

1 Einleitung

1.1 Aufgaben des Immunsystems

Das Immunsystems hat vielfältige Aufgaben zu erfüllen, aber alle dienen dem einen Zweck: Der Aufrechterhaltung der Integrität des Organismus. Diese Integrität ist ständig gefährdet. Hierbei spielen sowohl die Bedrohung von außen als auch die Bedrohung von innen eine Rolle.

Auf einige wichtige Funktionen soll im folgenden kurz eingegangen werden.

1.1.1 Bedeutung des Immunsystems beim Gewebeumbau

Der Organismus ist ein komplexer Verband aus vielen unterschiedlichen Organsystemen, welche aus unterschiedlichen Geweben und Zellarten bestehen. Diese Gewebe befinden sich mehr oder weniger in einem ständigen Umbau. Neue Zellen werden gebildet, alte und ausgediente Zellen müssen beseitigt werden. So herrscht im Körper ein hoher Umsatz an Zellen. Gewebe mit einem hohen Zellumsatz sind zum Beispiel die Haut, das Darmepithel und das Leberparenchym, in denen permanent neue Zellen gebildet werden und alte Zellen sterben. Hat also eine Zelle ihre Aufgabe erfüllt und wird vom Körper nicht mehr benötigt, stellt sie nur noch unnötigen Ballast dar; diese Zellen müssen sterben. Dieses Sterben läuft kontrolliert ab, wobei die Zellen den Prozess der Apoptose, den programmierten Zelltod, durchlaufen. [1] Die Apoptose wird auf unterschiedliche Weise ausgelöst. So scheinen alle Zellen die Fähigkeit zu haben, „spontan“ in Apoptose zu gehen. Aber auch eine Apoptoseinduktion von Außen ist möglich. Dabei wird das Signal zum Beispiel durch Rezeptor/Rezeptor-Wechselwirkungen (z.B. FAS/FAS-Ligand) oder durch lösliche Mediatoren (z.B. Tumornekrosefaktor- α (TNF- α)) ausgelöst. Die Signaltransduktion führt in der Zelle zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren und dadurch zur Induktion von pro-apoptotischen Genen. So werden Endonukleasen gebildet, welche die DNA in kleine Fragmente zerschneiden. Über die Neuexpression von Zelloberflächenmarkern (z.B. ICAM-3) wird das Erkennen der apoptotischen Zellen durch Phagozyten unterstützt. Außerdem kommt es zur Freisetzung von intrazellulärem Kalzium und zum Abbau von ATP. Ein entscheidender Schritt bei der Apoptose scheint der Verlust der Membranasymmetrie zu sein, welcher dazu führt, dass sonst nur streng auf der Innenseite der Membran angeordnete anionische Phospholipide und das Phosphatidylserin (PS) sich frei auf beiden Seiten der Membran verteilen. Diese sind unter anderem die Erkennungszeichen für die in der Nachbarschaft wartenden Phagozyten, welche die apoptotischen Zellen aufnehmen. Die schnelle Phagozytose der

apoptotischen Zellen stellt einen entscheidenden Prozess für die Aufrechterhaltung der normalen Gewebshomöostase dar, da es sich bei der Apoptose nicht um einen Vorgang handelt, bei dem die Zellen einen bestimmten Zustand erreichen und in diesem verharren. Werden die apoptotischen Zellen nicht rechtzeitig phagozytiert, schreitet der Zerfall weiter fort. Die Zellen werden sekundär nekrotisch, sie zerfallen und setzen so ihren potenziell pro-entzündlichen Inhalt frei. Dieses würde zu einer anhaltenden Entzündung und Gewebeschädigung führen. [2, 3]

Die Abräumung der apoptotischen Zellen durch das Immunsystem trägt somit wesentlich zum Schutz der Integrität des Organismus bei.

1.1.2 Bedeutung des Immunsystems in der Tumorabwehr

Eine weitere Bedrohung des Organismus von Innen ist die durch eine Veränderung des Erbmaterials (z.B. von Tumorsuppressorgenen) ausgelöste Entstehung und unkontrollierte Vermehrung von Tumorzellen. Diese Zellen können die umliegenden Zellen, Gewebe und Organe durch ihr ungebremstes Wachstum schädigen und zerstören. Durch die Metastasierung der Tumorzellen und systemische Effekte werden auch weiter entfernte Organe und der Gesamtorganismus angegriffen. Um diese Auswirkungen auf den Organismus zu verhindern, bestehen genetische Reparaturmechanismen („DNA-Repair“) um an der DNA entstandene Schäden durch Reparaturenzyme zu beseitigen und so die maligne Transformation der Zellen zu verhindern. [4] Greifen diese Mechanismen nicht, können in einer weiteren Stufe durch die genetischen Veränderungen in der Zelle Tumorsuppressorgene (z. B. p53) aktiviert werden. Dies führt dann zur Apoptose dieser prä-karzinösen Zellen. [5] Gelingt auch dies nicht, hat das Immunsystem die Aufgabe, diese Zellen zu vernichten. Die Tumorzellen verändern nicht nur ihr funktionelles Verhalten, sondern auch ihre Genexpression. So werden in einigen Tumorzellen Keimzellgene reaktiviert, in anderen werden normale Selbstantigene überexprimiert oder durch Mutationen verändert. Diese Antigene werden nun auf der Zelloberfläche durch den MHC (*Major Histocompatibility Complex*) I-Komplex präsentiert. Da sowohl die Keimzellantigene als auch die veränderten Selbstantigene vom Immunsystem erkannt werden, können die zytotoxischen T-Zellen die so identifizierten Tumorzellen zum Beispiel durch den Angriff mit zytotoxischen Proteinen (z.B. Perforin, Granzym) beseitigen. [6, 7] Tumorzellen können aber ihre Immunogenität verringern, um so dem spezifischen Immunsystem mit seinen T-Lymphozyten zu entrinnen. Eine Möglichkeit ist der Verlust von MHC I-Molekülen auf der Tumorzelloberfläche. So können die veränderten Antigene nicht mehr präsentiert und erkannt werden. Wird jedoch von einer Zelle kein MHC I-

Komplex exprimiert, wird das von den Natural-Killer-Zellen (NK-Zellen) erkannt, welche diese Zellen lysieren. [7, 8]

Auch das humorale Immunsystem kann durch die Bildung von Tumorantigen-spezifischen Antikörpern bei der Tumorbabwehr mitwirken. Durch Antikörper markierte Tumorzellen werden durch NK-Zellen und aktivierte Makrophagen angegriffen und zerstört. Diesen Vorgang bezeichnet man als Antikörper-abhängige zelluläre Zytotoxizität (ADCC). [9]

Auch durch den Kampf gegen entartete Zellen trägt das Immunsystem zum Schutz der Integrität des Organismus bei.

1.1.3 Bedeutung des Immunsystems bei der Abwehr von Erregern

Die Gefahr von Außen spiegelt sich in der Bedrohung durch Bakterien, Viren, Pilzen und Parasiten wieder. Die Abwehr dieser Organismen kann durch passive, aber auch aktive Mechanismen erreicht werden. Zu den passiven Mechanismen gehören die Haut- und Schleimhautbarrieren, die in den meisten Fällen ein Eindringen der Erreger erst gar nicht zulassen. Wird diese Barriere von den Mikroorganismen überwunden, werden diese nun durch das Immunsystem aktiv bekämpft. [10]

Das Immunsystem hat unterschiedliche Abwehrmechanismen entwickelt, um sich gegen die verschiedenen Erreger adäquat zu verteidigen. So kann man das Immunsystem grob in das spezifische (adaptive) und das unspezifische (angeborene) Immunsystem einteilen.

