

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

DISSERTATION

**Polarisierung von naiven CD4⁺ T-Lymphozyten zu IL-17-produzierenden
T_H17-Zellen durch TLR2 stimulierte Dendritische Zellen**

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

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Ehsan Aliahmadi

aus Kerman - IRAN

Datum der Promotion: 22.06.2014

اسرار ازل را نه تو دانی و نه من
وین حل معما نه تو خوانی و نه من
هست از پس پرده گفتگوی من و تو
چون پرده بر افتد نه تو مانی و نه من

Omar Khayyam, Rubaiyat, 11. Jahrhundert n. Chr.

Das Rätsel dieser Welt löst weder Du noch ich.
Jene geheime Schrift liest weder Du noch ich.
Wir wüssten beide gern, was jener Schleier birgt.
Doch wenn der Schleier fällt, bist weder Du noch ich.

Frei übersetzt aus dem Persischen von Friedrich Rosen, 1909

Inhaltsverzeichnis

Seite

Abkürzungsverzeichnis.....	04
1. Zusammenfassung.....	08
2. Abstract.....	10
3. Einleitung.....	11
3.1. Dendritische Zellen.....	13
3.1.1 DC-Funktionen.....	13
3.1.2 DC-Populationen.....	15
3.1.3 DC-Aktivierung via TLR.....	16
3.2 CD4 ⁺ Zellen.....	19
3.2.1 T _H 1-Zellen.....	20
3.2.2 T _H 2-Zellen.....	21
3.2.3 T _{reg} -Zellen	22
3.2.4 T _H 17-Zellen	24
3.2.5 Differenzierungsplastizität der T _H -Zellen.....	26
3.3 Interaktion zwischen DC und T _H -Zellen.....	27
3.4 Ziel dieser Arbeit.....	28
4. Material und Methoden.....	31
4.1 Substanzen und Lösungen.....	31
4.1.1 Lösungen/Medien/Medienzusätze.....	31
4.1.2 Zytokine.....	31
4.1.3 Antikörper zur FACS-Färbung.....	32
4.1.4 Blockierende Antikörper.....	32
4.1.5 TLR Stimuli.....	32
4.2 Geräte, Instrumente und Kits.....	33
4.3 Computer-Programme.....	34
4.4 Isolierung, Zählung, Stimulation und Kultur von Zellen.....	34
4.4.1 Isolierung von PBMC.....	35
4.4.2 Isolierung von Monozyten.....	36

4.4.3	Generierung von CD1c ⁺ MoDCs und MoLCs.....	36
4.4.4	Stimulation der APC und TLR-Blockade.....	37
4.4.5	Isolierung von CD4 ⁺ T-Zellen und CD25-Separierung mittels MACS.....	38
4.4.6	Kokultur.....	40
4.5	ELISA (<i>enzyme linked immuno sorbent assay</i>).....	40
4.6	Färbemethoden für FACS (<i>Fluorescence activated cell sorting</i>).....	41
4.7	Durchflusszytometrie (FACS).....	42
4.8	Statistische Auswertung.....	43
5.	Ergebnisse.....	44
5.1	TLR-stimulierte MoLC sezernieren IL-6, IL-1 β , IL-23 und TGF- β	44
5.2	IL-6, IL-1 β und IL-23 werden TLR2- abhängig freigesetzt, TGF- β jedoch nicht...46	
5.3	HLA-DR, CD83 und CCR7 Expression auf MoLC nach TLR2-Stimulation.....	46
5.4	CD4 ⁺ T-Zellen benötigen für die Differenzierung zu T _H 17-Zellen unter TLR-Stimulation Dendritische Zellen.....	47
5.5	TLR2-aktivierte MoLC induzieren IL-17 und IFN γ , aber kein IL-4 in CD4 ⁺ T-Zellen.....	48
5.6	Zusatz von externem IL-6 und TGF- β verringert die Sekretion von IL-17.....	50
5.7	Vergleich unterschiedlicher Subpopulationen von T _H -Zellen.....	51
5.8	Blockierung von MoLC-induzierter T _H 17-Antwort durch anti-IL-1 β , anti-TGF- β und anti-IL-23.....	52
5.9	IL-17- und IFN γ -Expression von CD4 ⁺ T-Zellen nach Blockierung von IL-6, IL-1 β , TGF- β und IL-23.....	54
5.10	TLR-2-Block hemmt die T _H 17-Antwort in Kokultur mit MoLC und MoDC.....	54
6.	Diskussion.....	56
7.	Literaturverzeichnis.....	69
	Lebenslauf	83
	Eidesstattliche Erklärung.....	84
	Danksagung.....	85

