

## 4 Diskussion

### 4.1 Zusammenfassung der Ergebnisse

Im Rahmen dieser Arbeit untersuchten wir die Zytokinregulation CD14-abhängiger Funktionen der Monozyten, die Phagozytose von Gram-negativen Bakterien und von apoptotischen Zellen.

Nachdem bekannt wurde, dass CD14 nicht nur an der Vermittlung einer Entzündungsreaktion durch Bakterienbestandteile sondern auch an der Phagozytose von Gram-negativen Bakterien beteiligt ist, interessierte uns als erstes die Effektivität dieser CD14-abhängigen Phagozytose. Wir konnten zeigen, dass die Kapazität der Monozyten, nicht-opsonierte *E. coli*-Bakterien durch einen CD14-abhängigen Weg aufzunehmen, ebenso groß ist, wie die monozytäre Kapazität für eine uneingeschränkte Phagozytose von mit Komplement und Immunglobulin opsonierten *E. coli* im Vollblut. Dieses Ergebnis spricht für eine mögliche funktionelle Bedeutung der CD14-abhängigen Phagozytose und war damit die Voraussetzung für unsere nachfolgenden Untersuchungen zur Zytokinregulation dieser Funktion.

Als erstes untersuchten wir die Regulation der monozytären CD14-Expression und der Freisetzung von löslichem CD14 (sCD14) durch die wichtigen immunregulatorischen Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-10 und TGF- $\beta$ 1. In PBMC-Kulturen konnten wir folgende Effekte nachweisen: IL-10 steigert und IFN- $\gamma$  hemmt sowohl die monozytäre CD14-Expression als auch die Freisetzung von sCD14; TGF- $\beta$ 1 reduziert zwar die monozytäre Oberflächenexpression von CD14, hat aber auf die Freisetzung von sCD14 in PBMC-Kulturen keinen Einfluss.

Nun testeten wir den Einfluss der Zytokine auf die CD14-abhängige Phagozytose von Gram-negativen Bakterien im Vollblut. Durch eine Langzeitvorinkubation mit den Zytokinen (24 Stunden für IL-10 und 48 Stunden für IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1) wurde die CD14-abhängige Phagozytose von *E. coli*-Bakterien in Parallelität zu den Wirkungen auf die monozytäre CD14-Expression durch IL-10 gesteigert bzw. durch IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 gehemmt.

Zum Nachweis von Effekten, die unabhängig von der Regulation der CD14-Expression sind, untersuchten wir den Einfluss einer Kurzzeitinkubation mit den Zytokinen (1 bzw. 4 Stunden) auf die CD14-abhängige und die uneingeschränkte Phagozytose von nicht-opsonierten *E. coli*-Bakterien im Vollblut. Hierbei zeigten sich nach der 1-stündigen Vorinkubation keine nennenswerten Effekte; nach der 4-stündigen Zytokinvorinkubation offenbarten sich geringe Veränderungen, welche sich in ihrer

Richtung mit den bekannten Ergebnissen in den Langzeitkulturen deckten und von gleichlaufenden geringen Veränderungen der monozytären CD14-Oberflächenexpression begleitet waren.

In den abschließenden Experimenten untersuchten wir den Einfluss von IL-10 auf die uneingeschränkte monozytäre Phagozytose von apoptotischen Jurkat-Zellen (T-Lymphozyten) in Vollblutkulturen. Diese zum größten Teil CD14-abhängige Phagozytose wird durch IL-10 deutlich gesteigert. Dabei verdoppeln sich nahezu sowohl die CD14-abhängigen, als auch die CD14-unabhängigen Phagozytoseleistungen.

## **4.2 Effektivität und Bedeutung der CD14-abhängigen Phagozytose von Bakterien**

### **4.2.1 Phagozytosearten**

Die Phagozytose ist ein komplexes, über verschiedenste Mechanismen abgesichertes System. Diese Mechanismen reichen von den „Scavenger“-Rezeptoren (SR) über die Komplement-vermittelte Phagozytose durch Komplementrezeptoren bis hin zur Markierung der Pathogene durch Antikörper und der Aufnahme mit Hilfe der Fc-Rezeptoren.

Bei der Vielzahl der Rezeptoren scheint eine Hierarchie der Liganden-Spezifität vorzuliegen. Die „Scavenger“-Rezeptoren (SR) zum Beispiel repräsentieren das primitive Ende dieses Spektrums, die Fc-Rezeptoren die am weitesten Differenzierten. Auch scheinen diesen Systemen verschiedene Prinzipien zu Grunde zu liegen. Denn während die Fc- und Komplementrezeptoren nur mittelbar über immunologische Effektormoleküle (Antikörper bzw. Komplement) die Pathogene binden, können die Scavenger-Rezeptoren die Pathogene direkt erkennen. [63]

#### *4.2.1.1 Komplement-abhängige Phagozytose (alternativer Weg)*

Das Komplementsystem, welches aus einer Vielzahl von Proteasen, den Komplementfaktoren, besteht, kann durch verschiedene Strukturen auf Pathogenen angeschoben werden. In der Folge werden die Pathogene durch Komplement markiert oder sogar lysiert bzw. zerstört. Diese Vorgänge sind an verschiedenen Schaltstellen Kalzium-abhängig. Die durch Komplement markierten Pathogene werden nun durch die Komplementrezeptoren der Fresszellen erkannt und phagozytiert. [32]

Diese Mechanismen funktionieren jedoch nicht in jedem Fall. Manche Pathogene haben Ausweichmöglichkeiten gefunden. So kann der Komplement-vermittelte Angriff auf bestimmte Bakterienstämme (z.B. *E. coli* K1) durch eine besondere Polysaccharid-Struktur der Bakterienkapsel verhindert werden. [64, 65]

#### 4.2.1.2 Antikörperabhängige Phagozytose

Die auf Phagozyten exprimierten Fc-Rezeptoren erkennen selektiv den Fc-Teil der von den B-Zellen im Rahmen einer spezifischen Immunantwort gebildeten Immunglobuline. Binden die Antikörper nun die wiederholt vorkommenden Antigene auf der Pathogenoberfläche können diese durch die Fresszellen erfasst und aufgenommen werden.

Manche Antikörpertypen können nach der spezifischen Bindung ihres Antigens auch direkt das Komplementsystem aktivieren (klassischer Weg). Es kommt also parallel auch zur Markierung durch Komplement. Die so gekennzeichneten Pathogene können noch besser durch die Phagozyten erkannt und aufgenommen werden. [30, 31, 32]

Auch diese Mechanismen sind abhängig von der Anwesenheit von Kalzium-Ionen. [44]

Ebenso wie manche Bakterien es gelernt haben, dem Komplementsystem zu entgehen, entwickelten bestimmte Bakterien Strategien, um sich vor dem Angriff von Antikörpern zu schützen. So kann beispielsweise durch die Veränderung der Oberflächenantigenstruktur die Bindung von Antikörpern verhindert werden (z.B. *Neisseria spp.*). Andere Bakterien wie *Staphylococcus aureus* können durch ihr Protein A direkt mit den Antikörpern interagieren, indem sie den Fc-Teil von IgG binden. [64, 65]

#### 4.2.1.3 Neues System: CD14-vermittelte Phagozytose

Eine Opsonierung durch Antikörper und/oder Komplement ist jedoch nicht zwingend für die Bindung und Phagozytose von Bakterien durch Monozyten/Makrophagen notwendig. 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). [43]

Neu, und damit letztendlich Ansatz für diese Arbeit, war, dass auch das CD14-Molekül in diese Gruppe der phylogenetisch älteren PRR gehört.