Das adaptive Immunsystem kann sich jeweils spezifisch auf extrazelluläre Erreger und Toxine mit der Bildung von Antikörpern (humorale Immunität) und auf intrazelluläre Erreger (z.B. Viren) durch die Ausbildung einer zytotoxischen Reaktion (zelluläre Immunität) einstellen. Bei beiden Reaktionen werden aus einem großen Pool von bestehenden Zellen jeweils diejenigen ausgesucht, welche die Erregerantigene am besten erkennen. Diese einzelnen Zellen müssen sich nun noch stark vermehren und entwickeln, um direkt als spezifische Effektorzellen oder über die Freisetzung von Immunglobulinen als löslichen Effektormolekülen eine Abwehrreaktion auszulösen. Auch wird für die zelluläre wie die humorale Immunität ein Gedächtnis ausgebildet, dass bei einer erneuten Exposition mit dem Erreger eine schnellere und potentere spezifische Immunantwort erlaubt. [1]

Innerhalb des unspezifischen Immunsystem kann der Organismus aus einer Vielzahl unterschiedlicher und bereits in größeren Mengen vorhandenen Mitteln die jeweils effektivsten für die Abwehr der Mikroorganismen bzw. Pathogene nutzen. Unspezifisches Immunsystem bedeutet nicht, dass es sich hierbei nicht um spezifische Mechanismen

handelt. Es muss jedoch nicht erst, wie beim adaptiven Immunsystem, eine zeitaufwendige Reifung und Expansion der Immunantwort durchgeführt werden. Dies ist möglich, da das unspezifische System für viele in der Natur immer wieder vorkommende Fremdstrukturen schon angeborene Abwehrmechanismen aufweist. [10] Hierbei sind besonders das Komplementsystem und die sogenannten „Pattern Recognition Receptors“ (PRR) zu nennen, welche sich in regelmäßigen Abständen wiederholende Elemente (Pattern) auf der Oberfläche von Mikroorganismen erkennen und deren Phagozytose vermitteln. [11] Auf das Erkennen und die Phagozytose von Mikroorganismen wird im Folgenden noch ausführlich eingegangen.

Bei der spezifischen und unspezifischen Immunabwehr handelt es sich aber nicht um zwei von einander unabhängige Systeme. Sie ergänzen und überschneiden sich vielmehr in ihrer Wirkung. So werden zum Beispiel Mikroorganismen durch Phagozyten (z.B. Makrophagen) nicht nur aufgenommen, verdaut und so unschädlich gemacht [10], sondern das aufgenommene fremde Antigen wird den Zellen des spezifischen Immunsystems präsentiert. Auf diese Weise kann eine spezifische Immunantwort ausgelöst werden. [1] Andererseits unterstützen durch spezifische Immunzellen freigesetzte Zytokine, z.B. IFN- γ , die Aktivität der unspezifischen Abwehrzellen. [12]

Auch durch die Abwehr von Pathogenen wird die Integrität des Organismus bewahrt.

1.2 Rolle der Zytokine bei der Immunregulation

Das Immunsystem ist kein starres Gebilde. Die Anforderungen an das System sind im Einzelnen so unterschiedlich, dass es sich immer wieder neu auf die nötige Immunantwort einstellen muss. Um eine möglichst schnelle Reaktion sicherzustellen, können nicht jedes mal alle Zellen vollkommen neu gebildet werden. Es ist vielmehr so, dass bei der Immunantwort aus den vorhandenen Immunzellen die jeweils geeigneten rekrutiert, aktiviert (z.T. auch expandiert) und so beeinflusst werden, dass sie optimal ihre Aufgaben wahrnehmen können. [1, 10]

Für die Steuerung all dieser Vorgänge der Immunantwort spielen lösliche Mediatoren, die Zytokine, eine außerordentliche Rolle. Sie tragen wesentlich zur Regulation der Immunreaktion bei.

Zytokine sind kleine Proteine, welche von einer Vielzahl von Körperzellen, einschließlich denen des Immunsystems, gebildet werden. In der Regel werden sie durch einen aktivierenden Stimulus induziert, produziert und freigesetzt, um durch Bindung an spezifische Rezeptoren bestimmte Reaktionen auszulösen. Zytokine können autokrin

wirken, durch Veränderung des Verhaltens der Zelle, welche das Zytokin selbst produziert hat, oder aber parakrin, durch die Wirkung auf benachbarte Zellen. Einige Zytokine wirken aber auch endokrin und beeinflussen entferntere Zellen, jeweils abhängig von der gebildeten Menge, der Halbwertszeit und der Fähigkeit, in die Zirkulation zu gelangen. [13]

Eine Vielzahl von Zytokinen interagieren bei der Regulation des Immunsystems. Dabei können auf der einen Seite gleichartige Effekte durch verschiedene Zytokine (Redundanz), auf der anderen Seite unterschiedlichste Effekte durch ein und das selbe Zytokin vermittelt werden (Pleiotropie). Auch können die einzelnen Zytokine zueinander agonistische oder aber antagonistische Wirkungen haben. So ist es innerhalb des hochkomplexen Gefüges „Immunsystem“ möglich, auf die sich ständig verändernden Anforderungen zu reagieren und durch den Einfluss der Zytokine die Effektormechanismen (z.B. Antigenpräsentation) auf die jeweiligen Aufgaben neu auszurichten. [12, 14]

Im Folgenden soll auf wichtige die Monozytenfunktion regulierende Zytokine eingegangen werden.

1.2.1 Charakterisierung von ausgewählten Zytokinen

1.2.1.1 *Interleukin-10 (IL-10)*

Das humane IL-10 ist ein homodimeres Protein, dessen Untereinheiten aus 160 Aminosäuren bestehen. Es wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen, aktivierten T-Zellen (CD8+; CD4+) und EBV-transformierten B-Zellen gebildet. Der IL-10-Rezeptor (IL-10R) besteht aus 2 Untereinheiten, der IL-10-bindenden alpha-Kette (IL-10R1) und der β -Kette (IL-10R2) aus der Interferon (IFN)-Rezeptor-Familie. Die Signalvermittlung erfolgt über das Jak/Stat-System. [15, 16]

IL-10 hat eine hemmende Wirkung auf die Sekretion von proinflammatorischen Mediatoren (z.B. TNF- α , IL-1, IL-6, Chemokine), welche von aktivierten Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen produziert werden. Auch werden durch IL-10 natürliche Antagonisten (z.B. Interleukin-1-Rezeptor-Antagonist (IL-1RA)) dieser Mediatoren induziert. Dadurch vermittelt IL-10 aktiv eine antiinflammatorische Wirkung. Des weiteren senkt IL-10 durch die Expressionshemmung von MHC Klasse II- und kostimulatorischen Molekülen, wie CD86, die Kapazität von Antigen-präsentierenden Zellen (APZ), wie Monozyten, Makrophagen, und Dendritischen Zellen, Antigen effektiv zu präsentieren. Auf B-Zellen wirkt IL-10 proliferationssteigernd und fördert ihre Differenzierung und beeinflusst

in Abhängigkeit von anderen Mediatoren die Bildung der verschiedenen Antikörper-Klassen (Isotyp-„Switch“). Auf die Proliferation und die Zytokinproduktion (IFN- γ , IL-2, TNF- α) der CD4-positiven T-Helferzellen hat IL-10, direkt und indirekt (durch Hemmung der Antigenpräsentation und IL-12-Produktion der APC), einen hemmenden Einfluss.

Diese Wirkungen zeigen IL-10 als Inhibitor von Effektorfunktionen der T-Helferzellen, Monozyten und Makrophagen und als antiinflammatorisches Zytokin. In Übereinstimmung damit zeigen IL-10-Knockout-Mäuse eine gesteigerte Potenz, auf entzündliche Stimuli zu reagieren, und eine chronisch-entzündliche Darmerkrankung. [15, 16]

1.2.1.2 Interferon- γ (IFN- γ)

IFN- γ ist ein dimeres, zweifach glykolisiertes Protein mit Untereinheiten aus 166 Aminosäuren. Es wird hauptsächlich von aktivierten T-Zellen (CD4+; CD8+) und NK-Zellen sezerniert. Die Synthese von IFN- γ wird unter anderem von IL-2 induziert, wohingegen zum Beispiel IL-10 und TGF- β 1 eine hemmende Wirkung aufweisen. Der IFN- γ -Rezeptorkomplex (IFN- γ R) besteht wie der IL-10-Rezeptor aus zwei Untereinheiten, aus alpha-Kette (IFN- γ R1) und der β -Kette (IFN- γ R2). Die Bindung von IFN- γ erfolgt hauptsächlich durch die alpha-Kette, die Signaltransduktion über das Jak/Stat-System wird durch beide Ketten vermittelt. [17]