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACT 1	Intrazelluläres Adaptor Protein Act1
Ag	Antigen
AhR	aryl hydrocarbon receptor
Ak	Antikörper
APC	Antigen presenting Cell / Antigenpräsentierende Zelle
-APC	-Allophycocyanin
Bcl-6	B-cell lymphoma 6 protein
BCR	B-Zell-Rezeptor
BDC	DC des Peripheren Blutes
BDCA	Oberflächenantigen der BDC
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
CCL	CC-Motiv-Chemokin-Ligand
CCR	CC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
CD	Cluster of Differentiation
c-Maf	Transcription factor Maf
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CpG	unmethylierte Nukleotidsequenz, Cytosin-Phosphat-Guanin, TLR9-Agonist
CTLA-4	Cytotoxisches Lymphozytenantigen 4
CXCL	CXC-Motiv-Chemokin-Ligand
CXCR	CXC-Motiv-Chemokin-Rezeptor
DC	Dendritic Cell / Dendritische Zelle
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ds	doppelsträngig
E. coli	Escherichia Coli
EAE	Experimental Autoimmune Encephalomyelitis
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
F _{ab}	Fragment antigen binding
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter

F _c	Fragment cristallizable
FCS	Fötales Kälberserum (Foetal Calf Serum)
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
Flag	Flagellin, TLR5-Agonist
Foxp3	Forkhead box protein P3
FSC	Forward Scatter Channel
G	Guanin
g	Erdbeschleunigung (9,81 m/s ²)
GCSF	Granulocyten-Koloniestimulierender Faktor
Gdqd	Gardiquimod, TLR7-Agonist
GATA	GATA Transkriptionsfaktor
Gfi-1	Zinc finger protein Gfi-1
GITR	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein, Tumor necrosis factor receptor superfamily member 18 (TNFRSF18)
GM-CSF	Granulocyten-Makrophagen-Koloniestimulierender Faktor
H ₂ O dest.	destilliertes Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin und Eosin
HLA	Human Leukocyte Antigen
HLX	Homeobox transcription factor
i	induziert
ICOS	Inducible Costimulator
ICOS-L	Inducible Costimulatory-Ligand
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IκB-ζ	Inhibitor of NFκB - zeta
IL	Interleukin
IPEX	Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked
IRAK-1	IL-1R associated kinase-1
IRF4	Interferon-Regulatory Factor 4
Iso	Isotypkontrolle
-L	Ligand
LC	Langerhans Zellen
LCR	Locus control region
LPS	Lipopolysaccharid, TLR4-Ligand

LTA	Lipoteichonsäure
LT α	Lymphotoxin α
MACS	Magnetic Cell Separation
MALP-2	Makrophagen-aktivierendes Lipopeptid-2, TLR2/(6)-Agonist
MALT	Mukosa-assoziiertes lymphatisches Gewebe
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MDP	Muramyl Dipeptid
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibility Complex
MIP	Macrophage inflammatory protein
MMP	Matrixmetalloproteinase
MoDC	Monocytes-derived Dendritic Cells
MoLC	Monocytes-derived Langerhans-like Cells
MOPC-21	Monoclonal Mouse IgG1 kappa, isotype control
MS	Multiple Sklerose
M-Tri _{DAP}	MurNAc-L-Ala-gamma-D-Glu-mDAP
MyD	Myeloides Differenzierungsprotein
n	natürlich
N	Normalität
NFAT	Nuclear Factor of Activated T cells
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	Nucleotide Oligomerization Domain(NOD)-Like-Receptors
NOD	Nucleotide Oligomerization Domain
Pam ₂	Pam ₂ CSK ₄ , Synthetic diacylated lipopeptide, TLR2/6-Agonist
Pam ₃	Pam ₃ CSK ₄ , Synthetic triacylated lipoprotein, TLR1/2-Agonist
PAMP	Pathogen Associated Molecular Pattern
PB	Peripheres Blut
PBMC	Mononukleäre Zellen des Peripheren Bluts
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
pDC	plasmazytoide Dendritische Zelle
PE	R-Phycoerythrin
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGN	Peptidoglykan, TLR2-Ligand
PGRP	Peptidoglycan recognition proteins
PHA	Phytohämagglutinin

PolyI:C	Poly-Inosine/-Cytidyl
PolyU	Polyuridin
PRR	Pattern Recognition Receptors
PU.1	Transcription factor PU.1
-R	Rezeptor
RNA	Ribonukleinsäure
ROR γ t	RAR-related orphan receptor gamma
RPMI	Roswell Park Memorial Institut
Runx3	Runt-related transcription factor 3
s.c.	Subkutan
scFv	single chain variable fragment
Smad3	SMAD Protein 3
ss	einzelsträngig
SSC	Side Scatter Channel
STAT	Signal Transducers and Activators of Transcription
T	Thymin
T-bet	T-box transcription factor TBX21
TCR	T-Zell-Rezeptor
T _{eff}	Effektor-T-Zelle
T _{FH}	Follikuläre T-Helferzelle
TGF	Transforming Growth Factor
T _H	T-Helferzelle
TLR	Toll-Like Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
Tris	Tris-hydroxymethyl-amino-methan
U	Uracil
v/v	volume per volume
w/v	weight per volume

1. Zusammenfassung

Im Fokus dieser Forschungsarbeit standen einerseits die TLR-Aktivierung auf DC sowie andererseits die kürzlich zuvor beschriebene eigenständige T_H17 -Differenzierungslinie, deren Funktion unter anderem die Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen ist. Dazu wurden Monozyten aus Leukozyten menschlicher Vollblutspenden isoliert und anschließend MoDC sowie MoLC generiert. MoDC entsprechen den peripheren Blut-DC, während MoLC den spezialisierten Haut-DC, den LC, entsprechen. In Vorversuchen wurden analog zum Pathogenkontakt in der Haut unterschiedliche TLR-Liganden für die Stimulationsphase der DC eingesetzt. Daraufhin wurde das Zytokinprofil der aktivierten DC bezüglich T_H17 -relevanter Zytokine analysiert. Nach Anlegen von Kokulturen TLR-aktivierter DC mit naiven $CD4^+$ T-Zellen wurden die Zellen und deren Zellkulturüberstände mittels FACS und ELISA auf die spezifischen Expressionsmuster der T_H -Zelldifferenzierungslinien untersucht.