So wurde in einer der ersten Publikationen zu diesem Thema die CD14-abhängige monozytäre Phagozytose von Grunwald et al. als eine von divalenten Kationen unabhängige bzw. als EDTA-resistente Phagozytose beschrieben. Zudem wurde die Unabhängigkeit dieser Phagozytose vom Komplementsystem durch Komplement-inaktivierung und Antikörperblockade der Komplementrezeptoren gezeigt. Dieser Phagozytoseweg ist jedoch von der Anwesenheit des LPS-bindenden Proteins (LBP) abhängig. Letztendlich kann die CD14-abhängige Aufnahme von Bakterien durch anti-CD14-Antikörper gegen die LPS-bindende Region des CD14-Moleküls geblockt werden, wohingegen anti-CD14-Antikörper, welche nicht gegen die LPS-bindende Region gerichtet sind, keine hemmende Wirkung auf die CD14-abhängige Phagozytose haben. [44]

Schiff et al. beschreiben dagegen, dass die Mechanismen der CD14-abhängigen Phagozytose von denen der CD14-abhängigen Zellaktivierung durch LPS unterschieden werden können. So soll ein anti-LBP-Antikörper, welcher keine Wirkung auf die durch LPS induzierte Zellaktivierung hat, die Kationen-unabhängige Phagozytose verhindern; ein die Zellaktivierung inhibierender anti-CD14-Antikörper hat hingegen keinen Einfluss auf die Bakterienphagozytose. [45]

Die Unterschiede zwischen den Ergebnissen von Grunwald et al. und Schiff et al. bezüglich der Aussagen zur CD14-abhängigen Zellaktivierung bzw. Phagozytose sind vielleicht dadurch zu erklären, dass die Antikörper verschiedene Epitope des CD14-Moleküls erkennen und deshalb die CD14-vermittelten Funktionen unterschiedlich beeinflussen.

Bei unseren Versuchen konnten wir nachweisen, dass mit dem von uns verwendeten anti-CD14-Antikörper RMO52 sowohl die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Freisetzung als auch die CD14-abhängige Phagozytose von *E. coli* verhindert werden konnten, was im Einklang mit den von Grunwald et al. veröffentlichten Ergebnissen mit dem anti-CD14-Antikörper biG-14 steht. [44]

Insgesamt ist die CD14-abhängige Phagozytose als ein etablierter neuer Weg der Bakterienphagozytose anzusehen. Ob es sich bei der CD14-abhängigen Phagozytose jedoch um eine effektive Möglichkeit zur Aufnahme von Bakterien oder nur um ein unter bestimmten Umständen in geringem Umfang ablaufenden Mechanismus handelt, musste noch nachgewiesen werden. Ebenso fehlten bisher Ergebnisse zur Zytokinregulation der CD14-abhängigen Phagozytose.

## 4.2.2 Funktionelle Kapazität und Bedeutung der CD14-abhängigen Phagozytose

### 4.2.2.1 Funktionelle Kapazität

Zur Einschätzung der Kapazität der CD14-abhängigen Phagozytose von nicht opsonierten Bakterien mussten wir ein System etablieren, welches uns einen direkten Vergleich erlaubt zwischen der CD14-abhängigen Phagozytose und einer Phagozytose, bei der den Monozyten sämtliche im Vollblut möglichen Mechanismen offen stehen (uneingeschränkte Phagozytose).

Als erstes stellten wir der uneingeschränkten Phagozytose von nicht-opsonierten *E. coli* die uneingeschränkte Phagozytose von bereits vor-opsonierten (Antikörper und Komplement) *E. coli* gegenüber. Im Vollblut von gesunden Normalprobanden unterscheiden sich die Phagozytoseleistungen nicht.

In einem zweiten Schritt verglichen wir die CD14-unabhängige Phagozytose von vor-opsonierten *E. coli* mit der Antikörper- und Komplement-unabhängigen Aufnahme von nicht-opsonierten *E. coli* durch die Monozyten. Dabei wurde eine CD14-abhängige Komponente der Phagozytose von vor-opsonierten *E. coli* durch die Zugabe von blockierenden anti-CD14-Antikörper ausgeschlossen. Durch Kalzium-Depletion mit EDTA wurden sowohl eine mögliche Komplementopsonierung der nicht-opsonierten *E. coli* als auch eine Komplement- oder Antikörper-abhängige Phagozytose verhindert. Das Aufnahmevermögen dieser beiden Phagozytosewege, CD14-unabhängige bzw. Antikörper- und Komplement-unabhängige Phagozytose, zeigte ebenfalls keine Unterschiede.

Die vollständige CD14-Abhängigkeit der Antikörper- und Komplement-unabhängigen monozytären Phagozytose von nicht-opsonierten *E. coli*-Bakterien konnten wir wie folgt nachweisen. Wurde zusätzlich zur Blockierung der Komplementaktivierung und der Komplement- oder Antikörper-abhängigen Phagozytose durch den Entzug von freiem Kalzium gleichzeitig eine CD14-Blockade mittels anti-CD14-Antikörper durchgeführt, konnte die monozytäre Phagozytose der nicht-opsonierten *E. coli* vollständig aufgehoben werden.

Mit diesem Versuch konnten wir zeigen, dass die einzelnen beschriebenen Phagozytosemechanismen in ihrer Kapazität miteinander vergleichbar sind, d.h., dass nach unseren Ergebnissen die CD14-abhängige Phagozytose genauso effektiv ist wie die CD14-unabhängige bzw. die uneingeschränkte Phagozytose von Gram-negativen Bakterien.

Da CD14 aber nicht nur die Fähigkeit hat, LPS zu binden, sondern auch Elemente auf

Gram-positiven Bakterien, wie zum Beispiel Peptidoglykan, erkennt [27], konnte auch die CD14-abhängige Aufnahme von Gram-positiven Bakterien, wie *Bacillus subtilis* [46], nachgewiesen werden. Eine effektive CD14-abhängige Phagozytose von Gram-positiven Bakterien scheint also auch möglich zu sein, muss aber im Einzelnen noch untersucht werden. Dies wäre ein weiterführender Ansatz, welcher sich aus diesen Untersuchungen ergibt.

#### 4.2.2.2 Bedeutung der CD14-abhängigen Phagozytose

Der alleinige Nachweis der Existenz eines effektiven Mechanismus, hier der CD14-abhängigen Bakterienphagozytose, sagt jedoch noch nichts aus über seine physiologische Bedeutung.

Wir fanden in unseren Versuchen, dass die Blockade des CD14-abhängigen Weges allein nicht die monozytäre Aufnahme der Gram-negativen Bakterien (*E. coli*) beeinträchtigen kann, wenn eine Opsonierung (Komplementaktivierung im Vollblut) möglich ist.

