll-like receptor superfamily: signal generators for pro-inflammatory interleukins and microbial products. *J Leukoc Biol* 2000;67:508-514.
- 45 Schwandner R, Dziarski R, Wesche H, Rothe M, Kirschning CJ. Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J Biol Chem* 1999;274:17406-17409.
- 46 Chow JC, Young DW, Golenbock DT, Christ WJ, Gusovsky F. Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction. *J Biol Chem* 1999;274:10689-10692.
- 47 Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, et al. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 2001;410:1099-1103.
- 48 Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 2004;303:1526-1529.
- 49 Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, et al. A Toll-like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408:740-745.
- 50 Zhang D, Zhang G, Hayden MS, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* 2004;303:1522-1526.
- 51 Takeuchi O, Sato S, Horiuchi T, et al. Cutting edge: role of Toll-like receptor 1 in mediating immune response to microbial lipoproteins. *J Immunol* 2002;169:10-14.

52 Peiser M, Koeck J, Kirschning CJ, Wittig B, Wanner R. Human Langerhans cells selectively activated via Toll-like receptor 2 agonists acquire migratory and CD4⁺T cell stimulatory capacity. *J Leukoc Biol* 2008;83:1118-1127.

53 Takeuchi O, Kawai T, Muhlradt PF, et al. Discrimination of bacterial Lipoproteins by Toll-like receptor 6. *Int Immunol* 2001;13:933-940.

54 Barton GM, Kagan JC. A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization. *Nat Rev Immunol* 2009;9:535-542.

55 Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 2007;7:179-190.

56 van der Aar AM, Sylva-Steenland RM, Bos JD, Kapsenberg ML, de Jong EC, Teunissen MB. Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition. *J Immunol* 2007;178:1986-1990.

57 Flacher V, Bouschbacher M, Verronese E, et al. Human Langerhans cells express a specific TLR profile and differentially respond to viruses and Gram-positive bacteria. *J Immunol* 2006;177:7959-7967.

58 Reis e Sousa C. Toll-like receptors and dendritic cells: for whom the bug tolls. *Semin Immunol* 2004;16:27-34.

59 Asselin-Paturel C, Trinchieri G. Production of type I interferons: plasmacytoid dendritic cells and beyond. *J Exp Med* 2005;202:461-465.

60 Munz C, Steinman RM, Fujii SI. Dendritic cell maturation by innate lymphocytes: coordinated stimulation of innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2005;202:203-207.

61 Degli-Eposti MA, Smyth MJ. Close encounters of different kinds: dendritic cells and NK cells take centre stage. *Nat Rev Immunol* 2005;5:112-122.

- 62 Vincent MS, Leslie DS, Gumperz JE, Xiong X, Grant EP, Brenner MB. CD1-dependent dendritic cell instruction. *Nat Immunol* 2002;3:1163-1168.
- 63 Wykes M, MacPherson G. Dendritic cell-B-cell interaction: dendritic cells provide B cells with CD40-independent proliferation signals and CD40-dependent survival signals. *Immunology* 2000;100:1-3.
- 64 Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM, et al. DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BLYS and APRIL. *Nat Immunol* 2002;3:822-829.
- 65 Steinman RM. Some interfaces of dendritic cell biology. *APMIS* 2003;111:675-697.
- 66 O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4⁺ T cells. *Science* 2010;327:1098-1102.
- 67 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-2357.
- 68 Park H, Li Z, Yang XO, et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nat Immunol* 2005;6:1133-1141.
- 69 Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, et al. Interleukin 17-producing CD4⁺ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123-1132.
- 70 Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009;119:3573-3585.

- 71 Larsen JM, Bonefeld CM, Poulsen SS, Geisler C, Skov L. IL-23 and T_H17-mediated inflammation in human allergic contact dermatitis. *J Allergy Clin Immunol* 2009;123:486-492.
- 72 Zhu J, Paul WE. CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* 2008;112:1557-1569.
- 73 Okoye IS, Wilson MS. CD4⁺ T helper 2 cells – microbial triggers, differentiation requirements and effector functions. *Immunology* 2011;134:368-377.
- 74 Cosmi L, Maggi L, Santarlasci V, et al. Identification of a novel subset of human circulating memory CD4⁺ T cells that produce both IL-17A and IL-4. *J Allergy Clin Immunol* 2010;125:222-230.
- 75 Dong C. TH17 cells in development: an updated view of their molecular identity and genetic programming. *Nat Rev Immunol* 2008;8:337-348.
- 76 Miossec P, Korn T, Kuchroo VK. Interleukin-17 and type 17 helper T cells. *N Engl J Med* 2009;361:888-898.
- 77 Liu H, Rohowsky-Kochan C. Regulation of IL-17 in human CCR6⁺ effector memory T cells. *J Immunol* 2008;180:7948-7957.
- 78 Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 2006;177:566-573.
- 79 Nakae S, Nambu A, Sudo K, Iwakura Y. Suppression of immune induction of collagen-induced arthritis in IL-17-deficient mice. *J Immunol* 2003;171:6173-6177.
- 80 Fujita H, Nogales KE, Kikuchi T, Gonzalez J, Carucci JA, Krueger JG. Human Langerhans cells induce distinct IL-22-producing CD4⁺ T cells lacking IL-17 production. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009;106:21795-21800.