Es konnte als Ergebnis festgehalten werden, dass MoDC sowie MoLC besonders nach Aktivierung via TLR2 ein T_H17 -dirigierendes Zytokin-Expressionsmuster aufweisen. Hierzu produzieren sie signifikant vermehrte Mengen an IL-6, IL-1 β und IL-23, während TGF- β konstitutiv unabhängig von TLR2-Stimulation sezerniert wird. Es konnte zudem eine erhöhte Expression der Reifungsmarker CCR7 und CD83 nach PGN-Stimulation in MoLC nachgewiesen werden. Dieser Effekt war ebenfalls mit dem TLR2-blockierenden Antikörper T2.5 konzentrationsabhängig inhibierbar. TLR2-aktivierte DC waren in Kokultur mit naiven $CD4^+$ T-Zellen tatsächlich in der Lage, eine signifikante T_H17 -Immunantwort zu generieren, während DC, die zuvor via anderer TLR aktiviert wurden, dies nicht oder nur unzureichend vermochten. Im direkten Vergleich zeigten MoLC nach TLR2-Stimulation eine stärkere T_H17 -Direktion als MoDC. Durch Zugabe von externem IL-6 und/oder TGF- β zeigte sich eine signifikante Abnahme der IL-17-Sekretion in den Kokulturen. Mittels MACS selektierte $CD4^+CD25^-$ T-Zellen zeigten im Vergleich zu ausschließlich $CD4^+$ -isolierten T-Zellen und positiv isolierten $CD4^+CD25^+$ eine deutlich stärkere IL-17-Sekretion. Es konnte durch FACS- und ELISA-Versuche mit Hilfe neutralisierender Zytokin-Antikörper eine bedeutende Rolle von IL-1 β und TGF- β während der T_H17 -Differenzierung nachgewiesen werden.

Durch abschließende Versuche mit T2.5 konnte die Rolle des TLR2 in der Differenzierung von naiven $CD4^+$ T-Zellen zu T_H17 -Zellen verifiziert werden.

Das nachgewiesene Vorkommen von IFN γ zusammen mit IL-17 in T_H -Zellen, steht im Einklang mit aktuellen Konzepten über die Komplexität der T_H -Zelldifferenzierung.

Demzufolge wird eine gewisse Plastizität während der Differenzierung von T_H-Zellen zugrunde gelegt, wobei die T_H17-Zellen einen Platz zwischen T_H1- und T_{reg}-Zellen einnehmen^{156, 157}.

2. Abstract

This research focused on two subjects. First, was the TLR activation on DC; secondly, the recently described independent differentiation line, T_H17, whose function is, among others, the resistance of extra-cellular bacteria and fungi. Monocytes from leucocytes of human full blood donations were isolated. Afterwards MoDC as well as MoLC were generated. MoDC correspond to the peripheral blood DC, while MoLC correspond to the specified dermal DC, the LC (Langerhans cells). In pre-experiments different TLR ligands were used for the stimulation phase of the DC by analogy with the pathogen-contact in skin. As a result, the cytokine profile of the activated DC was analysed with regard to cytokines relevant for T_H17. In co-cultures of TLR-activated DC with naive CD4⁺ T cells, the cells and their cellculture supernatant were examined for the specific expression patterns of each T_H cell differentiation line by using FACS and ELISA.

It was demonstrated that MoDC as well as MoLC can express cytokines directing towards T_H17 after activation via TLR2. Moreover, they produce significantly increased amounts of IL-6, IL-1 β and IL-23, while TGF- β was secreted constitutively and independently of TLR2 stimulation. Furthermore, a raised expression of the maturation markers CCR7 and CD83 was proven after PGN stimulation in MoLC. This effect could be inhibited with the TLR2 blocking antibody, T2.5, depending on its concentration. TLR2-activated DC were able in co-culture with naive CD4⁺ T cells to generate a significant T_H17 immune response, while DC which were activated before via other TLR were not or not sufficiently capable of this. In a direct comparison, following TLR2-stimulation MoLC showed a stronger T_H17-directing capability than MoDC. By addition of external IL-6 and/or TGF- β a significant decrease of the IL-17 secretion could be shown. In comparison to exclusively CD4⁺ isolated and positively isolated CD4⁺CD25⁺ T cells, CD4⁺CD25⁻ T cells isolated via MACS showed a clearly stronger IL-17 secretion. An important role of IL-1 β and TGF- β during the T_H17-differentiation could be proven by FACS and ELISA experiments with the help of neutralising cytokine antibodies.

The significance of TLR2 in the differentiation of naive CD4⁺ T cells towards T_H17 cells could be verified by final experiments with T2.5.