Diese Ergebnisse stehen in Übereinstimmung mit kürzlich veröffentlichten Daten, wonach die LPS-induzierte TNF- $\alpha$ -Produktion bei CD14-defizienten Mausmakrophagen zwar aufgehoben ist, die Phagozytose von *E. coli* jedoch nicht beeinträchtigt ist im Vergleich zu den Wildtyp-Makrophagen. [66] Auch eine weitere neuere Publikation unterstützt unsere *in vitro* Ergebnisse. So wird durch die Infusion von anti-CD14-Antikörpern beim Menschen die LPS-induzierte Entzündungsantwort *in vivo* deutlich gehemmt, die monozytäre Phagozytose von *E. coli* hingegen kaum. [67]

Es gibt jedoch auch Hinweise darauf, dass die Beeinträchtigung der CD14-abhängigen Phagozytose schwerwiegende Folgen für die anti-bakterielle Abwehr haben kann. Wenneras et al. untersuchten an Kaninchen den Einfluss einer CD14-Blockade auf das Eindringen (Invasion) von Shigellen in die Darmwand und die Gewebedestruktion des Intestinaltraktes. Dabei wurden eine um das 50-fache gesteigerte Invasion dieser Gram-negativen Bakterien und eine deutlich schwerere Gewebeschädigung festgestellt. Da weder die Rekrutierung noch die bakterizide Aktivität der Leukozyten eingeschränkt waren, wurde durch die Autoren eine Beeinflussung der Shigellen-Phagozytose vermutet. [68] In einer weiteren Publikation wird die Wirkung einer CD14-Blockade auf eine *E. coli*-Pneumonie und Sepsis bei Kaninchen beschrieben. Dabei wirkt die Gabe der anti-CD14-Antikörper gegenüber den Folgen der systemischen Entzündungsreaktion protektiv. Lokal aber (in der Lunge) führt die CD14-Blockade zu erhöhten Bakterienzahlen und einer deutlich verschlechterten Organfunktion. Auch hier wird eine verminderte Phagozytose als

Ursache diskutiert. [69]

Insgesamt kann man aus diesen Daten schließen, dass zumindest in bestimmten Situationen bzw. bei einzelnen Erregern das CD14-Molekül für das Abräumen der Bakterien eine wichtige, wenn nicht sogar eine limitierende Rolle zu spielen scheint.

Auf die Möglichkeit der Bakterien, sich einzelnen Mechanismen der Immunabwehr zu entziehen, wurde im Vorangehenden bereits eingegangen. Gerade dadurch wird die erhöhte Virulenz einzelner Bakterienstämme begründet. In der Evolution hätten sich jedoch die komplexen Organismen, wie der Mensch, nicht durchgesetzt, wenn sie nicht immer neue Mittel entwickelt hätten, sich gegen diese Erreger zu wehren. Der wichtigste Schritt war sicherlich die Entwicklung der spezifischen Immunität. Der einfachste Weg ist es aber, den Erreger schon an seinem Eintrittsort zu beseitigen. Hier spielt die schnelle Antwort der residenten Phagozyten, insbesondere der Makrophagen, eine entscheidende Rolle, um den Erreger sofort erfolgreich zu eliminieren. An dieser Stelle liegt sicherlich auch die Bedeutung der CD14-abhängigen Phagozytose. Sie stellt als effektiver, vom Komplementsystem und der spezifischen Immunantwort unabhängiger Phagozytoseweg eine weitere Absicherung der Abräumfunktion der Phagozyten gegenüber Erregern dar, welche es gelernt haben, sich gegen bestimmte Abwehrmechanismen zu schützen. So kann man vermuten, dass die CD14-abhängige Phagozytose in der Regel nur ein Weg unter vielen ist, unter Umständen jedoch den begrenzenden Faktor bei der Phagozytose von bestimmten Erregern darstellt.

Nach dem Nachweis der Effektivität und der zu vermutenden physiologischen Bedeutung der CD14-abhängigen Phagozytose stellten wir uns die Frage nach der Zytokinregulation dieses Mechanismus. Dabei interessierte uns auch, ob die Regulation der Phagozytose gleichlaufend ist mit der Beeinflussung der monozytären CD14-Oberflächenexpression.

### **4.3 Zytokinregulation der monozytären CD14-Expression und der Monozytendifferenzierung und -funktion**

#### **4.3.1 Zytokinregulation der Membranexpression von CD14 und der Freisetzung von löslichem CD14**

In der Literatur fanden wir bereits einige Ergebnisse zur Regulation der CD14-Expression auf Monozyten und der Freisetzung von löslichem CD14. Diese waren jedoch nicht vollständig für die von uns verwendeten Zytokine. Darum untersuchten wir vor der CD14-abhängigen Phagozytose auch die Regulation der Oberflächenexpression und der Freisetzung von CD14 durch IL-10, IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1.

Wie in der Literatur beschrieben, konnten auch wir für IL-10 eine Steigerung und für IFN- $\gamma$  eine Hemmung der monozytären CD14-Expression feststellen. [33, 70, 71] TGF- $\beta$ 1 sollte laut Literatur lediglich einen kurzzeitigen bzw. gar keinen Einfluss auf die CD14-Expression haben. [70, 72] Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen konnten wir jedoch sowohl im Vollblut als auch in PBMC-Kulturen eine deutliche Reduktion der CD14-Expression nach 24 bzw. 48 Stunden feststellen.

Für die Freisetzung von löslichem CD14 waren die Ergebnisse in der Literatur noch unvollständiger. Es war nur die Hemmung der Freisetzung von löslichem CD14 durch IFN- $\gamma$  beschrieben. [71, 73] Auch wir konnten für IFN- $\gamma$  eine Senkung der CD14-Freisetzung nachweisen. IL-10 führte in unseren Versuchen zu einer Erhöhung und TGF- $\beta$ 1 hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Freisetzung von löslichem CD14.

Die Veränderung der CD14-Expression als solche wäre jedoch nicht von Bedeutung, wenn man aus ihrer Stärke nicht bestimmte Schlüsse ziehen könnte oder die Änderung der CD14-Oberflächenexpression nicht auf verschiedene Prozesse einen Einfluss hätte. Zum besseren Verständnis der Bedeutung der Zytokinregulation der CD14-abhängigen Phagozytose will ich im Folgenden auf das Einwirken von Zytokinen auf die CD14-abhängige Entzündungsreaktion und auf die Differenzierung der Monozyten eingehen.

#### 4.3.2 CD14-Expression und Zytokinregulation der APC-Differenzierung

Monozyten, welche im Blut ein Reservoir von Vorläuferzellen darstellen, können nach ihrem Erscheinungsbild und ihrer Funktion in verschiedene Untergruppen eingeteilt werden. Dabei nehmen sie teilweise schon die Funktionen ihrer ausdifferenzierten Gewebe-ständigen Formen, der Makrophagen und myeloischen Dendritischen Zellen, an. Die größte Untergruppe der Monozyten, die klassischen Monozyten, zeichnen sich durch ihre ausgeprägte Fähigkeit zur Phagozytose, Zytokinproduktion und Zytotoxizität aus. [22, 74, 75] Die Monozyten halten sich nur eine begrenzte Zeit im Blut auf. Je nach ihrer lokalen Umgebung entwickeln sie sich weiter in Makrophagen oder Dendritische Zellen. Diese Weiterentwicklung wird im wesentlichen durch Zytokine gesteuert.