- 81 Duhon T, Geiger R, Jarrossay D, Lanzavecchia A, Sallusto F. Production of interleukin 22 but not interleukin 17 by a subset of human skin-homing memory T cells. *Nat Immunol* 2009;10:857-863.
- 82 Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon α/β -producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 2000;192:219-226.
- 83 Alexopoulou L, Holt AC, Medzhitov R, Flavell RA. Recognition of double-stranded RNA and activation of NF- κ B by Toll-like receptor 3. *Nature* 2001;413:732-738.
- 84 Ito T, Amakawa R, Kaisho T, et al. Interferon- α and interleukin-12 are induced differentially by Toll-like receptor 7 ligands in human blood dendritic cell subsets. *J Exp Med* 2002;195:1507-1512.
- 85 Mazzoni A, Segal DM. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol* 2004;75:721-730.
- 86 Takeda K, Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors. *Annu Rev Immunol* 2003;21:335-376.
- 87 Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 2001;276:37692-37699.
- 88 Mathers AR, Janelsins BM, Rubin JP, et al. Differential capability of human cutaneous dendritic cell subsets to initiate Th17 responses. *J Immunol* 2009;182:921-933.
- 89 Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1 β and 6 but not transforming growth factor- β are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007;8:942-949.
- 90 Wilson NJ, Boniface K, Chan JR, et al. Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells. *Nat Immunol* 2007;8:950-957.

- 91 Duraisingham SS, Hornig J, Gotch F, Patterson S. TLR-stimulated CD34 stem cell-derived human skin-like and monocyte-derived dendritic cells fail to induce Th17 polarization of naive T cells but do stimulate Th1 and Th17 memory responses. *J Immunol* 2009;183:2242-2251.
- 92 Weiss DS, Raupach B, Takeda K, Akira S, Zychlinsky A. Toll-like receptors are temporally involved in host defense. *J Immunol* 2004;172:4463-4469.
- 93 Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 2005;6:769-776.
- 94 Bagchi A, Herrup EA, Warren HS, et al. MyD88-dependent and MyD88-independent pathways in synergy, priming, and tolerance between TLR agonists. *J Immunol* 2007;178:1164-1171.
- 95 Mäkelä SM, Strengell M, Pietilä TE, Osterlund P, Julkunen I. Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2009;85:664-672.
- 96 Lombardi V, Van Overtvelt L, Horiot S, Moingeon P. Human dendritic cells stimulated via TLR7 and/or TLR8 induce the sequential production of IL-10, IFN- γ , and IL-17A by naive CD4⁺ T cells. *J Immunol* 2009;182:3372-3379.
- 97 Sato S, Nomura F, Kawai T, et al. Synergy and cross-tolerance between Toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways. *J Immunol* 2000;165:7096-7101.
- 98 Romani N, Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994;180:83-93.
- 99 Meng G, Rutz M, Schiemann M, et al. Antagonistic antibody prevents Toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest* 2004;113:1473-1481.