The demonstrated occurrence of IFN γ simultaneously with IL-17 in T_H cells concurs with the latest hypotheses about the complexity of the T_H cell differentiation. Therefore, certain plasticity during the differentiation of T_H cells is assumed, while the T_H17 cells occupy a place between T_H1 and T_{reg} cells.

3. Einleitung

Der Nebel, der die komplexen Mechanismen des menschlichen Immunsystems umhüllt, lichtet sich. Die medizinbiologische Grundlagenforschung hat im Bereich der erworbenen Immunität in den letzten Jahren bedeutende Fortschritte zu verzeichnen. Durch aktuelle Forschungsergebnisse erweitert sich stetig unsere Einsicht in die Komplexität des menschlichen Immunsystems, sodass bisherige Hypothesen modifiziert oder gar verworfen wurden. Einige der derzeitigen Forschungsschwerpunkte liegen hierbei auf der Zell-Zell-Interaktion (z.B. durch Oberflächenmoleküle, Chemokine und Zytokine), der Rezeptorsignaltransduktion sowie der genetischen und epigenetischen Regulation von Transkriptionsfaktoren unterschiedlicher Immunzellen.

Das menschliche Immunsystem mit der Aufgabe des Schutzes vor potentiellen Pathogenen wird untergliedert in das unspezifische angeborene Immunsystem und das spezifische adaptive Immunsystem. Außerdem kann es funktionell in eine zelluläre und eine humorale Abwehr unterteilt werden. Die Organe des Immunsystems kommunizieren untereinander mit Hilfe von Zellen und diese wiederum mit Hilfe von Zytokinen, Chemokinen, Adhäsions- und anderen Oberflächenmolekülen auf komplexer Art und Weise. Meistens erfolgt eine Signaltransduktion eingeleitet durch Rezeptor-Ligand-Interaktionen und führt über eine intrazelluläre Kaskade z.B. zu einer Endozytose von Pathogenen, Exozytose von Hormonen bzw. Enzymen, über eine Aktivierung von Transkriptionsfaktoren zu einer Modifizierung der Proteinbiosynthese oder in speziellen Fällen sogar zur Apoptose.

Zum angeborenen Immunsystem gehören Schutzigenschaften, die je nach Art des Erregers unterschiedlich aktiviert werden, jedoch zunächst unabhängig von der individuellen Spezifität des Erregers funktionieren. Dazu gehören unter anderem der Säureschutzmantel der Haut und intakte Epithelien als physikalische Barriere sowie das Komplementsystem als humorale Barriere. Die zellulären Akteure des angeborenen Immunsystems bilden Dendritische Zellen (*Dendritic Cells*, DC), Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen. Diese Zellen erfassen molekular-konstante Pathogenbestandteile (*Pathogen Associated Molecular Pattern*, PAMP) über sogenannte PAMP-Erkennungsrezeptoren (*PAMP Recognition Receptors*, PRR). Unter den PRR bilden die *Toll-like-Receptors* (TLR) eine besondere Gruppe. Nach Ligation des TLR wird über eine intrazelluläre Signaltransduktion die betroffene Zelle aktiviert. Das Resultat der Aktivierung des angeborenen Immunsystems ist der Abbau des Erregers

sowie die Freisetzung von unterschiedlichen Substanzen, die unter anderem Gefäße dilatieren, Schmerz verursachen und die Gewebsinfiltration durch weitere Immunzellen anregen. Es resultiert eine lokale Entzündung und in einigen Fällen eine Aktivierung des adaptiven Immunsystems.

Das erworbene Immunsystem kann nach spezifischer Aktivierung in zwei unterschiedliche Hauptrichtungen dirigiert werden: eine humorale und/oder eine zelluläre Richtung. Nach Aufnahme, Prozessierung und Präsentation des Erregers oder dessen Bestandteile des Makrophagen-Monozyten-Systems gelangen diese spezialisierten Zellen als Antigenpräsentierende Zellen (*Antigen Presenting Cells*, APC) in sekundäre lymphatische Organe wie Lymphknoten, Milz oder Mukosa-assoziierte lymphatische Gewebe (*Mucosa-associated lymphatic tissue*, MALT). Dort treten Dendritische Zellen in Wechselwirkung mit den Zellen des spezifischen Immunsystems: den T- und B-Lymphozyten. Diese Zellen reagieren hochspezifisch auf das präsentierte Antigen mit klonaler Vervielfältigung. Die Regulation dieses Systems erfolgt vorwiegend über Zytokine, die von verschiedenen Immunzellen sezerniert werden.

B-Lymphozyten reifen nach Antigenkontakt mit ihrem Antigen-spezifischen B-Zell-Rezeptor (*B-cell receptor*, BCR) zu Plasmazellen und exprimieren zunächst membranständiges Immunglobulin M (IgM) sowie Immunglobulin D (IgD) und sezernieren im weiteren Verlauf auch lösliches Immunglobulin G (IgG) und Immunglobulin A (IgA).