Unter dem Einfluss von IL-10 und/oder M-CSF (Makrophagenkolonie-stimulierender Faktor) differenzieren Monozyten in Makrophagen. [22, 76] Ruhende Makrophagen exprimieren kaum MHC Klasse II- und kostimulatorische Moleküle. Sie besitzen aber eine Vielzahl von Rezeptoren, mit welchen sie Mikroorganismen erkennen können. Diese Rezeptoren dienen nicht nur der Phagozytose, sondern auch der Aktivierung der Makrophagen. Dies führt zur starken Freisetzung von proinflammatorischen Zytokinen

und Chemokinen. 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, 26]

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- $\beta$ 1, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  haben auf diesen Prozess einen stimulierenden Effekt. [23, 24] Die Funktion der Dendritischen Zellen ist auf die Präsentation von Antigen und die Initiierung einer zellulären Immunantwort ausgerichtet. Hierbei erfolgt die Aufnahme des Antigens durch die unreifen Dendriten. Nach Aktivierung und Reifung können die reifen Zellen nun eine effektive Antigenpräsentation vermitteln. [23]

Die Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen lassen sich also durch ihre Funktion von einander unterscheiden. Aber auch durch das Aussehen, das Vorkommen in verschiedenen Geweben und die besonders starke bzw. besonders schwache Expression von bestimmten Oberflächenmolekülen können diese Zellen charakterisiert werden. So ist CD1a ein typischer Marker für Dendritische Zellen, und die starke Expression von CD14 ist ein Marker für Makrophagen. Auf den Dendritischen Zellen ist CD14 dagegen kaum exprimiert und geht mit der Dendritenmaturation vollständig verloren. Das CD14-Molekül ist zwar auch auf den Monozyten schon deutlich vorhanden, auf den Makrophagen ist es jedoch noch höher exprimiert. [71, 77, 78]

So wundert es auch nicht, dass IL-10 sowohl die CD14-Expression der Monozyten als auch deren Differenzierung in Makrophagen stimuliert, während es die Differenzierung zu Dendritischen Zellen mit niedriger CD14-Expression hemmt. Auch die Wirkung von IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 passen in diesem Zusammenhang: die CD14-Expression wird gesenkt und die Differenzierung hin zu Dendritischen Zellen wird induziert. Aus diesen kurzen Ausführungen ist bereits ersichtlich, dass die Zytokin-induzierten Veränderungen der Oberflächenmolekülexpression auch immer funktionelle Veränderungen widerspiegeln.

#### 4.3.3 Regulation der CD14-abhängigen Entzündungsfunktion

Eine wesentliche Funktion des CD14-Moleküls ist die Vermittlung der LPS-induzierten Entzündungsreaktion. Dabei spielt sowohl das membranständige CD14 auf den Monozyten, Makrophagen und unreifen dendritischen Zellen, aber auch das lösliche CD14 für CD14-negative Zellen, z.B. Endothelzellen, eine wichtige Rolle.

Wie bekannt und auch durch uns in Vorversuchen gezeigt, wird durch die Antikörper-

Blockade der LPS-bindenden Region des CD14-Moleküls die LPS-vermittelte Sekretion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie TNF- $\alpha$ , verhindert, d.h. CD14 ist an der LPS-Stimulation wesentlich beteiligt. Darum wirkt es auf den ersten Blick widersprüchlich, dass IL-10 auf der einen Seite die CD14-Expression auf Monozyten und die CD14-Freisetzung erhöht, auf der anderen Seite die durch CD14 limitierte LPS-induzierte Entzündungsantwort jedoch durch IL-10 gehemmt wird. [303] Für IFN- $\gamma$  sind die Veränderungen genau gegenläufig, es hemmt die CD14-Expression und -Freisetzung und steigert die Aktivierung von Zellen durch LPS. [79] TGF- $\beta$ 1 hat dagegen hemmende Wirkungen sowohl auf die CD14-Expression als auch auf die Stärke der Entzündungsreaktion. [80]

Aus diesen Ergebnissen kann man ableiten, dass CD14 zwar wichtig für die LPS-vermittelte Entzündungsreaktion ist, aber eine Veränderung der CD14-Expression in der Stärke und in der Kinetik, wie sie durch diese Zytokine hervorgerufen wird, keine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Vielmehr sind andere Faktoren, wie der Einfluss auf die „Toll-like Receptor“-Expression oder auf das NF $\kappa$ B-System, zu diskutieren. [11, 81, 82]

Betrachtet man die Erkenntnisse zur Zytokinregulation der Zelldifferenzierung und der CD14-abhängigen Entzündungsreaktion, so wird ein weiterer Widerspruch deutlich. Zum einen fördert IL-10 die Reifung von Entzündungszellen (Makrophagen) mit hoher Potenz zur Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, zum anderen wird die Produktion der pro-inflammatorischen Zytokine selbst aber gehemmt. [15, 16, 26, 36]

Im nächsten Kapitel wollen wir die Regulation der CD14-abhängigen Phagozytose diskutieren. Und auch hier interessiert uns wieder der Zusammenhang zwischen CD14-Expression und CD14-abhängiger Funktion.

## **4.4 Zytokinregulation der CD14-abhängigen Phagozytose von Bakterien**

### **4.4.1 Zytokinregulation der Komplement- und Antikörper-abhängigen Phagozytose**

In der Literatur wird für IL-10 und IFN- $\gamma$  eine Steigerung der Fc- $\gamma$ RI (CD64)-Expression auf Monozyten und Dendritischen Zellen (DC) beschrieben. [83, 84] TGF- $\beta$ 1 hemmt die Expression von Fc- $\gamma$ RII (CD32), während IL-10 keinen signifikanten Einfluss hat. [33, 85] Auch auf die monozytäre Expression von Fc- $\gamma$ RIII (CD16), CR1 (CD35) und CR3 (CD11b/CD18) zeigt IL-10 keinen Effekt, während IFN- $\gamma$  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. So hemmt IFN- $\gamma$  die durch Fc- $\gamma$ R- und CR3/CR1 vermittelte Phagozytose von Monozyten und Makrophagen, während IL-10 eine Steigerung dieser Funktionen vermittelt. [35]

Es scheinen also bei diesen Phagozytosearten neben der Beeinflussung der Rezeptorexpression auch andere Mechanismen eine Rolle zu spielen. Es interessierte uns daher, wie sich der Zusammenhang zwischen Rezeptorexpression und Phagozytosekapazität für CD14-abhängige Phagozytose darstellt.