Interferon- γ hat antivirale und antiparasitäre Eigenschaften, wirkt auf verschiedene Zellen antiproliferativ, vermittelt aber im Gegensatz zu den anderen Interferonen (IFN- α , IFN- β) hauptsächlich immunmodulatorische Funktionen. IFN- γ wird auch als Makrophagen-stimulierender Faktor bezeichnet, da es die Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen und Mikroorganismen, das Abtöten von intrazellulären Pathogenen und die Kapazität von Makrophagen, effektiv Antigen zu präsentieren (über die vermehrte Expression von MHC Klasse II- und kostimulatorischen Molekülen), steigert. Auch werden proinflammatorische Zytokine, wie TNF- α , in Monozyten induziert, während IFN- γ auf die Produktion von IL-8 und IL-10 einen hemmenden Einfluss hat. [18, 19]

Durch die Wirkung von IFN- γ entwickeln sich naive T-Helferzellen vermehrt in Typ 1 T-Helferzellen (Th1-Zellen), welche die Zell-vermittelte Immunität stärken. Das Wachstum von B-Zellen wird gehemmt und es erfolgt ein Antikörperklassen-„Switch“ hin zu opsonierenden Antikörpern. [17, 19]

Diese Effekte zeigen IFN- γ größtenteils als Stimulator der Effektorfunktionen von T-Zellen und Makrophagen. Diese Wirkungen werden auch durch Beobachtungen an IFN- γ

knockout-Mäusen bestätigt. Es wird eine durch eine verminderte zytotoxische Immunantwort verminderte Resistenz gegenüber intrazellulären Infektionen, insbesondere gegen Mykobakterien und einige Viruserkrankungen, beschrieben. [19]

Ähnliches wird auch bei Menschen mit Mutationen in den Genen für den IFN- γ -Rezeptor beschrieben. Es treten vermehrt Infektionen mit atypischen Mykobakterien auf. [17]

1.2.1.3 Transformierender Wachstumsfaktor- β (TGF- β)

TGF- β existiert in 5 Isoformen, TGF- β 1-5. Die Aminosäuresequenzen haben untereinander eine Homologie von 70-80%. Bei TGF- β 1 handelt es sich um die allgemein vorherrschende Form, während die anderen Formen nur von wenigen Zellen und Geweben expremiert werden. Bei den biologisch aktiven Formen handelt es sich um über Disulfid-Brücken verbundene Homodimere. TGF- β 1 wird jedoch als latentes TGF- β 1, bestehend aus dem eigentlichen TGF- β 1, dem Latenz-assoziierten Peptid (LAP) und dem latentes TGF- β -bindenden Protein (LT-BP), sezerniert. Vor der Bindung an seinen Rezeptor muss das latente TGF- β 1 durch Proteasen (z.B. Plasmin, Thrombospondin) aktiviert werden.

Auch der TGF- β -Rezeptor (TGF- β R) besteht aus verschiedenen Einheiten, Typ 1-3 (TGF- β R1-3). Dabei bilden TGF- β R1 und 2 zusammen den Signal-vermittelnden Komplex, wobei TGF- β R2 den Liganden bindet und den sich daraufhin andockenden TGF- β R1 phosphoryliert, welcher dann das Signal in die Zelle vermittelt. Der TGF- β R3 dient nur der Präsentation von TGF- β an den TGF- β R1/2-Komplex; er hat keine Signal-transduzierende Wirkung.

TGF- β ist mit hohem Gehalt in Thrombozyten, aber auch Milz- und Knochengewebe enthalten. Produzenten von TGF- β 1 sind zum Beispiel Makrophagen, Lymphozyten, Chondrozyten und Endothelzellen. [20]

TGF- β 1 hat vielfältige Funktionen im Organismus, wobei hier hauptsächlich auf die für das Immunsystem eingegangen werden soll. TGF- β 1 ist ein sehr potenter Wachstumsinhibitor für zum Beispiel Endothelzellen, Fibroblasten, Nervenzellen, Leberzellen, Keratinozyten und hämatopoetische Zellen, wie den lymphoiden Zellen. So werden die Proliferation von T-Zellen und NK-Zellen gehemmt, Makrophagen deaktiviert und unter anderem die Anti-Tumor-Aktivität dieser Zellen vermindert. Auch das Wachstum und die Reifung von B-Zellen wird gehemmt, und während die Synthese von IgG und IgM gehemmt wird, wird die Produktion von IgA angeregt (Antikörperisotyp-„Switch“). Die Produktion von

proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF- α , und die Expression von MHC Klasse I und II auf Monozyten/Makrophagen werden ebenfalls inhibiert.

Diese Wirkungen von TGF- β 1 auf das Immunsystem zeigen einen starken deaktivierenden Einfluss sowohl auf die spezifische als auch die unspezifische Immunität. Dieser Einfluss wird durch die beobachteten Effekte in der TGF- β 1-knock-out-Maus zusätzlich verdeutlicht. Diese Tiere sind nicht lebensfähig, sie sterben an einer überschießenden Entzündungsreaktion, welche zu einer massiven Infiltration von Lymphozyten und Makrophagen in viele Organe, zu Gewebsnekrose, Organversagen und Tod führt. [20]

1.2.2 Wechselwirkungen der Zytokine

Wechselwirkungen der verschiedenen Zytokine sollen hier kurz beispielhaft dargestellt werden.

Das unspezifische Immunsystem spielt bei der Entzündungsreaktion eine herausragende Rolle. Dringen Erreger (z.B. Bakterien) in den Körper ein, werden sie durch ortsständige Immunzellen (z.B. Gewebsmakrophagen) erkannt, welche nun eine Entzündungsreaktion auslösen. Durch die Produktion und Wirkung von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. TNF- α , IL-1, IL-6, IL-8 und andere Chemokine) und anderen Mediatoren werden andere Abwehrzellen aus dem Blut und der Umgebung angelockt und auf ihre Aufgabe, z.B. das Abtöten der Bakterien, vorbereitet. [10, 13] Um diese Entzündungsreaktion lenken und limitieren zu können, muss die Möglichkeit zur Gegenregulation gegeben sein, die Antiinflammation. So ist es möglich, die Entzündungsreaktion zu kontrollieren und bei Bedarf auch wieder zu beenden. Wichtige antiinflammatorische Zytokine sind IL-10, IL-1RA und TGF- β 1. Ebenfalls antiinflammatorische Wirkungen können lösliche Zytokinrezeptoren, wie z.B. lösliche TNF- α -Rezeptoren, haben. Zusätzlich kann auch die proinflammatorische Potenz einer Zelle (z.B. Monozyten/Makrophagen) durch Zytokine beeinflusst werden. So steigern einige Zytokine (z.B. TNF- α , IL-12 und IFN- γ) die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen innerhalb einer Entzündungsreaktion. Andere Zytokine (z.B. IL-10) hemmen diese Reaktion. [15, 19, 20]

Auch das spezifische Immunsystem wird durch Zytokine reguliert. Hierbei spielt unter anderem das Zytokinmilieu beim ersten Antigenkontakt der T-Helferzellen eine wichtige Rolle für die Festlegung auf eine überwiegend zelluläre oder humorale Immunreaktion. IL-12 und IFN- γ wirken zum Beispiel als Stimulator der zellulären Immunantwort, während IL-4 und IL-10 das Entstehen einer humoralen Antwort fördern. [18, 21]

Durch das Wirken der Zytokine an den Zellen des Immunsystems wird durch eine Vielzahl von jeweils „kleinen“ Reaktionen die Immunantwort als Ganzes beeinflusst.