T-Lymphozyten spielen eine bedeutende Rolle im erworbenen Immunsystem, sie organisieren die mikrobielle Abwehr im Zusammenspiel mit APC und B-Lymphozyten oder die Abwehr von Viren und intrazellulären Bakterien direkt durch Zytotoxizität. Sie besitzen einen membrangebundenen T-Zell-Rezeptor (*T-cell receptor*, TCR, im Komplex mit CD3), dessen extrazelluläre Antigenbindungsstelle durch Hypermutationen einer außerordentlichen genetischen Diversität unterliegt. Bei ihrer Differenzierung im Thymus entstehen unterschiedliche T-Zell-Typen: CD4⁺ T-Helferzellen, CD8⁺ zytotoxische T-Zellen und weitere spezialisierte T-Zellen, die in der Literatur nach Expression verschiedener Untereinheiten des TCR (z.B. $\gamma\delta$ -T-Zellen) und nach Oberflächenmolekülen (CD4⁻/CD8⁻, CD4⁺/CD8⁺) benannt werden. Die T-Lymphozyten unterliegen dabei speziellen Selektionsverfahren, damit körpereigene und fremde Stoffe unterschieden werden können. Sowohl B- und T-Lymphozyten sind nach Antigenkontakt in der Lage als so genannten Gedächtniszellen fortzubestehen. Beim nächsten Kontakt mit dem gleichen oder strukturell ähnlichen Antigen reagieren diese hochspezialisierten Zellen sofort und können eine schnelle sowie gezielte Abwehrreaktion hervorrufen.

3.1 Dendritische Zellen

1868 wurden von Paul Langerhans, damals Medizin-Student am Pathologie-Institut der Charité in Berlin unter der Leitung von Rudolf Virchow, erstmals Dendritische Zellen aus der Haut isoliert¹. Fälschlicherweise nahm Langerhans aufgrund der Morphologie der isolierten Zellen und der vermuteten ektodermalen Herkunft eine direkte Verwandtschaft zu dendritischen Nervenzellen an. Erst vor ca. 50 Jahren erfolgte die Charakterisierung dieser Zellen als in die Haut eingewanderte immunkompetente Zellen durch Birbeck et al.². Einen weiteren großen Fortschritt auf dem Gebiet der DC-Forschung wurde durch die *in vitro*-Generierung von DC aus Monozyten als Vorläuferzellen ca. 20 Jahre später erzielt³. Dadurch waren *in vitro* differenzierte DC in ausreichender Zahl verfügbar, um effizient ihre Eigenschaften und Funktionen untersuchen zu können.

3.1.1 DC-Funktionen

Als professionelle APC besitzen DC die Fähigkeit, eine Antwort des adaptiven Immunsystems durch Aktivierung antigenspezifischer naiver T-Zellen einzuleiten. Auch die Ausrichtung der adaptiven Immunantwort wird durch die DC-induzierte Polarisierung von T-Zellen entscheidend dirigiert. Hierbei sind drei DC-abhängige Faktoren von wesentlicher Bedeutung: Erstens die Art und der Differenzierungsstatus der bei der Immunreaktion involvierten DC, zweitens Quantität und Qualität DC-aktivierender Signale sowie drittens das vorliegende Zytokinmilieu^{4,5}.

In vivo differenzieren unreife DC zunächst aus hämatopoetischen Vorläuferzellen und patrouillieren dann als Wächter des Immunsystems im Körper⁶. Körper eigene Antigene werden von unreifen DC unter nicht-inflammatorischen Bedingungen phagozytiert, prozessiert und über Haupthistokompatibilitätskomplexe der Klasse I (*Major Histocompatibility Complex I*, MHC I) den naiven T-Zellen stets präsentiert. Dadurch können eigenantigenspezifische und somit potenziell autoreaktive T-Zellen aufgrund von fehlender Kostimulation und ohne aktivierende Zytokine entweder deletiert oder in einen anergen Zustand versetzt werden. Somit stellen die Induktion sowie die Aufrechterhaltung von Selbsttoleranz unter nicht-inflammatorischen Bedingungen wesentliche immunbiologische Funktionen von DC in der Peripherie des menschlichen Körpers dar⁷.

Pathogene besitzen so genannte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP), z.B. als Bestandteile ihrer Zellwand. Diese können durch DC über Mustererkennungsrezeptoren (PRR) gebunden werden⁸. Die wichtigste Gruppe unter den PRR bilden die membrangebundenen TLR. Diese werden u. a. von DC exprimiert und

können anhand ihrer Bindung an PAMPs verschiedener Erreger und der intrazellulären Signaltransduktion in unterschiedliche TLR-Subtypen gegliedert werden⁹.

Die Erkennung von in Gewebe eingedrungenen Pathogenen durch unreife DC mithilfe von TLR oder sogenannten intrazellulären NLR (*Nucleotide Oligomerization Domain(NOD)-Like-Receptors*)¹⁰, führt zur Induktion PAMP-spezifischer inflammatorischer Signaltransduktionskaskaden¹¹. Durch diesen induzierten Transformationsprozess reifen DC und unterscheiden sich nun bezüglich ihrer Immunkompetenz wesentlich von ihren unreifen Vorläufern. So ist eine erhöhte Expression von MHC-II-Moleküle zur Antigenpräsentation sowie von T-Zell-aktivierender kostimulatorischer Oberflächenmoleküle wie CD40, CD80 und CD86 und des DC-spezifischen Aktivierungsmarker CD83 nachweisbar¹². Des Weiteren ist eine wesentliche Fähigkeit reifer DC die Produktion verschiedener proinflammatorischer und T-Zell-aktivierender Zytokine. Für die nachhaltige Differenzierung naiver T-Zellen zu T-Effektorzellen werden nach heutigem Verständnis folgende DC-Funktionen benötigt: Erstens Antigenpräsentation über MHC-I/II-Komplexe, zweitens kostimulierende Oberflächenmoleküle und drittens aktivierende Zytokine¹³. So wird deutlich, dass reife DC maßgeblich bei der Einleitung und Direktion adaptiver Immunantworten beteiligt sind.