#### 4.4.2 Zytokinregulation der CD14-abhängigen Phagozytose

In unseren Versuchen zur Regulation der CD14-abhängigen Phagozytose konnten wir zeigen, dass die Veränderungen der monozytären CD14-Expression parallel verlaufen mit den Veränderungen der Phagozytosekapazität. Die Veränderung der Rezeptorexpression ist also für CD14 gleichgerichtet mit der untersuchten Rezeptor-abhängigen Funktion. So vermittelt IL-10 sowohl eine Steigerung der CD14-Expression als auch der CD14-abhängigen monozytären Bakterienphagozytose. IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 haben jeweils einen hemmenden Effekt. Betrachtet man lediglich den Einfluss der einzelnen Zytokine auf die Phagozytoseleistung der Monozyten, so kann man für die verschiedenen Phagozytosemechanismen (CD14-, CR-, AK-abhängig) eine übereinstimmende Wirkung des jeweiligen Zytokins feststellen.

Da die Regulation der Rezeptorexpression jedoch nicht in jedem Fall mit der Beeinflussung des durch diesen Rezeptor vermittelten Phagozytoseweges überein zu stimmen scheint, sind in diesem Zusammenhang vielleicht weniger die einzelnen Mechanismen und die dazugehörigen Rezeptoren zu diskutieren, als vielmehr der grundlegende Einfluss der Zytokine auf die generelle Fähigkeit der Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen zur Phagozytose. So wird durch IL-10 die Differenzierung von Monozyten in Makrophagen stimuliert, welche sich durch eine gegenüber den Monozyten noch deutlich gesteigerte Phagozytosekapazität auszeichnen. [26, 36] Für IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ 1 wird ein stimulierender Einfluss auf die Differenzierung von Monozyten in Dendritische Zellen beschrieben. Die Dendritischen Zellen haben jedoch gegenüber den Monozyten/Makrophagen eine eingeschränkte Fähigkeit zur Phagozytose. [23] Für einen Anteil der Monozytendifferenzierung an der Phagozytoseregulation würden auch die langen Inkubationszeiten (bei unseren Versuchen von 24 bzw. 48 Stunden) sprechen, d.h. eine Differenzierung der Monozyten in Makrophagen bzw. Dendritische Zellen hat nach diesen Zeiten wahrscheinlich bereits begonnen. Im Umkehrschluss wird

dies auch durch von uns untersuchte Kurzzeiteffekte der Zytokine bestätigt. So konnten wir nach 1 bzw. 4 Stunden nur wenig Änderungen bei CD14-Expression und Phagozytoseleistung beobachten.

Während der Durchführung unserer Versuche zur Zytokinregulation der CD14-abhängigen *E. coli*-Phagozytose wurde in der Literatur eine weitere CD14-abhängige Phagozytosefunktion beschrieben, die Phagozytose von apoptotischen Zellen, auf die im folgenden Kapitel näher eingegangen werden soll.

## **4.5 CD14-abhängige Phagozytose von apoptotischen Zellen**

### **4.5.1 Mechanismen zur Phagozytose von apoptotischen Zellen**

Die Apoptose ist ein wichtiger Vorgang während der Entwicklung und der Homöostase mehrzelliger Organismen. Ständig findet ein programmierter Zelltod von verbrauchten oder nicht mehr benötigten Zellen statt. Da sich jedoch aus apoptotischen Zellen nach kurzer Zeit nekrotische Zellen entwickeln, welche zerfallen und entzündliches Material freisetzen, müssen die apoptotischen Zellen schnell und effizient durch Phagozyten abgeräumt werden. [54] Diese Phagozytose wird durch Rezeptoren vermittelt, welche die Veränderungen an den apoptotischen Zellen erkennen können. Dabei werden verschiedene apoptotische Zellarten wahrscheinlich durch unterschiedliche Mechanismen aufgenommen. So sollen die Klasse A-Scavenger-Rezeptoren für die Phagozytose von apoptotischen Thymozyten, CD36 zusammen mit den Vitronektin-Rezeptor für die Phagozytose von neutrophilen Granulozyten und CD14 für die Phagozytose von apoptotischen Lymphozyten eine wichtige Rolle spielen. [53] Darüber hinaus scheint CD14 auch bei anderen Zelltypen von Bedeutung, wie Untersuchungen an CD14-knockout-Mäusen zeigen. Dabei wird ein Persistieren von apoptotischen Zellen in verschiedenen Geweben beschrieben. [86]

Das CD14-Molekül scheint als Scavenger-Rezeptor eine breit gefächerte Funktion wahrzunehmen. So werden sowohl Elemente von Bakterien (z.B. LPS) als auch Elemente von apoptotischen Zellen (z.B. Phosphatidylserin) erkannt. Im Gegensatz zu den bakteriellen Bestandteilen wird durch die apoptotischen Zellen jedoch keine Entzündungsreaktion ausgelöst, [43, 54] sondern es werden sogar durch die Phagozyten aktiv anti-inflammatorische Mediatoren freigesetzt. [49]

Über den Einfluss von immunregulatorischen Zytokinen auf den Prozess der Phagozytose von apoptotischen Zellen selbst gab es jedoch noch keine Ergebnisse.

#### 4.5.2 Kapazität und Regulation der CD14-abhängigen Phagozytose von apoptotischen Lymphozyten

Wir untersuchten an dieser Stelle insbesondere den Einfluss von IL-10, weil IL-10 bei Zuständen mit vermehrten Zelluntergängen (z.B. Trauma) vermehrt systemisch freigesetzt wird, apoptotische Lymphozyten selbst IL-10 produzieren und freisetzen können und weil eine Steigerung der Phagozytoseleistung durch IL-10 (in Analogie zur Bakterienphagozytose) zur Abräumung von untergegangenem Gewebe beitragen könnte. [51, 62]

In unseren Experimenten steigerte IL-10 die Kapazität der Monozyten zur Aufnahme von apoptotischen Lymphozyten. Interessant war, dass die Phagozytose von apoptotischen Lymphozyten in einem uneingeschränkten System (Vollblut ohne Kalzium-Entzug) zum deutlich überwiegenden Teil durch CD14 vermittelt wird. IL-10 stimulierte jedoch sowohl den CD14-abhängigen, als auch den CD14-unabhängigen Anteil der Phagozytose. Diese Steigerung auch der CD14-unabhängigen Phagozytose weist die Induktion auch anderer Phagozytosemechanismen durch IL-10 nach. Man kann also vermuten, dass IL-10 durch die Stimulation von weiteren Phagozytosewegen auch die Aufnahme von anderen Zelltypen, wie zum Beispiel der Neutrophilen Granulozyten, steigern kann. Aus diesen Hypothesen ergeben sich verschiedene neue Fragen für weiterführende Untersuchungen:

- Welche anderen Mechanismen sind neben CD14 an der Phagozytose von apoptotischen Lymphozyten beteiligt?
- Wie werden diese Mechanismen reguliert?
- Hat CD14 als Phagozytoserezeptor auch für die Aufnahme von anderen apoptotischen Zelltypen eine herausragende Bedeutung?
- Wie werden diese Mechanismen durch andere Zytokine, wie IFN- $\gamma$  und TGF- $\beta$ , beeinflusst?

Wie man an den vielen offenen Fragen erkennen kann, sind im Rahmen dieser Arbeit nur die ersten Antworten zu diesem Komplex der Regulation der Phagozytose von apoptotischen Zellen gefunden worden. Weitere Untersuchungen sind notwendig, um das System der verschiedenen Phagozytosemechanismen und deren Regulation genauer zu verstehen.