1.3 Bedeutung der Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen

1.3.1 Herkunft und Entwicklung

Monozyten entwickeln sich aus den CD34+ myeloiden Vorläuferzellen des Knochenmarks durch die Wirkung des Makrophagenkolonie-stimulierenden Faktors (M-CSF). Monozyten selbst stellen ein im Blut vorhandenes Reservoir von Vorläuferzellen dar, welche sich in Abhängigkeit von ihrer lokalen Umgebung weiter differenzieren, in Makrophagen oder Dendritische Zellen. Vorläuferzellen soll in diesem Zusammenhang aber nicht bedeuten, dass Monozyten noch keine effektiven Immunzellen darstellen. Es ist vielmehr so, dass bei den Monozyten Funktionen vorhanden sind, welche sich bei einer Weiterentwicklung in Makrophagen bzw. Dendritische Zellen im Sinne einer Spezialisierung noch weiter verbessern. Andere Funktionen werden dagegen während der Differenzierung deutlich abgeschwächt werden oder gehen ganz verloren. [22]

Durch den Einfluss von M-CSF und/oder IL-10 differenzieren Monozyten zu Makrophagen. [310; 1056] Die Zytokine GM-CSF (Granulozyten/Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor) und IL-4 spielen eine entscheidende Rolle bei der Differenzierung von Monozyten in Dendritische Zellen, aber auch TGF- β 1, TNF- α und IFN- γ haben auf diesen Prozess einen stimulierenden Effekt. [23, 24]

1.3.2 Funktionen

Im Folgenden soll ein Überblick über die Unterschiede und Gemeinsamkeiten der Funktionen von Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen gegeben werden. Dabei soll vor allen Dingen auf die Zytokinproduktion, die Phagozytose und die Präsentation von Antigen eingegangen werden.

1.3.2.1 Monozyten

Monozyten können nach ihrem Erscheinungsbild und ihrer Funktion in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Die mit über 80% größte Untergruppe stellen die klassischen Monozyten dar. Sie werden charakterisiert über ihre ausgeprägte Fähigkeit zur Zytokinproduktion, Phagozytose und Zytotoxizität gegenüber Tumorzellen. Diese

klassischen Monozyten, welche nur relativ gering MHC Klasse II-Moleküle exprimieren, können durch ihre potente Phagozytose eine effektive unspezifische Immunantwort gegenüber den eingedrungenen Pathogenen auslösen. Durch ihre hohe chemotaktische Reaktivität können sie schnell zu den Entzündungsherden rekrutiert werden, dort große Mengen von proinflammatorischen Zytokinen freisetzen und wieder weitere Monozyten und Effektorzellen anlocken. Gleichzeitig wird auch die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen gesteigert, was die Mikrobizidität erhöht und so zu einem erfolgreichen Abräumen der Pathogene oder toten Zellen führt. Ein Ausbreiten der Entzündungsreaktion wird dadurch letztendlich verhindert. Des Weiteren kann durch die Produktion von Prostaglandin E₂ (PGE₂) durch aktivierte klassische Monozyten die Antigen- oder Autoantigen-induzierte lymphozytäre Proliferation gehemmt und so eine spezifische Immunantwort herabreguliert werden. [22]

Die anderen bisher definierten Untergruppen der Monozyten zeigen ein mehr heterogenes Bild, teilweise mit Eigenschaften von Makrophagen, teilweise von Dendritischen Zellen. Die plasmazytoiden Monozyten beispielsweise scheinen die Vorläufer der Dendritischen Zellen vom Typ 2 sein. Sie haben eine geringe kostimulatorische und phagozytäre Aktivität gemeinsam.

Monozyten einer anderen Untergruppe zeigen eine starke Expression von MHC Klasse I und II- und kostimulatorischen Molekülen. Sie zeigen außerdem eine erhöhte IL-12 Sekretion und induzieren so eine erhöhte IFN- γ -Freisetzung bei den Antigen-stimulierten T-Zellen, wie es für die aktivierten Makrophagen, aber auch für die reifen Dendritischen Zellen vom Typ 1 beschrieben wird.

Des Weiteren werden Vorläufer von Dendritischen Zellen mit sowohl einer ausgeprägten T-Zell-aktivierenden Kapazität, als auch mit einer hohen Phagozytoseleistung beschrieben. Diese Eigenschaften sind auf der einen Seite charakteristisch für Dendritische Zellen, auf der anderen Seite für die klassischen Monozyten.

Letztendlich scheint es, dass keine der beschriebenen Monozytenuntergruppen im Blut einen irreversibel gereiften Zelltyp darstellt. Vielmehr zeigen die Zellen die Fähigkeit zu einer weiteren Differenzierung in die eine (Makrophagen) oder andere (Dendritische Zellen) Richtung. Es ist zu vermuten, dass die lokalen Bedingungen, insbesondere das Zytokinmilieu, dabei von großer Bedeutung sind. [22]

1.3.2.2 Makrophagen

Aus Monozyten, welche die Zirkulation verlassen und in die verschiedensten Gewebe

wandern, entwickeln sich kontinuierlich residente Gewebsmakrophagen. Sie sind besonders stark im Verdauungstrakt und in der Lunge vertreten. An verschiedenen Orten des Körpers finden sich organspezifische Makrophagen, wie zum Beispiel die Alveolarmakrophagen in der Lunge und die Kupffer-Zellen in der Leber. [10]

Ruhende Makrophagen exprimieren kaum MHC Klasse II- und kostimulatorische Moleküle. Sie besitzen aber eine Vielzahl von Rezeptoren, mit welchen sie Mikroorganismen erkennen und/oder phagozytieren können. Diese Rezeptoren sind zum Beispiel „Scavenger“-Rezeptoren, Komplement-Rezeptoren, Immunglobulin-Fc-Rezeptoren und „Toll-like“-Rezeptoren. Diese Rezeptoren dienen nicht nur der Phagozytose, sondern auch der Aktivierung der Makrophagen. Dies führt zur Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen, welche andere Zellen rekrutieren und wiederum aktivieren. Die aufgenommenen Mikroorganismen werden in Endosomen und Lysosomen degradiert und die entstehenden Peptide von MHC Klasse II-Molekülen gebunden. Diese Makrophagen können nun auch als Antigen-präsentierende Zellen fungieren, da ihre Aktivierung eine verstärkte Expression von MHC Klasse II- und kostimulatorischen Molekülen vermittelt. [25]

Nach der Funktion unterscheidet man zwei Arten von Makrophagen, die proinflammatorischen und die antiinflammatorischen. Proinflammatorische Makrophagen entstehen, wenn die Zellen durch als fremd erkannte Pathogene aktiviert werden, proinflammatorische Zytokine, wie zum Beispiel IL-12, produzieren, diese Pathogene phagozytieren und effektiv Antigen präsentieren. Das führt zusammen zu einer eher Th1-lastigen Immunreaktion, also zu einer überwiegend zellvermittelten Immunantwort.

Werden durch die Phagozytose-Rezeptoren der Makrophagen Elemente erkannt und aufgenommen, fehlen aber Strukturen die vom unspezifischen Immunsystem als fremd erkannt werden, wie zum Beispiel bei apoptotischen Zellen, findet keine Aktivierung dieser Zellen statt. Nicht nur, dass die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen und die Expression von kostimulatorischen Molekülen ausbleibt, es werden aktiv antiinflammatorische Zytokine, wie IL-10 und TGF- β 1, gebildet, welche das inflammatorische Potenzial reduzieren, ablaufende Entzündungsreaktionen beschränken und das spezifische Immunsystem hin zu einer anti-entzündlichen oder humoralen Immunantwort (Th2-Antwort) lenken. [26]

So wird bereits beim ersten Kontakt die Reaktionsweise des Immunsystems gegenüber den verschiedenen Antigenen festgelegt. Dabei kann sich eine entzündliche und/oder zelluläre oder eine anti-entzündliche und/oder humorale Immunantwort ausbilden. Auch das Ausbleiben einer spezifischen Immunantwort, zum Beispiel als Reaktion auf

Selbstantigen (z.B. apoptotische Zellen), ist möglich. [25, 26]

Makrophagen stellen also hochspezialisierte Zellen des angeborenen Immunsystems dar, welche sich durch eine hohe Phagozytosekapazität auszeichnen, aber durch die Fähigkeit zur Antigenpräsentation und Zytokinproduktion auch Einfluss auf die Ausbildung einer spezifischen Immunantwort haben.