Zur aktiven Wanderung in Richtung eines Inflammationsherdes exprimieren unreife myeloiden DC C-Chemokinrezeptor 5 (CCR5) als spezifischen Rezeptor der proinflammatorischen Chemokine MIP-1 α (CCL3) und MIP-1 β (CCL4). Nach Antigenkontakt aktivierte DC sind hingegen durch Variation ihrer Chemokinrezeptoren in der Lage, inflammatorische Gewebe zu verlassen und in T-Zell-reiche Areale von sekundären lymphatischen Organen einzuwandern. Nach DC-Aktivierung wird auf diesen Zellen die Expression von CCR7 als spezifischen Rezeptor für CCL19 und CCL21 induziert, die beide konstitutiv von Endothelzellen der sekundären lymphatischen Organe produziert werden. Diese DC-spezifische Chemokin-Chemokinrezeptor-Interaktion lässt aktivierte, antigenbeladene DC aus dem Entzündungsbereich über afferente lymphatische Gefäße in Richtung Lymphknoten wandern. Mittels Regulation der Chemokinrezeptor-Expression können sich DC im Verlauf ihres Reifungsprozesses den jeweiligen Anforderungen entsprechend positionieren¹⁴. Die gezielte Migration von DC im menschlichen Körper ist ein wesentlicher Mechanismus in der Infektabwehr.

3.1.2 DC-Populationen

Dendritische Zellen stellen *in vivo* eine heterogene, aus diversen Subpopulationen zusammengesetzte Leukozytenart dar. Die Herkunftslinien und die Differenzierungswege humaner DC-Subpopulationen sind zum jetzigen Zeitpunkt nicht eindeutig geklärt und werden kontrovers diskutiert. Die verschiedenen DC-Subpopulationen lassen sich jedoch schon anhand phänotypischer Merkmale in mindestens zwei eigenständige Hauptdifferenzierungslinien unterteilen^{15, 16}.

Myeloide CD11c⁺ DC bilden eine eigenständige Differenzierungslinie, da sie sowohl *in vitro* als auch *in vivo* aus myeloiden Vorläuferzellen differenzieren können. Innerhalb der CD11c⁺ DC-Population sind weitere phänotypisch unterscheidbare Subpopulationen identifiziert worden, die ausnahmslos negativ für die Leukozyten-Linienmarker CD3 (T-Zellen), CD14 (Monozyten/Makrophagen), CD19 (B-Zellen) und CD56 (NK-Zellen) sind¹⁷. Diese peripheren DC des humanen Blutes (BDC) exprimieren jedoch große Mengen an MHC II-Molekülen (MHC II⁺). Es werden auch weitere DC-Subpopulationen nach Expression spezifischer Oberflächenmoleküle (z.B. BDCA-2/-3/-4) unterschieden¹⁸. Ein weiterer Typ von myeloiden DC befindet sich im epithelialen Gewebe und exprimiert CD1a wie auch das Typ-II-Lektin Langerin (CD207). Diese spezialisierten DC der Epithelien enthalten mikroskopisch sichtbare Birbeck-Granulae und werden nach dem Entdecker Langerhans-Zellen (LC) genannt¹⁹.

Dem myeloiden Zelltyp steht im peripheren Blut ein lymphoider DC-Phänotyp gegenüber. Die Zellen dieser Linie sind zwar auch MHC II⁺ und negativ für andere Linienmarker, es wird jedoch aufgrund des charakteristischen Oberflächenmolekülmusters und der Expression der α -Untereinheit des TCR ein lymphoider Ursprung angenommen²⁰. Aufgrund ihrer morphologischen Ähnlichkeit zu Plasmazellen bezeichnet man sie als plasmazytoide DC (pDC). Wie B- oder T-Zellen haben pDC die Fähigkeit direkt zwischen Blutbahn und T-Zellzonen der sekundären lymphatischen Organe durch hochendotheliale Venolen hindurchzuwandern^{21,22}.