## 4.6 Bedeutung der Zytokinregulation der CD14-abhängigen Phagozytenfunktionen

### 4.6.1 Allgemeines

Wie im Rahmen dieser Arbeit an vielen Stellen beschrieben, können Zytokine die Zellen des Immunsystems auf vielfältige Art beeinflussen. Dabei werden Funktionen wie die inflammatorische Reaktion, die Phagozytose, Antigenpräsentation und die spezifische Immunität in verschiedener Weise aufeinander abgestimmt. Die Mechanismen der Zytokinwirkung reichen dabei von der schnellen Beeinflussung einzelner Funktionen bis hin zur nachhaltigen Zellveränderung bzw. Zelldifferenzierung.

Zu den Phagozytenfunktionen, welche in sehr kurzer Zeit durch Zytokine gesteigert bzw. unterdrückt werden können, zählen die Entzündungsreaktion und die Antigenpräsentation. Die monozytäre Phagozytosekapazität wird dagegen, wie wir zeigen konnten, nicht schon nach Minuten bzw. wenigen Stunden beeinflusst. Dies scheint auch verständlich, bedenkt man, dass die Möglichkeit zur Phagozytose jederzeit in ausreichendem Maße vorhanden sein muss, um potenzielle Pathogene oder auch apoptotische Zellen schnell abzuräumen. Dies wird gewährleistet durch die ständige Differenzierung von Monozyten zu Gewebsmakrophagen, so dass potente Phagozyten bereits physiologisch im Gewebe vorhanden sind. [1] Die schnelle Beeinflussung dieser deutlich ausgeprägten Funktion scheint darum auch nicht notwendig. Ob dagegen die Antigene aufgenommenen Materials durch die Phagozyten auch effektiv präsentiert werden oder ob auf erkannte Pathogene mit einer Entzündungsreaktion geantwortet wird, muss in den jeweiligen Situationen unmittelbar entschieden werden. Dies entscheidet ja letztendlich darüber, wie auf einzelne Antigene reagiert wird und ob eine spezifische Immunantwort eingeleitet wird. [1] In diesem Zusammenhang ist zu beachten, dass die Phagozytose selbst keine Gefahr für den Organismus darstellt, durch das Abräumen sogar die Gefahr vermindert wird, während eine effektive Antigenpräsentation und Entzündungsreaktion auch schädliche Wirkungen haben können. Dies wird auch in der Danger-Theorie deutlich, wonach die Phagozytose und anschließende Antigenpräsentation ohne Aktivierung der Antigen-Präsentierenden Zellen, also ohne das Erkennen einer Gefahr, nicht zu einer Immunantwort, sondern zu Toleranz gegenüber dem aufgenommenen Antigen führen. [87]

Anhand der von uns untersuchten Zytokine kann man das zugrunde liegende System der Zytokinwirkung auf die mononukleären Phagozyten stark vereinfacht beschreiben. So werden durch IL-10 und TGF- $\beta$ 1 die LPS-vermittelte Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF- $\alpha$  sowie die Fähigkeit zur Antigenpräsentation

durch Herunterregulation der Expression von MHC Klasse II- und kostimulatorischen Molekülen gehemmt. Die Wahrscheinlichkeit der Einleitung einer Entzündungsreaktion und einer spezifischen Immunantwort wird dadurch reduziert. [15, 16, 20] IFN- $\gamma$  wirkt auf diese Funktionen exakt entgegengesetzt. Die Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen wird stimuliert, die effektive Antigenpräsentation gesteigert und eine spezifische Immunantwort gefördert. [17, 19]

#### 4.6.2 Phagozytose von Bakterien

Wie die meisten physiologischen Reaktionen läuft auch die Immunantwort gegen Bakterien in verschiedenen Phasen ab. Die Reaktionen sind dabei jedoch nicht immer gleich. Vielmehr muss die Immunantwort ständig kontrolliert und präzisiert werden.

Die Bedeutung der Bakterienphagozytose und ihrer Regulation durch Zytokine soll an einem Beispiel schematisch erläutert werden.

Dringen Bakterien in den Organismus ein, werden sie von den gewebeständigen Makrophagen erkannt, wodurch eine sofortige Phagozytose eingeleitet und eine Entzündungsreaktion ausgelöst werden. Können die eingedrungenen Erreger nicht sofort durch die gewebsständigen Effektoren kontrolliert werden, so werden durch die Entzündungsreaktion verschiedene Zellen, wie Neutrophile Granulozyten, Monozyten und T-Zellen, aber auch lösliche Effektormoleküle (z.B. Komplementfaktoren und Immunglobuline) vermehrt aus dem Blut ins Gewebe gelangen. In frühen Phase der Abwehrreaktion sind die Neutrophilen Granulozyten sehr wichtig, um die eingedrungenen Erreger durch Mechanismen der angeborenen Immunität ohne Zuhilfenahme des spezifischen Immunsystems zu eliminieren. [10, 32] Werden die Bakterien aber nicht in kürzester Zeit abgeräumt, werden durch Monozyten, Makrophagen oder Dendritische Zellen aufgenommene Antigene den T-Helferzellen präsentiert, welche durch die Produktion von Lymphokinen wie IFN- $\gamma$  die Entzündungsreaktion weiter steigern. Die Produktion pro-inflammatorischer Zytokine und die effektive Antigenpräsentation werden gesteigert und die Neutrophilenphagozytose wird durch IFN- $\gamma$  noch zusätzlich stimuliert. [10, 88, 89] Dass IFN- $\gamma$  die Monozytenphagozytose kurzfristig kaum beeinflusst und längerfristig sogar hemmt, scheint in dieser Phase der Immunantwort keine große Rolle zu spielen. Die gesteigerte Zytokinproduktion und Antigenpräsentation sind in diesem Moment zur Einleitung einer spezifischen Immunantwort wichtiger. [18, 19]

Um umliegendes Gewebe nicht unnötig zu beschädigen, muss die Entzündungsreaktion aber begrenzt werden und auch bei Bedarf wieder beendet werden können. So wird bei

der Einleitung einer Entzündungsreaktion immer auch die zeitversetzte Produktion von anti-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-10, eingeleitet. [15] Hat das Immunsystem die Bakterien erfolgreich bekämpft, wird die Entzündungsreaktion nicht mehr weiter unterhalten. Durch die anti-inflammatorischen Mediatoren wird die Freisetzung entzündlicher Zytokine dann genauso gehemmt wie die weitere Antigenpräsentation. [15, 16, 20] Die monozytäre/makrophagäre Phagozytosekapazität wird jedoch durch IL-10 gesteigert. [36] Diese gesteigerte Kapazität ist auch wichtig, da am Entzündungsort viele Zell- und Bakterienreste zurückbleiben, welche nun abgeräumt werden müssen. Ein endgültiges Abschalten der Immunantwort könnte dann durch TGF- $\beta$ 1 vermittelt werden, da durch TGF- $\beta$  sowohl die Entzündungsreaktion und die Antigenpräsentation als auch Bakterienphagozytose gehemmt werden. [20, 33, 90]

An diesem Beispiel wird die unterschiedliche Beeinflussung der Phagozytosefunktion in den verschiedenen Phasen der Immunantwort deutlich. Während die Neutrophilenphagozytose durch IFN- $\gamma$  gesteigert und durch IL-10 gehemmt wird, wird die Phagozytose durch Monozyten, wie auch wir für die CD14-abhängige Bakterienphagozytose zeigen konnten, genau entgegengesetzt beeinflusst. [36, 37, 39, 40, 88, 91] So wird durch ein und das selbe Zytokin die Phagozytoseleistung je nach Zellart gesteigert oder gehemmt. Innerhalb der verschiedenen Phasen der Immunantwort macht diese Regulation wie in dem Beispiel beschrieben jedoch durchaus Sinn.