- 100 Inohara N, Chamaillard M, McDonald C, Nuñez G. NOD-LRR proteins: role in host-microbial interactions and inflammatory disease. *Annu Rev Biochem* 2005;74:355-383.
- 101 Kashyap DR, Wang M, Liu LH, Boons GJ, Gupta D, Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins kill bacteria by activating protein-sensing two-component systems. *Nat Med* 2011;17:676-683.
- 102 Uehara A, Sugawara Y, Kurata S, et al. Chemically synthesized pathogen-associated molecular patterns increase the expression of peptidoglycan recognition proteins via Toll-like receptors, NOD1 and NOD2 in human oral epithelial cells. *Cell Microbiol* 2005;7:675-686.
- 103 Royet J, Gupta D, Dziarski R. Peptidoglycan recognition proteins: modulators of the microbiome and inflammation. *Nat Rev Immunol* 2011;11:837-851.
- 104 Gruschwitz MS, Hornstein OP. Expression of transforming growth factor type β on human epidermal dendritic cells. *J Invest Dermatol* 1992;99:114-116.
- 105 de Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, et al. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol* 1998;160:1666-1676.
- 106 Lutz MB, Kurts C. Induction of peripheral CD4⁺ T-cell tolerance and CD81 T-cell cross-tolerance by dendritic cells. *Eur J Immunol* 2009;39:2325-2330.
- 107 Banchereau J, Bazan F, Blanchard D, et al. The CD40 antigen and its ligand. *Annu Rev Immunol* 1994;12:881-922.
- 108 Peiser M, Wanner R, Kolde G. Human epidermal Langerhans cells differ from monocyte-derived Langerhans cells in CD80 expression and in secretion of IL-12 after CD40 cross-linking. *J Leukoc Biol* 2004;76:616-622.

- 109 Schulz O, Edwards AD, Schito M, et al. CD40 triggering of heterodimeric IL-12p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal. *Immunity* 2000;13:453-462.
- 110 Qi H, Denning TL, Soong L. Differential induction of interleukin-10 and interleukin-12 in dendritic cells by microbial toll-like receptor activators and skewing of T-cell cytokine profiles. *Infect Immun* 2003;71:3337-3342.
- 111 Peng JC, Hyde C, Pai S, O'Sullivan BJ, Nielsen LK, Thomas R. Monocyte-derived DC primed with TLR agonists secrete IL-12p70 in a CD40-dependent manner under hyperthermic conditions. *J Immunother* 2006;29:606-615.
- 112 Luft T, Luetjens P, Hochrein H, et al. IFN- α enhances CD40 ligand-mediated activation of immature monocyte-derived dendritic cells. *Int Immunol* 2002;14:367-380.
- 113 Edwards AD, Manickasingham SP, Spörri R, et al. Microbial recognition via Toll-like receptor-dependent and -independent pathways determines the cytokine response of murine dendritic cell subsets to CD40 triggering. *J Immunol* 2002;169:3652-3660.
- 114 Tada H, Aiba S, Shibata KI, Ohteki T, Takada H. Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with Toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells. *Infect Immun* 2005;73:7967-7976.
- 115 Warger T, Osterloh P, Rechtsteiner G, et al. Synergistic activation of dendritic cells by combined Toll-like receptor ligation induces superior CTL responses in vivo. *Blood* 2006;108:544-550.
- 116 Reynolds JM, Pappu BP, Peng J, et al. Toll-like receptor 2 signaling in CD4⁺ T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease. *Immunity* 2010;32:692-702.

117 Tonel G, Conrad C, Laggner U, et al. Cutting edge: A critical functional role for IL-23 in psoriasis. *J Immunol* 2010;185:5688-5691.

118 Nakajima K, Kanda T, Takaishi M, et al. Distinct roles of IL-23 and IL-17 in the development of psoriasis-like lesions in a mouse model. *J Immunol* 2011;186:4481-4489.

119 Ma HL, Liang S, Li J, et al. IL-22 is required for Th17 cell-mediated pathology in a mouse model of psoriasis-like skin inflammation. *J Clin Invest* 2008;118:597-607.

120 Roelofs MF, Joosten LAB, Abdollahi-Roodsaz S, et al. The expression of Toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of Toll-like Receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum* 2005;52:2313-2322.

121 Hennessy EJ, Parker AE, O'Neill LA. Targeting Toll-like receptors: emerging therapeutics? *Nat Rev Drug Discov* 2010;9:293-307.

122 Gerald G, Krueger MD, Richard G, et al. A human interleukin-12/23 monoclonal antibody for the treatment of psoriasis. *N Engl J Med* 2007;356:580-592.

123 Kaplan DH, Igyártó BZ, Gaspari AA. Early immune events in the induction of allergic contact dermatitis. *Nat Rev Immunol* 2012;12:114-124.

124 Martin SF, Dudda JC, Bachtanian E, et al. Toll-like receptor and IL-12 signaling control susceptibility to contact hypersensitivity. *J Exp Med* 2008;205:2151-2162.

125 Guttman-Yassky E, Nograles KE, Krueger JG. Contrasting pathogenesis of atopic dermatitis and psoriasis-part II: immune cell subsets and therapeutic concepts. *J Allergy Clin Immunol* 2011;127:1420-1432.