Diverse DC-Subtypen können aus Monozyten bzw. aus CD34⁺ Stammzellen mit Hilfe explorierter Zytokinkombinationen unter Kulturbedingungen induziert werden. Humane DC lassen sich *in vitro* aus Monozyten unter Verwendung von GM-CSF/IL-4²³ oder aus multipotenten CD34⁺ Blutstammzellen mithilfe von GM-CSF/TNF α ²⁴⁻²⁶ differenzieren. In der Humanimmunologie werden inzwischen vornehmlich Monozyten-generierte DC (MoDC) zu Forschungszwecken oder bei klinischen Anwendungen eingesetzt. Konventionelle MoDC, die am ehesten den myeloiden CD11c⁺ BDC entsprechen, werden nach Sallusto et al. innerhalb von sieben Tagen mithilfe von GM-CSF/IL-4 aus Monozyten

generiert²⁵. Durch die Verwendung der Zytokinkombinationen IL-3/IL-4, IL-3/IFN β oder GM-CSF/IL-15 können innerhalb von fünf bis sieben Tagen humane Monozyten zu verschiedenartigen MoDC differenzieren²⁴⁻²⁹.

3.1.3 DC-Aktivierung via TLR

Eine hochkomplexe und variable Expression von immunbiologisch-relevanten Proteinen führt zur funktionellen Gliederung einzelner DC-Subpopulationen. Hierbei spielt die TLR-Expression eine wesentliche Rolle.

In vielen Arten von Lebewesen lassen sich Homologe der TLR nachweisen und deuten auf ihre lange Geschichte innerhalb der Evolution des angeborenen Immunsystems hin. So werden in Wirbeltieren zwischen 10 und 12 TLR-Subtypen unterschieden³⁰⁻³², während bei Seeigel mehr als 200 Typen beschrieben werden³³. TLR stellen eine Gruppe von Typ 1 Glykoproteinen der Zellmembran dar, die anhand ihrer PAMP-Bindungsstelle und ihrer intrazellulären Signaltransduktionsdomäne unterschieden werden. Der Mensch verfügt über 10 bisher beschriebene TLR. Sie werden nach ihrer Lokalisation in zwei Gruppen unterteilt. TLR 1, 2, 4, 5, 6 und 10 sind an der Zelloberfläche lokalisiert und werden nach Bindung des PAMP durch Endozytose Teil des Phagosomensystems. TLR 3, 7, 8 und 9 sind hingegen in der Membran von Endoplasmatischen Retikula und Endosomen lokalisiert, wobei ihre PAMP-Bindungsstellen luminal gerichtet sind^{34,35}. TLR2 bildet mit TLR1 oder TLR6 einen Heterodimerkomplex an der Zelloberfläche, während andere TLR als Monomere oder Homodimere fungieren. TLR-Liganden, die von Pathogenen gebildet werden, können grob in drei Kategorien unterteilt werden: Lipide und Lipoproteine (erkannt durch TLR2/1, TLR2/6, TLR4), Proteine (TLR5) und Nukleinsäuren (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9)³⁶. Für TLR10 konnte trotz Entschlüsselung seines molekularen Aufbaus bisher noch kein Ligand gefunden werden³⁷. Weiterhin werden nach ihrer Herkunft drei Gruppen von TLR-Liganden unterschieden: Bakterien-/Viren-Bestandteile, synthetische und physiologisch-endogene Stoffe. Tabelle 1 zeigt eine Übersicht natürlicher und synthetischer TLR-Liganden, die in der immunologischen Forschung benutzt werden. Im Gegensatz zur hoch-selektiven Antigen-Erkennung durch TCR bzw. BCR sind TLR ausschließlich in der Lage, eine begrenzte Gruppe von Struktur-ähnlichen aber in der Umwelt weit verbreiteten Molekülmustern zu erkennen.

TLR	Bakterien-/Viren-Bestandteile	Synthetische Stoffe
TLR2/1	Triacyl-Lipopeptide	Pam₃CSK₄
TLR2/6	Diacyl-Lipopeptide Lipoteichonsäure; Zymosan; Porine; MALP2 ; bakterielles Peptidoglykan ; Lipoarabinomannan	Pam₂CSK₄
TLR3	dsRNA	Poly I:C; poly A:U
TLR4	LPS ; Mannan; Phospholipide; <i>envelope proteins</i> (viral)	<i>monophosphoryl lipid A</i>
TLR5	Flagellin	Unbekannt
TLR7	ssRNA (viral)	GU-reiche Oligoribonucleotide; Ixoribin; Imiquimod; Resiquimod; Adenosin- und Guanosinderivative
TLR8	ssRNA (viral)	GU-reiche Oligoribonucleotide; Resiquimod; Adenosin- und Guanosinderivative
TLR9	DNA (bakteriell/viral)	Deoxynucleotide mit unmethylierten CpG -Motiven
TLR10	Unbekannt	Unbekannt

Tab. 1: natürliche und synthetische TLR-Liganden (hervorgehoben sind die von uns benutzten Liganden)³⁸

Aufgrund des vielfältigen natürlichen Vorkommens von Pathogen-assoziierten TLR-Liganden ist das TLR-Profil der DC von entscheidender Bedeutung in der Direktion der T-Zell-Immunantwort. Nach neueren Erkenntnissen wird zudem die funktionelle Plastizität von DC dadurch erhöht, dass eine selektive bzw. kombinierte Aktivierung verschiedener TLR auf myeloiden DC unterschiedliche Zytokinprofile und somit differente T-Zell-Polarisierungen induzieren können³⁹.

So erkennt TLR4 auf MoDC bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und induziert neben großen Mengen proinflammatorischer Zytokine wie TNF α und IL-6 auch T_H1-polarisierendes IL-12p70⁴⁰. Dieser Effekt lässt sich durch Kombination mit TLR8-Ligation mittels einzelsträngiger RNA, z.B. aus Viren, synergistisch verstärken⁴¹.