Ergebnisse in IL-10-knockout-Mäusen im Modell der bakteriellen Arthritis belegen die reziproke Regulation der Entzündungsreaktion und Phagozytose. So ist in den IL-10-knockout-Mäusen die effektive Phagozytose von Bakterien (*Staphylococcus aureus*) massiv gehemmt. Andererseits kommt es zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion mit stärkeren Gewebeschäden im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen. [92] Die Defizienz des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 führt also zu einer gestörten Abräumfunktion und Auflösung/Limitierung der Entzündungsreaktion.

#### 4.6.3 Phagozytose von apoptotischen Zellen

Während die CD14-abhängige Phagozytose der Monozyten bei der Aufnahme von Bakterien meist nur eine untergeordnete bzw. gleichberechtigte Rolle neben anderen Mechanismen zu spielen scheint, könnte CD14 für die Phagozytose von bestimmten apoptotischen Zelltypen (z.B. apoptotischen Lymphozyten) entscheidend sein. So wird bei CD14-knockout-Mäusen *in vivo* ein Persistieren von apoptotischen Zellen in verschiedenen Geweben beobachtet. [86]

Betrachtet man die Bedeutung der Regulation der Phagozytose von apoptotischen Zellen, ist der Umgang der Zellen mit dem aufgenommenen körpereigenen Material wichtig. Dieser Umgang ist sowohl abhängig von der Art der phagozytierenden Zelle, aber auch vom Zustand der phagozytierten Zelle. [3]

Die Aufnahme von apoptotischen Zellen durch Dendritische Zellen kann zur Antigenpräsentation und dadurch zur Aktivierung von T-Helferzellen führen; eine Cross-Präsentation durch MHC-Klasse I-Moleküle kann auch eine Reaktion von zytotoxischen T-Zellen (CTL) einleiten. [3] In der Literatur wird aber auch berichtet, dass apoptotische Zellen keine Aktivierung der Dendritischen Zellen und damit keine spezifische Immunantwort bewirken, während, im Unterschied dazu, die Phagozytose von nekrotischen Zellen eine Immunantwort einleitet. [3] In einer anderen Arbeit wird beschrieben, dass weder durch apoptotische noch durch nekrotische Zellen eine Aktivierung der Dendritischen Zellen erfolgte. [3] Diese verschiedenen, teilweise widersprüchlichen Aussagen lassen sich wohl am besten durch unterschiedliche Versuchsbedingungen erklären. Im Normalfall sind es auch nicht die Dendritischen Zellen, sondern die Makrophagen als professionelle „Scavenger“-Zellen, welche sich auf die Aufnahme von apoptotischen Material spezialisiert haben.

Für die Phagozytose von apoptotischen Zellen durch Monozyten und Makrophagen wird eine Deaktivierung der Phagozyten beschrieben. Diese Deaktivierung wird unter anderem durch die Freisetzung von löslichen Mediatoren, wie zum Beispiel IL-10, TGF- $\beta$  und Prostaglandin E<sub>2</sub>, durch die Phagozyten, aber auch durch die apoptotischen Zellen selbst erklärt. Dadurch werden auch die umliegenden Zellen (z.B. Dendritische Zellen) deaktiviert. [49, 50] Bei der Phagozytose von nekrotischen Zellen bleibt diese Deaktivierung aus und durch den Zerfall der nekrotischen Zellen wird pro-inflammatorisches intrazelluläres Material freigesetzt, was zu einer Aktivierung des Immunsystems führt und eine Immunantwort gegen körpereigenes Material einleiten kann. [3]

In diesem Zusammenhang wird auch die Bedeutung der Zytokinwirkung auf die Phagozytose der apoptotischen Zellen deutlich. Wie wir in unseren Versuchen zeigen konnten, kann durch das anti-inflammatorische Zytokin IL-10, welches durch die phagozytierende Zelle aber auch durch die apoptotischen Zellen selbst gebildet werden kann, nicht nur eine Autoimmunreaktion verhindert, sondern auch die Phagozytose der apoptischen Zellen beschleunigt werden. [49, 50, 51] So wurde in unseren Versuchen durch IL-10 die im Wesentlichen CD14-abhängige monozytäre Aufnahme von apoptotischen T-Zellen deutlich gesteigert.

#### 4.6.4 Wechselwirkung der Zytokine

##### 4.6.4.1 *Phagozytenreifung und -differenzierung*

Für eine Immunreaktion ist es von entscheidender Bedeutung, wie die verschiedenen Zellen in ihrem Funktionszustand beeinflusst werden. Hierbei werden prinzipiell unreife und reife bzw. ruhende und aktivierte Zellen unterschieden. Gerade die in dieser Arbeit untersuchten Zytokine IL-10 und IFN- $\gamma$  haben auf die Differenzierung, Reife und Aktivität von Phagozyten einen großen Einfluss.

Sowohl klassische Monozyten und ruhende Makrophagen als auch unreife Dendritische Zellen exprimieren relativ wenig MHC Klasse II- und kostimulatorische Moleküle, besitzen aber eine Vielzahl von Rezeptoren zur Erkennung und/oder Phagozytose von Pathogenen. Die unreifen Dendritischen Zellen haben im Vergleich zu den aktivierten, reifen Dendriten eine höhere Phagozytosekapazität und eine geringere Fähigkeit zur Antigenpräsentation. Werden die Zellen jedoch aktiviert (z.B. durch LPS), können phagozytierte Antigene durch Hochregulation von MHC Klasse II- und kostimulatorischen Molekülen effektiv präsentiert werden. Für diese Veränderungen ist IFN- $\gamma$  ein wichtiger Mediator. [18, 23, 93]

IL-10 wiederum hat auf die Reifung von myeloiden Dendritischen Zellen und die Fähigkeit zur T-Zellaktivierung einen hemmenden Einfluss. Die Phagozytosekapazität der Dendritischen Zellen wird hingegen nicht beeinträchtigt. [94]

Die Aufnahme von apoptotischen Zellen hemmt die aktivitätsinduzierte (LPS) Reifung der Dendritischen Zellen. Dieser Effekt wird durch eine verminderte Kapazität zur IL-12 Produktion vermittelt, in deren Folge die Hochregulation von kostimulatorischen Molekülen (CD86) ausbleibt. Diese Reaktion ist jedoch nicht abhängig von der Freisetzung anti-inflammatorischer Zytokine (wie IL-10 und TGF- $\beta$ ) und betrifft auch nur die phagozytierende Zelle selbst. [95]