1.3.2.3 Dendritische Zellen

Auch die Dendritischen Zellen (DC) stellen eine heterogene Gruppe von Zellen dar, welche Unterschiede in ihrer anatomischen Lokalisation, ihrem Phänotyp und ihrer Funktion aufweisen. Auf die gemeinsamen Eigenschaften soll hier kurz eingegangen werden. Sie stammen von den CD34+ Vorläufern ab, verteilen sich über den Blutstrom in die verschiedenen Gewebe, wo sie sich zu unreifen Dendritischen Zellen entwickeln. Die noch unreifen Zellen haben die Fähigkeit, Antigen über Rezeptor-vermittelte Phagozytose (z.B. Komplement- und Fc-Rezeptoren) und Pinozytose aufzunehmen. Das Antigen wird in den Phagolysosomen degradiert und die entstehenden Peptide an MHC Klasse II-Moleküle gebunden. Wird die Zelle nun aktiviert (z.B. durch einen Entzündungsreiz), kommt es zu einer Hochregulation der Expression mit Peptid-beladener MHC Klasse II-Komplexe und der kostimulatorischen Moleküle (z.B. CD86) auf der Zelloberfläche. Diese Zellen verlassen den Ort der Phagozytose und wandern in die sekundären lymphatischen Organe (z.B. Lymphknoten), um dort mit den T-Helfer-Zellen zu kommunizieren. Die so entstandenen reifen Dendritische Zellen haben eine deutlich gesteigerte MHC-Klasse II-Expression; die Antigenaufnahme und -prozessierung sind im Vergleich zu den unreifen Dendriten jedoch stark eingeschränkt. In Abhängigkeit vom aktivierenden Signal entstehen reife Dendritische Zellen vom Typ 1 (DC1) (durch z.B. IFN- γ , TNF- α), welche IL-12 sezernieren können, oder vom Typ 2 (DC2) (durch z.B. Prostaglandin E2, cAMP), welche kein IL-12 freisetzen. Erkennen T-Helferzellen mit ihrem T-Zellrezeptor-Komplex Antigen auf den MHC-Klasse II-Komplexen der Dendritischen Zellen zusammen mit kostimulatorischen Molekülen, proliferieren sie. Durch das IL-12 der DC1 entstehen T-Helferzellen vom Typ 1 (Th1-Zellen), welche eine eher zellulär vermittelte Immunantwort auslösen. Das Fehlen von IL-12 bei der Antigenpräsentation von DC2 führt zu Typ 2-T-Helferzellen (Th2-Zellen). Sie induzieren eine eher humorale Immunreaktion. [23]

Durch die Präsentation von Antigen (intrazelluläres Antigen, z.B. Viren) über MHC-Klasse I-Moleküle können über den beschriebenen Weg auch CD8+ zytotoxische T-Zellen aktiviert werden. [23]

Die Funktion der Dendritischen Zellen ist also auf die Präsentation von Antigen und die Initiierung einer zellulären Immunantwort ausgerichtet. Hierbei erfolgt die Aufnahme des Antigens durch die unreifen Dendriten, die Antigenpräsentation durch die reifen Zellen.

1.3.3 Zusammenfassung

Wie im Vorangegangenen beschrieben, entstehen die Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen aus einem gemeinsamen Vorläufer. Die Monozyten stellen einen Übergang zu den höher spezialisierten Makrophagen und Dendritischen Zellen dar. Innerhalb dieses Entwicklungsprozesses entstehen die verschiedenen Monozytenuntergruppen, welche schon Eigenschaften der Makrophagen bzw. Dendritischen Zellen annehmen. [22]

Die Makrophagen sind eher die Wächter des angeborenen Immunsystems, was sie durch das effektive Abräumen und Beseitigen von Antigen bzw. Material unter Beweis stellen.

Die Dendritischen Zellen stellen eher die Vorposten des spezifischen Immunsystems in den einzelnen Geweben dar. Dies zeigt sich durch ihre Spezialisierung auf die Präsentation des aufgenommenen Antigens, wodurch sie nach ihrer Aktivierung und der Wanderung in die sekundären lymphatischen Organe, die dortigen naiven T-Zellen primen bzw. Gedächtniszellen reaktivieren. [26]

Diese Beschreibungen stellen jedoch nur einen groben Überblick dar. Die jeweiligen Funktionszustände der Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen können im Einzelnen stark variieren, wobei der Einfluss von Zytokinen eine große Rolle spielt.

1.4 Monozyten/Makrophagen bei der Abwehr von Bakterien

1.4.1 Inflammatorische Reaktion

Eine wichtige Funktion der Monozyten/Makrophagen ist das Erkennen von Bakterien oder Bakterienbestandteilen und das Einleiten einer Entzündungsreaktion. Das Lipopolysaccharid (LPS, Endotoxin), ein Bestandteil der Bakterienwand Gram-negativer Bakterien, stellt einen starken proinflammatorischen Reiz für das Immunsystem dar. Das körpereigene LPS-bindende Protein (LBP) bildet mit dem LPS einen Komplex (LPS/LBP-Komplex), welcher die Affinität von LPS an seinen Rezeptor, CD14, erhöht. Aber nicht nur Bestandteile der Gram-negativen Bakterien werden von CD14 gebunden, sondern auch andere Monozyten/Makrophagen-aktivierende Elemente von Gram-positiven Bakterien (z.B. Peptidoglykane). [11, 27]

CD14 ist ein über Glykosylphosphatidylinositol (GPI) an die Zellmembran gebundenes Glykoprotein, welches besonders stark auf der Membran von Monozyten und Makrophagen expremiert wird. Da CD14 keine transmembranösen Regionen hat, kann es jedoch nicht selbst Signale in die Zelle vermitteln. In den letzten Jahren wurde entdeckt, dass CD14 lediglich der Präsentation des LPS/LBP-Komplexes an die „Toll-like“-Rezeptoren (TLR) dient. Der TLR-4 erkennt die Anwesenheit der Gram-negativen Bakterien, der TLR-2 soll die Gram-positiven Bakterien, zum Beispiel an ihren Glykanen, erkennen. Diese TLRs vermitteln dann das Signal in die Zelle, welches die Entzündungskaskade auslöst. Wesentlich ist hierfür die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, welcher im Kern eine Vielzahl von an der Abwehr von Infektionen beteiligte Gene aktiviert.

Dabei wird unter anderem die Produktion von proinflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und die Expression von kostimulatorischen Molekülen getriggert. So ist CD14 zwar nicht das signalgebende Molekül, aber die Initialisierung der Entzündungsreaktion durch eine Vielzahl von bakteriellen Stimuli ein CD14-abhängiger Prozess. [11]

Aber auch in CD14-negativen Zellen kann eine Entzündungsreaktion durch LPS ausgelöst werden. Hierbei übernimmt das lösliche CD14 (sCD14) die Aufgabe der Präsentation gegenüber den TLRs. So ist es durch das im Plasma vorkommende lösliche CD14 (sCD14) möglich, zum Beispiel auch in Endothelzellen eine inflammatorische Reaktion durch LPS herbeizuführen. [28]

Wie schon beschrieben, wird diese Entzündungsantwort durch Zytokine unterschiedlich beeinflusst. So kann eine Entzündungsreaktion nicht nur angeschoben, gehalten und gesteigert werden (wie durch IFN- γ), sondern auch limitiert und wieder beendet werden (wie durch IL-10, TGF- β 1).

1.4.2 Phagozytose von Bakterien

Monozyten und Makrophagen haben sich als professionelle Phagozyten unter anderem auf die Aufnahme von Bakterien spezialisiert. Um jedoch die Erreger aufnehmen zu können, müssen diese von den Fresszellen erkannt werden. Zu diesem Zweck gibt es verschiedene Phagozytoserezeptoren und -mechanismen.