126 Dunne A, Marshall NA, Mills KH. TLR based therapeutics. *Curr Opin Pharmacol* 2011;11:404-411.

127 Steinhagen F, Kinjo T, Bode C, Klinman DM. TLR-based immune adjuvants. *Vaccine* 2011;29:3341-3355.

128 Chen WH, Basu S, Bhattacharjee AK, Cross AS. Enhanced antibody responses to a detoxified lipopolysaccharide-group B meningococcal outer membrane protein vaccine are due to synergistic engagement of Toll-like receptors. *Innate Immun* 2010;16:322-332.

129 Palucka K, Ueno H, Banchereau J. Recent developments in cancer vaccines. *J Immunol* 2011;186:1325-1331.

130 Giermasz AS, Urban JA, Nakamura Y, et al. Type-1 polarized dendritic cells primed for high IL-12 production show enhanced activity as cancer vaccines. *Cancer Immunol Immunother* 2009;58:1329-1336.

131 Wilke CM, Bishop K, Fox D, Zou W. Deciphering the role of Th17 cells in human disease. *Trends Immunol* 2011;32:603-611.

132 Kryczek I, Banerjee M, Cheng P, et al. Phenotype, distribution, generation, and functional and clinical relevance of Th17 cells in the human tumor environments. *Blood* 2009;114:1141-1149.

133 Manicassamy S, Ravindran R, Deng J, et al. Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity. *Nat Med* 2009;15:401-409.

134 Oosterhoff D, Sluijter BJ, Hangalapura BN, de Gruijl TD. The dermis as a portal for dendritic cell-targeted immunotherapy of cutaneous melanoma. *Curr Top Microbiol Immunol* 2012;351:181-220.

7 Lebenslauf

Der Lebenslauf ist in der Online-Version aus Gründen des Datenschutzes nicht enthalten.

8 Publikationsliste

Aliahmadi E, Gramlich R, Grützkau A, Hitzler M, Krüger M, Baumgrass R, Schreiner M, Wittig B, Wanner R, Peiser M. TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1 β , TGF- β and IL-23. Eur J Immunol. 2009;39:1221-1230.

Gramlich R, Aliahmadi E, Hitzler M, Wanner R, Wittig B, Peiser M. Combinatory stimulation of human dendritic cells with specific TLR agonists polarizes Th cells releasing different pattern of IFN- γ , IL-17 and IL-22. Eingereicht.

9 Selbständigkeitserklärung

Ich, Robert Michael Gramlich, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: „Die kombinatorische Stimulation von Toll-like Rezeptoren auf dendritischen Zellen und ihr Effekt auf die Polarisierung von CD4⁺T-Zellen“ selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.

Datum

Unterschrift

10 Danksagung

Zu besonderem Dank fühle ich mich PD Dr. Reinhard Wanner verpflichtet. Seine Anleitung und Unterstützung bei der Durchführung der Experimente waren Voraussetzung für ihr Gelingen. Er ist vor Abschluss dieser Dissertation unerwartet und viel zu früh verstorben.

Ich danke Prof. Dr. Stahlmann, der mir die Fertigstellung dieser Arbeit am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie ermöglicht hat.

Ich danke Prof. Dr. Wittig für die Möglichkeit, die Experimente im Institut für Molekularbiologie und Bioinformatik durchführen zu können.

Ich danke PD Dr. Matthias Peiser, der mich während des gesamten Prozesses der Arbeit begleitet hat – von der ersten Zellkultur bis zur Korrektur des Manuskripts. Mit Geduld und Kompetenz vermittelte er mir gutes wissenschaftliches Arbeiten und eröffnete mir die Möglichkeit, die Forschungsergebnisse als Erstautor zu publizieren.

Ich danke Ehsan Aliahmadi für Kurzweiligkeit bei stundenlangen Pipettiersessions und gegenseitige Motivation.

Ich danke meinen Eltern, die mir in jeder Phase meines Lebens beistehen. Ihr Rückhalt und ihre Liebe halfen mir, Studium und Dissertation erfolgreich abzuschließen.

Ich danke allen Mitarbeitern am Institut für Molekularbiologie und Bioinformatik der Medizinischen Fakultät der Charité, am Institut für Klinische Pharmakologie und Toxikologie an der Charité Campus Mitte und der Firma Mologen für die freundliche Aufnahme und Unterstützung.