Die Differenzierung, Reifung und Aktivierung der Monozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen stellen jedoch keine Sackgasse, keinen endgültigen Zustand dar. All diese Prozesse lassen sich in ihrer Entwicklung durch Zytokine beeinflussen. Dabei können die Eigenschaften der Zellen auch grundlegend geändert werden. [77, 96, 97]

#### 4.6.4.2 CD14 als Pattern-Recognition Receptor (PRR)

CD14 gehört zu den phylogenetisch älteren Rezeptoren und wird in die Gruppe der PRR („Pattern-Recognition Receptors“) eingeordnet. Die PRR können eine Vielzahl von verschiedenen Elementen („Pathogen-associated Molecular Pattern“ - PAMP) erkennen. So werden durch CD14 beispielsweise das LPS von Gram-negativen Bakterien, die Peptidoglykane auf Gram-positiven Bakterien und Phosphatidylserin oder ICAM3 auf apoptotischen Zellen erkannt und gebunden. [27, 43, 54] Durch das Erkennen dieser Elemente ist das CD14-Molekül beteiligt an der LPS-vermittelten Entzündungsreaktion und der Phagozytose von Bakterien und apoptotischen Zellen. [11, 44, 58]

Obwohl an CD14-vermittelten Entzündungsreaktion und Phagozytose ähnliche Elemente beteiligt sind, werden sie teilweise entgegengesetzt reguliert. Diese Gegenläufigkeit konnten wir für IL-10 und IFN- $\gamma$  in unseren Versuchen nachweisen. So hat die Zytokin-induzierte Veränderung der CD14-Expression, wie wir zeigen konnten, zwar Einfluss auf CD14-abhängige Phagozytose, aber in der beobachteten Stärke und Kinetik keine unmittelbare Wirkung auf die CD14-abhängige Entzündungsreaktion, die durch IL-10 und IFN- $\gamma$  konträr zur CD14-Expression reguliert wird. Dies wird durch andere Ergebnisse im Umkehrschluss bestätigt. So wird durch die LPS-Desensibilisierung zwar eine komplette Aufhebung der LPS-induzierten Entzündungsreaktion vermittelt, sie führt aber nicht zu einer Verhinderung der Phagozytose von LPS. [98]

Es ist anzunehmen, dass die gegenläufige Regulation der CD14-abhängigen Phagozytose auf der einen Seite und der über CD14 vermittelten LPS-induzierten Entzündungsreaktion auf der anderen Seite eine wichtige Rolle für die Abwehr von bakteriellen Infektionen hat. Zu diskutieren ist hier z.B. der Zusammenhang zwischen einer abebbenden Entzündungsreaktion und einer gleichzeitig gesteigerten Phagozytosekapazität der Monozyten.

Lediglich TGF- $\beta$ 1 nimmt eine Sonderrolle ein. Es wirkt einheitlich als Deaktivator auf Entzündungsreaktion, Antigenpräsentation und Phagozytose. Aufschlussreich ist auch, dass die LPS-induzierte Produktion von pro-inflammatorischen Zytokinen, wie IL-1alpha und IL-1beta, durch IL-10 bereits nach 3 Stunden maximal inhibiert wird, durch TGF- $\beta$  jedoch erst nach 12-16 Stunden. [80] In unseren Experimenten zeigte die Hemmung der monozytären CD14-Expression und CD14-abhängigen Phagozytose durch TGF- $\beta$  nach 24 bzw. 48 Stunden die größte Ausprägung. Zusammen deutet dieser nachgelagerte Einfluss auf eine Wirkung von TGF- $\beta$ 1 als Abschalter wichtiger Immunfunktionen hin.

Das in diesem Kapitel (4.6) Beschriebene zeigt schematisch das Wechselspiel der

Zytokine im Ablauf einer Immunantwort auf. In diesem dynamischen System wird die Bedeutung der Zytokine für die Regulation der CD14-abhängigen Phagozytose, wie auch aller anderen Funktionen, erkennbar. Das System kann so auf die sich ständig ändernden Anforderungen abgestimmt werden.

#### **4.7 Ausblick**

Nach Abschluss dieser Arbeit bleiben noch viele Fragen unbeantwortet, viele neue Fragestellungen haben sich ergeben. So konnten wir zwar die Effektivität der CD14-abhängigen Phagozytose nachweisen, über deren physiologische Bedeutung jedoch nur spekulieren. Hier wäre es interessant, in weiteren Modellen (in Äquivalenz zu den Versuchen mit Shigellen [68] und der *E. coli*-Pneumonie und -Sepsis [69]) *in vivo* den Einfluss einer CD14-Blockade auf die Bakterieninvasion, Bakterienphagozytose und Gewebedestruktion zu untersuchen. Auch Untersuchungen an CD14-defizienten Mäusen wären hier interessant. So werden zwar für die Leistungsfähigkeit der Phagozytose von *E. coli* durch die CD14-defizienten Mausmakrophagen im Vergleich zu den Wildtyp-Makrophagen keine Unterschiede beschrieben. [66] Ob dies jedoch auch für andere Bakterienarten bzw. in anderen Modellen (z.B. *E. coli*-Pneumonie) gilt, müsste noch untersucht werden.

Interessant wären auch Versuche zur Phagozytose von Bakterien, welche gegen einzelne Phagozytosewege, wie der Komplement- oder Antikörper-vermittelten Aufnahme, Abwehrmechanismen entwickelt haben. Diese Ergebnisse könnten dann beispielsweise ähnlichen Untersuchungen mit CD14-defizienten Mausmakrophagen gegenübergestellt werden. Mit der Beantwortung dieser Fragestellungen würde man einer sicheren Einschätzung der physiologischen Relevanz der CD14-abhängigen Phagozytose näher kommen.

Ein weiterer Punkt wäre die Untersuchung der CD14-abhängigen Phagozytose von Gram-positiven Bakterien. Die Existenz dieses Mechanismus wurde ja bereits nachgewiesen. [46] Es wäre interessant, die Kapazität und die Regulation in Äquivalenz zu unseren Versuchen mit Gram-negativen Bakterien zu untersuchen.

Weiterhin ergeben sich besonders aus den Versuchen zur Phagozytose von apoptotischen Zellen viele neue Fragestellungen [siehe 4.5.2]. Hierbei sind vor allem die Bedeutung der CD14-abhängigen Phagozytose für andere Zelltypen als Lymphozyten und die Regulation durch weitere Mediatoren neben IL-10 zu nennen. Generell besteht auf dem Gebiet zur Regulation der Phagozytose von apoptotischen Zellen noch großer Forschungsbedarf.

Zusammenfassend kann man sagen, dass im Rahmen dieser Arbeit viele von uns vorher gestellte Fragen beantwortet oder zumindest erklärbarer wurden. Viele neue Fragen haben sich aufgetan. Gerade die Etablierung weiter nutzbarer und ausbaubarer Versuchsabläufe sollten es ermöglichen, weitere Antworten zu diesem Thema zu finden.