Auf der einen Seite können in den Körper eingedrungene Bakterien durch Antikörper, welche zum Beispiel bei einer vorausgegangenen Immunreaktion gegen Antigene des selben oder eines ähnlichen Keims gebildet worden sind, gebunden werden. Die Bindung

der Antikörper an die Phagozyten erfolgt dann durch die Fc-Rezeptoren (Fc-R). Die meist in regelmäßigen Abständen wiederholt auf der Oberfläche von Pathogenen angeordneten Antigene führen zu einer Quervernetzung der Fc-R und so zu einer Signaltransduktion. Werden die Zellen aktiviert, nehmen sie die Bakterien auf, indem sie den allseits von Antikörpern markierten Keim durch das sukzessive Erkennen der Fc-Komponenten mit der Zellmembran umschließen und letztendlich einen intrazellulären Vesikel, das Phagosom, bilden. Die Phagosomen verschmelzen nun mit Lysosomen, welche antimikrobiell-wirkende Proteine, Enzyme und Peptide enthalten, zu Phagolysosomen. Zusätzlich können andere bakteriotoxische Produkte wie Wasserstoffperoxid (H_2O_2), freie Sauerstoffradikale (O_2^-) und Stickoxide (NO) durch lysosomale Enzyme (z.B. NADPH-Oxidasen) gebildet werden. Diese Reaktion wird als „Respiratory Burst“ bezeichnet. Auf diese Weise können die phagozytierten Keime angegriffen und zerstört werden. [10, 29]

Eine große Rolle bei der Antikörper-vermittelten Phagozytose von Bakterien spielen die Antikörper vom Typ G (Immunglobulin G (IgG)). Die Aufnahme von IgG-markierten Partikeln erfolgt über die Fc- γ -Rezeptoren (Fc- γ R). Es existieren drei Typen von Fc- γ R, welche IgG mit verschiedener Affinität binden, Fc- γ RI (CD64) bindet mit hoher Affinität, Fc- γ RII (CD32) mit mittlerer und Fc- γ RIII (CD16) mit geringer Affinität. Die einzelnen Klassen der Fc- γ R sind auf den Effektorzellen in unterschiedlicher Stärke expremiert und vermitteln jeweils spezifische Reaktionen. So vermittelt der hauptsächlich auf Makrophagen, aktivierten Neutrophilen und Dendritischen Zellen expremierte Fc- γ RI (CD64) die Phagozytose der durch IgG gebundenen Partikel, die Zellen werden aktiviert und das Abtöten in den Phagolysosomen induziert bzw. gesteigert. Der besonders auf Makrophagen und Neutrophilen expremierte Fc- γ RII (CD32) induziert auch die Aufnahme der Partikel in die Zellen. Fc- γ RIII (CD16) wird besonders von NK-Zellen und Neutrophilen, aber auch Makrophagen auf der Oberfläche getragen und bindet IgG-markierte Zellen (z.B. Tumorzellen). Durch das Verschmelzen der Lysosomen mit diesen Regionen der Zellmembran wird der Lysosomeninhalt gegen diese Zellen freigesetzt und so eine Antikörper-abhängige zellvermittelte Zytotoxizität (ADCC) ausgelöst. [29]

Auf der anderen Seite können Bakterien auch durch das Komplementsystem, welches aus einer Vielzahl von Proteasen, den Komplementfaktoren, besteht, angegriffen werden. Dieses System kann durch verschiedene Auslöser (siehe unten) angeschoben werden. In der frühen Phase der Komplementaktivierung werden Komplexe auf der Oberfläche der Pathogene gebildet, welche als sogenannte C3-Konvertasen den Faktor C3 in die Faktoren C3b und C3a schneiden. Der Faktor C3b kann nun kovalent an das Pathogen binden und es so opsonieren oder zusammen mit der C3-Konvertase den Faktor C5 in die Faktoren C5b und C5a zerlegen. Der Faktor C5b kann nun zusammen mit den Faktoren

C6-C9 den sogenannten Membran-Angriffs-Komplex bilden, welcher eine Pore in die Membran schneidet und auf diesem Weg bei einigen Pathogenen (z.B. Neisserien) zur Lyse der Membran und so zu ihrem Tod führt.

Durch die Proteaseprodukte C3a und besonders C5a wird eine lokale proinflammatorische Immunantwort vermittelt und verstärkt. So wird unter anderem die Permeabilität der Blutgefäße gesteigert und so die Rekrutierung von Leukozyten an den Ort der Entzündung induziert. Faktor C5a vermittelt zusätzlich durch die Hochregulation von Komplement- und anderen Phagozytoserezeptoren auf zum Beispiel Neutrophilen und Monozyten eine Steigerung der Phagozytosekapazität.

Durch die Bindung des Faktors C3b an die Membran des Pathogenes kann die Phagozytose des markierten Keimes vermittelt werden. Dabei wird der Faktor C3b von spezifischen Komplementrezeptoren (CR) auf den Phagozyten erkannt und es kommt zu einer Rezeptor-vermittelten Phagozytose. Die auf der Oberfläche von Monozyten, Makrophagen und Neutrophilen exprimierten Komplementrezeptoren CR1 (CD35), CR3 (CD11b/CD18) und CR4 (CD11c/CD18) binden den Faktor C3b und induzieren auf diesem Weg die Phagozytose.

Es werden heute drei Aktivierungswege beschrieben, welche zur Aktivierung der Komplementkaskade führen können:

- der klassische Weg, durch die Bindung von Antikörpern, besonders IgM und IgG vom Typ 1 (IgG1) und 3 (IgG3); [30, 31, 32]
- der Mannan-bindendes Lektin (MBL) Weg, wobei MBL ubiquitär auf der Pathogenoberfläche vorkommende Mannose, aber auch andere Zucker, bindet; [32]
- und der alternative Weg, durch spontane Hydrolyse an verschiedensten Strukturen auf der Oberfläche von Pathogen und körpereigenen Zellen, welche im Gegensatz zu den Pathogenen jedoch durch bestimmte Faktoren (z.B. DAF) geschützt werden. [32]

Die Opsonierung durch Antikörper und/oder Komplement ist entscheidend für die Erkennung, Phagozytose und dadurch den Schutz des Organismus vor dem schädigenden Einwirken von Bakterien oder anderen Pathogenen.

1.4.3 Regulation der Phagozytose von Bakterien

Die Mechanismen der Antikörper- bzw. Komplement-vermittelten Phagozytose unterliegen

der Regulation durch das Immunsystem, zum Beispiel durch Zytokine. Auf die Wirkung der auch in dieser Arbeit untersuchten Zytokine (IL-10, IFN- γ , TGF- β 1) soll im Folgenden kurz eingegangen werden.

Eine Möglichkeit für die Regulation der Phagozytose scheint die Veränderung der Expression der Phagozytoserezeptoren, der Fc- und Komplementrezeptoren, zu sein. So wird für IL-10 und IFN- γ eine Steigerung der Fc- γ RI (CD64)-Expression auf Monozyten und Dendritischen Zellen (DC) beschrieben. [1013, 1047] TGF- β 1 hemmt die Expression von Fc- γ RII (CD32), während IL-10 keinen signifikanten Einfluss hat. [1044, 1018] Auch auf die monozytäre Expression von Fc- γ RIII (CD16), CR1 und CR3 zeigt IL-10 keinen Effekt, während IFN- γ die CR3-Expression auf Makrophagen steigert. [33, 34]

Diese Veränderungen der Phagozytoserezeptor-Expression entsprechen jedoch nicht in jedem Fall der Zytokinregulation der durch diese Rezeptoren vermittelten Phagozytose. In diesem Sinne wird durch IFN- γ die Fc- γ R- und CR3/CR1-vermittelte Phagozytose von Monozyten und Makrophagen gehemmt, während IL-10 eine Steigerung dieser Funktionen vermittelt. [35] Diese Gegensätze sollen jedoch später im Zusammenhang mit den im Rahmen dieser Arbeit erzielten Resultaten genauer diskutiert werden.

In der Literatur wird vielfach auf die Regulation der Monozytenphagozytose eingegangen, ohne den Mechanismus genauer zu beschreiben. Für IL-10 wird eine Steigerung der Monozytenphagozytose [36, 37], zum Beispiel von *E. coli* beschrieben [38], wohingegen für IFN- γ eine Hemmung der Phagozytose von zum Beispiel Mykobakterien und *Pseudomonas aeruginosa* beschrieben wird. [39, 40, 41] TGF- β 1 reduziert die monozytäre Phagozytosekapazität, zum Beispiel von *Mykobakterium tuberculosis*. [42]

Zusammenfassend kann man also sagen, dass IL-10 einen stimulierenden Effekt auf die Monozytenphagozytose von Bakterien, IFN- γ und TGF- β 1 jedoch einen hemmenden Effekt haben.

1.4.4 Rolle von CD14 bei der Phagozytose von Bakterien

Eine Opsonierung durch Antikörper und/oder Komplement ist jedoch nicht zwingend für die Bindung und Phagozytose von Bakterien durch Monozyten/Makrophagen nötig. Es gibt noch eine Vielzahl anderer Rezeptoren, welche die Aufnahme von Bakterien und anderen Pathogenen vermitteln. Diese Gruppe der Rezeptoren wird als „Pattern-Recognition Receptors“ (PRR) bezeichnet und die Elemente, welche erkannt werden, als „Pathogen-associated Molecular Pattern“ (PAMP). Diese Einteilung dient als Modell, um die ständig wachsende Gruppe von erkannten Elementen (Pattern) und den

dazugehörigen Rezeptoren zusammenzufassen. [43]

Neu, und damit letztendlich Ansatz für diese Arbeit, war, dass auch das CD14-Molekül in diese Gruppe der PRR gehört. In den ersten Publikationen über dieses Thema wird CD14 als ein Phagozytoserezeptor für Gram-negative Bakterien beschrieben. Dort wurde gezeigt, dass Monozyten oder mit CD14 transfezierte Zellen das Gram-negative Bakterium *Escherichia coli* (*E. coli*) phagozytieren können. Diese Phagozytose ist nicht nur von CD14-abhängig, was durch die Blockade mit spezifischen anti-CD14 Antikörpern gezeigt werden konnte, sondern auch von der Anwesenheit des LPS-bindenden Proteins (LBP). Im Gegensatz zur IgG- oder Komplement-abhängigen Phagozytose ist die CD14-abhängige Phagozytose unabhängig von der Anwesenheit von freiem Kalzium-Ionen. [44, 45]

CD14 hat aber nicht nur die Fähigkeit LPS zu binden, sondern erkennt darüber hinaus auch andere Elemente der Bakterienwand, auch auf Gram-positiven Bakterien (z.B. Peptidoglykan). [1042] In späteren Veröffentlichungen konnte auch die CD14-abhängige Phagozytose von Gram-positiven Bakterien nachgewiesen werden. Zum Beispiel wurde das Serum-vorbehandelte Gram-positive Bakterium *Bacillus subtilis* von der Monozyten-Zelllinie U937 streng CD14- und LBP-abhängig phagozytiert. Dieser Phagozytosemechanismus scheint somit für die Phagozytose von Gram-positiven wie auch von Gram-negativen Bakterien eine Rolle zu spielen. [46]

Die Effektivität, aber auch die Regulation der CD14-abhängigen Phagozytose wurden bisher noch nicht untersucht.

1.5 Monozyten/Makrophagen beim Gewebeumbau

1.5.1 Antiinflammation durch Abräumung apoptotischen Materials

Für den Schutz des Organismus vor unnötiger Entzündung hat die schnelle Phagozytose von apoptotischen Zellen einen hohen Stellenwert. Gerade für das Immunsystem als Gewebe mit einem sehr hohen Zellumsatz spielt die Phagozytose von apoptotischen Immunzellen eine große Rolle. So folgt zum Beispiel nach der für die spezifische Immunantwort nötigen Expansion von aktivierten Lymphozyten nach der Elimination des Antigens die Apoptose von einem Großteil dieser ausdifferenzierten, aber nicht mehr benötigten Effektorzellen. Nur ein kleiner Teil dieser Zellen bleibt als Gedächtniszellen erhalten. Die Apoptose der nicht mehr benötigten Zellen regelt auf der einen Seite die funktionelle Anpassung des Immunsystems, und die schnelle Phagozytose der apoptotischen Zellen schützt auf der anderen Seite vor der Entstehung von sekundär

nekrotischen Zellen und so vor dem Zerfall und der Freisetzung von entzündlichem Material. [1, 3, 47]

Mit der Phagozytose ist die Gefahr des Zerfalls der apoptotischen Zellen und der damit verbundenen Entzündung und Gewebeschädigung gebannt. In der Regel werden aber von den Monozyten/Makrophagen/DC aufgenommene Partikel abgebaut und zur Initialisierung einer Immunantwort den anderen Immunzellen präsentiert. Die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch zum Beispiel Dendritische Zellen kann zur Peptid-Präsentation durch MHC-Klasse II Moleküle führen; die Cross-Präsentation durch MHC-Klasse I-Moleküle kann eine spezifische Immunreaktion von zytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) induzieren. Diese Präsentation von Antigenen apoptotischer Zellen wird kontrovers diskutiert. Da es sich bei den Antigenen der apoptotischen Zellen natürlicherweise um Autoantigene handelt, muss eine Immunreaktion aber unter allen Umständen vermieden werden. Im Gegensatz zu den DC wird durch die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Makrophagen keine Immunantwort ausgelöst. Zusätzlich wird durch diese Makrophagen eine effektive Antigenpräsentation der DC aktiv unterdrückt. Diese Hemmung der Zell-vermittelten Immunität wird durch die Sekretion von antiinflammatorischen Mediatoren hervorgerufen. [3, 48] So wird in Makrophagen durch die Phagozytose von apoptotischen Zellen die Produktion von Prostaglandin E₂, TGF- β 1 und IL-10 ausgelöst [49, 50], welche durch die Unterdrückung der Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-12, TNF- α) und der Expression von kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD86) eine effektive Antigenpräsentation verhindern. Auch die beobachtete Freisetzung von IL-10 durch die apoptotischen Zellen selbst würde eine solche Wirkung vermitteln. [51] Dieses anti-entzündliche Milieu spielt also eine wichtige Rolle beim Schutz vor der Entstehung und der Aktivierung von autoreaktiven Effektorzellen. [3, 48] Im Gegensatz zur Phagozytose von apoptotischen Zellen führt die Phagozytose von nekrotischen Zellen durch die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen (z.B. CD40) auf der Makrophagenoberfläche zu einer T-Zellproliferation. [52]

Darum scheint es umso wichtiger, dass die apoptotischen Zellen abgeräumt werden, bevor sie nekrotisch werden. Das schützt nicht nur vor der Freisetzung von entzündlichem Material, sondern auch vor einer Reaktion des Immunsystems gegen „Selbst“.

1.5.2 Phagozytose von apoptotischen Zellen

Auch bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen werden durch verschiedene Rezeptoren spezifisch Elemente auf der Oberfläche der apoptotischen Zellen erkannt. Die verschiedenen Rezeptoren und Elemente werden in Analogie zur Phagozytose der

Pathogene in Gruppen zusammengefasst, die mit den apoptotischen Zellen assoziierten Elemente als ACAMPs („Apoptotic Cell-associated Molecular Pattern“) und die Rezeptoren, welche diese Elemente erkennen, als PRRs („Pattern-Recognition Receptor“). [43]

Die Veränderung der Zellmembran scheint bei der Entstehung apoptotischer Zellen eine entscheidende Rolle zu spielen. Hierbei kommt es unter anderem zur Externalisierung des bei vitalen Zellen streng intrazellulär angeordneten Phosphatidylserin (PS) und zur Glykolisierung von Oberflächenproteinen. [53] Aber auch für andere Strukturen auf apoptotischen Zellen wurde eine Bedeutung für ihre Phagozytose nachgewiesen. So sind zum Beispiel Mannose, Adhäsionsmoleküle (ICAM-3 auf Leukozyten), oxidierte Oberflächenstrukturen, aber auch Thrombospondin und Komplementfaktoren bei der Bindung von apoptotischen Zellen an die Phagozyten beteiligt. Diese Bindung erfolgt durch eine Vielzahl verschiedener Rezeptoren, wie den Lektinen, den Integrinen (z.B. Vitronektin-Rezeptor), den „Scavenger“-Rezeptoren (z.B. CD163) und den Komplementrezeptoren (CR3, CR4). [54]

In einem großen, sich überschneidenden System stehen einer Vielzahl von ACAMPs eine Vielzahl von PRRs gegenüber. Dabei binden bestimmte Elemente nicht nur an verschiedene Rezeptoren, es werden auch von einzelnen Rezeptoren eine Vielzahl unterschiedlicher Elemente erkannt. Dies spiegelt sich zum Beispiel in der Tatsache wider, dass bestimmte PRRs nicht nur ACAMPs, sondern auch PAMPs („pathogen-associated molecular pattern“) erkennen können (z.B. Komplementfaktoren/-rezeptoren). Auf der anderen Seite wird zum Beispiel das Phosphatidylserin (PS) von apoptotischen Lymphozyten durch Lektine oder Integrine, je nach Aktivierungszustand der Makrophagen, gebunden. [55] Diese Vielzahl der Rezeptoren und der von ihnen erkannten Elemente sichert bei der Verschiedenheit der Apoptosemechanismen bei den einzelnen Zelltypen das schnelle Abräumen der sterbenden Zellen. [43]

1.5.3 Regulation der Phagozytose von apoptotischen Zellen

Im Gegensatz zur Regulation der Bakterien-Phagozytose liegen bisher kaum Erkenntnisse zur Regulation der Phagozytose von apoptotischen Zellen vor. Hier soll kurz auf Ergebnisse zu den in dieser Arbeit untersuchten Zytokine eingegangen werden.

Für IFN- γ und TGF- β 1 werden stimulierende Effekte auf die Phagozytose von apoptotischen Neutrophilen durch Makrophagen beschrieben, während in einer anderen Arbeit über einen hemmenden Einfluss von IL-10 und IFN- γ auf die Aufnahme von

Neutrophilen durch Makrophagen berichtet wird. [56, 57]

Diese wenigen, teilweise widersprüchlichen Ergebnisse verdeutlichen, dass auf dem Gebiet der Regulation der Phagozytose von apoptotischen Zellen noch ein großer Klärungsbedarf herrscht. Auch im Rahmen dieser Arbeit sollen dazu weitere Antworten gefunden werden.

1.5.4 Bedeutung von CD14 bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen

Das CD14-Molekül wurde in der Vergangenheit immer mit seiner Funktion als Rezeptor für bakterielle und andere mikrobielle Strukturen, besonders des LPS/LBP-Komplexes, und der dadurch vermittelten inflammatorischen Reaktion in Verbindung gebracht. Wie auch hier schon beschrieben, konnte in den letzten Jahren nachgewiesen werden, dass CD14 auch an der Phagozytose von Bakterien beteiligt ist. [44, 45] In diesem Zusammenhang war es unerwartet, als man herausfand, dass CD14 bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen eine Rolle spielen kann. Die Bindung und Phagozytose der apoptotischen Zellen wird durch eine Region der CD14-Moleküls vermittelt, welche mit der LPS/LBP-Bindungsstelle identisch ist oder sich zumindest in ihrer unmittelbaren Nähe befindet. [58]

Die Frage danach, welche Apoptose-assoziierten Elemente (ACAMPs) auf den verschiedenen Zelltypen im Einzelfall erkannt werden, wurde noch nicht ausreichend beantwortet. Für verschiedene ACAMPs konnte aber eine Bindung an das CD14-Molekül gezeigt werden. So werden durch das CD14-Molekül Phospholipide, wie das Phosphatidylserin, gebunden, deren Bindung durch das LPS-bindende Protein (LBP) zusätzlich erleichtert wird. [59] Des Weiteren wurde nachgewiesen, dass das ICAM-3-Molekül, ein stark glykolisiertes Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie auf der Oberfläche von Leukozyten, das Erkennen von apoptotischen Zellen durch Makrophagen vermittelt. Während ICAM-3 auf vitalen Zellen an das Leukozytenfunktionsantigen-1 (LFA-1) bindet und so ein kostimulatorisches Signal zwischen der Antigen-präsentierenden Zelle und dem ruhenden T-Lymphozyten zur Initialisierung einer Immunantwort auslöst, kann eine Bindung zwischen ICAM-3 auf apoptotischen Leukozyten und LFA-1 nicht mehr beobachtet werden. Auch hier konnte eine Interaktion zwischen dem ICAM-3 auf den apoptotischen Leukozyten und dem CD14-Molekül auf der Oberfläche von Makrophagen nachgewiesen werden. [60] Gerade für das Abräumen von apoptotischen Leukozyten scheint das CD14-Molekül wichtig zu sein. So konnte zum Beispiel die Phagozytose von apoptotischen Lymphozyten durch einen blockierenden anti-CD14 Antikörper größtenteils aufgehoben werden. [55] Aber die Rolle von CD14 bei

der Phagozytose von apoptotischen Zellen ist nicht nur auf die Leukozyten beschränkt. [54]

Während die Bindung von bakteriellen Strukturen wie LPS an CD14 zu einer proinflammatorischen Reaktion führt, bleibt diese bei der Phagozytose von apoptotischen Zellen nicht nur aus, sondern wird sogar aktiv unterdrückt. [54, 58] Dies ist um so interessanter, da die Regionen von CD14, welche sowohl die Bindung der bakteriellen Strukturen als auch die der apoptotischen Zellen vermitteln, identisch oder zumindest überlappend sind. [1073] Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen ist, dass das CD14-Molekül je nach gebundenem Liganden mit verschiedenen signalgebenden Partnern reagiert und so Entzündung oder Antientzündung vermittelt. [54]

Wie diese Mechanismen der Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Zytokine reguliert werden, wurde noch nicht untersucht bzw. beschrieben.

1.6 Aufgabenstellung

1.6.1 Allgemeines Anliegen

Das CD14-Molekül der Monozyten/Makrophagen nimmt innerhalb des unspezifischen Immunsystems eine interessante Stellung ein. Es ist mit den Toll-like-Rezeptoren assoziiert und bindet selbst im Sinne eines „Pattern Recognition Receptor“ eine Vielzahl von körpereigenen und körperfremden Strukturen, die auch phagozytiert werden und sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Wirkungen hervorrufen können.

Die Mechanismen dieser CD14-abhängigen Prozesse werden zwar intensiv erforscht, über ihre Regulation ist jedoch bisher noch wenig bekannt.

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Zytokinregulation der monozytären CD14-abhängigen Phagozytose zu untersuchen und diese Ergebnisse im Zusammenhang mit den bekannten durch CD14 vermittelten Funktionen zu diskutieren.

Dabei interessierte uns die Wirkung von Zytokinen, welche auf andere Funktionen der Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen einen deutlichen, aber zueinander verschiedenen Effekt haben. So untersuchten wir auf der einen Seite den Einfluss von $\text{IFN-}\gamma$, einem stark proinflammatorisch wirkenden und das spezifische Immunsystem stimulierenden Zytokin. Auf der anderen Seite prüften wir den Effekt von IL-10 und TGF- β 1, welche eine deutlich hemmende Wirkung auf den Ablauf einer Entzündungsreaktion und das Ausbilden einer spezifischen Immunantwort haben. [siehe 1.2.1] Unsere Annahme war, dass diese Zytokine auch auf die CD14-abhängige

Phagozytose einen uneinheitlichen Einfluss haben.

1.6.2 Spezielle Fragestellungen

1.6.2.1 Frage 1: Wie hoch ist die Kapazität der CD14-abhängigen Phagozytose im Vergleich zur uneingeschränkten Phagozytose?

Für die Phagozytose von Bakterien sind schon seit langem effektive Mechanismen, wie die durch Komplement- und Immunglobulinrezeptoren vermittelte Phagozytose, bekannt. Ob die neu entdeckte CD14-abhängige Aufnahme von Bakterien überhaupt eine wichtige Rolle spielen kann, hängt ganz entscheidend von ihrer Kapazität ab. Darum untersuchten wir als erstes die Kapazität der CD14-abhängigen Phagozytose im Vergleich zur uneingeschränkten Phagozytose von mit Komplement und Immunglobulin opsonierten Bakterien.

1.6.2.2 Frage 2: Gibt es eine Korrelation zwischen der Regulation der CD14-Expression und der CD14-abhängigen Phagozytosefunktion?

Als nächstes sollte die Frage beantwortet werden, ob eine Korrelation zwischen der Regulation der CD14-Expression und der Regulation der CD14-abhängigen Phagozytose durch wichtige immunregulatorische Zytokine besteht. Dafür wurde als erstes die Beeinflussung der monozytären CD14-Expression durch IL-10, IFN- γ und TGF- β 1 in Abhängigkeit von der verwendeten Dosis und der Zeit der Inkubation untersucht.

Da zum Zeitpunkt der Planung der Versuche nur die CD14-abhängige Phagozytose von Gram-negativen Bakterien (*E. coli*) bekannt war [44], untersuchten wir zur Ermittlung einer Korrelation von CD14-Expression und Funktion den Einfluss von IL-10, IFN- γ und TGF- β 1 auf diesen Prozess.

Neuere Erkenntnisse hinsichtlich einer Beteiligung von CD14 auch an der Phagozytose von apoptotischen Zellen führten dazu, dass wir zusätzlich die IL-10-Regulation auch dieser Funktion untersuchten. [58]