TLR2 in Verbindung mit verschiedenen Adaptermolekülen erkennt diverse Struktur motive, wie Lipopeptide (TLR1/-2), Glykolipide (TLR2/-6) oder Zymosan (TLR2/Dektin-1)³⁸⁻⁴². Im Gegensatz zu TLR4 bewirkt die Aktivierung von MoDC über TLR2 jedoch eine vergleichsweise geringe Expression von IL-12p70⁴³. Nach Ligation von TLR2 auf MoDC mit Cholera-Toxin, Zymosan oder mit synthetischem Lipopeptid (z.B. PAM₃CSK₄) werden bevorzugt T_H2-Antworten induziert⁴⁴. Des Weiteren wird durch Aktivierung von TLR2 durch schistosomale Phosphatidylserine, Yersinia-Antigene oder mycoplastische Lipopeptide (MALP2) IL-10 sezerniert⁴⁵⁻⁴⁷. IL-10 als immunregulatorisches Zytokin unterstützt die Aufrechterhaltung von Selbsttoleranz und die Polarisierung naiver T-Zellen in Richtung regulatorischer T-Zellen⁴⁸.

Insgesamt sind die *in-vitro*-Differenzierungswege der DC aus monozytären oder CD34⁺ Vorläufern für die unterschiedliche Polarisierung naiver T-Zellen zu Effektor-T-Zellen von großer Bedeutung.⁴⁹ *Ex vivo* isolierte pDC sind durch eine selektive Expression von TLR7 und TLR9 in ihren endosomalen Kompartimenten gekennzeichnet^{50, 51}. Diese Rezeptoren erkennen spezifisch bakterielle CpG-Motive sowie Nukleinsäurebestandteile von RNA- bzw. DNA-Viren, wobei eine Rezeptorligation eine vollständige Aktivierung der pDC auslösen kann^{52,53}. So aktivierte pDC produzieren anti-viral wirkende und T_H1-polarisierende Typ I-Interferone²⁰. Daher steht für pDC die Erkennung und Bekämpfung von Viren sehr wahrscheinlich funktionell im Vordergrund.

Myeloide DC exprimieren TLR1-6, TLR8 und TLR10^{54, 55}; sie sezernieren im Vergleich zu pDC nur geringere Mengen an Typ I-Interferonen. Das unterschiedliche TLR-Expressionsmuster in plasmazytoiden und myeloiden DC zeigt eine mögliche funktionelle Spezialisierung in Bezug auf die Antigenerkennung und Direktion der Immunantwort⁵.

Allerdings ist neben dem TLR-Profil und der DC-Vorläuferzellart auch die Methodik der DC-Gewinnung entscheidend in der T-Zell-Direktion involviert⁵⁶. IL-3/IL-4-differenzierte MoDC produzieren beispielsweise bei Stimulation nur geringe Mengen an IL-12p70 und induzieren dadurch eher eine T_H2-Antwort. Mit GM-CSF/IL-15 anstelle von GM-CSF/IL-4 kultivierte MoDC sezernieren hingegen signifikante Mengen an IL-2, womit sie in der Lage sind, T-Effektorzellen oder NK-Zellen zu regulieren.

Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass IFN γ von myeloiden DC selbst produziert werden kann⁵⁷ und somit Messungen des T_H1-Zytokins mittels ELISA verfälschen kann. *In vitro* kann allerdings auch unabhängig von TLR-Aktivierung durch Ligation von CD40 mit CD40L eine vollständige Aktivierung von DC mit deutlich T_H1-polarisierendem Zytokinprofil induziert werden⁵⁶.

Als zusätzlicher Faktor der Immunantwortdirektion werden inzwischen auch unterschiedliche DC-Aktivierungsgrade in Betracht gezogen. So kann die Differenzierung von naiven T-Zellen zu IL-10-produzierenden T_{reg} durch nur teilweise ausgereifte DC ausgelöst werden⁵⁸. So sind *in vivo* unter nicht-inflammatorischen Bedingungen so genannte semi-ausgereifte DC in Lymphknoten nachweisbar, welche zwar MHC II sowie T-Zell-kostimulierende Moleküle, jedoch keinerlei proinflammatorische oder polarisierende Zytokine exprimieren⁵⁹. Die aktuelle Datenlage zeigt, dass die Orientierung einer adaptiven Immunantwort ganz entscheidend von der Differenzierungslinie und dem Grad der Ausreife der DC sowie von stimulierenden Aktivierungssignalen abhängig ist.

3.2 CD4⁺ T-Zellen

CD4⁺ T-Helfer-Zellen (T_H) sind essentielle Regulatoren des adaptiven Immunsystems und spielen somit eine entscheidende Rolle während der Pathogen-Eliminierung. Nach Aktivierung durch professionelle Antigen-präsentierende Zellen differenzieren naive CD4⁺ T-Zellen zu Effektor-T-Zellen, die an Hand ihres spezifischen Zytokin-Expressionsmusters und deren immunologischen Funktionen unterschieden werden. 1986 wurden erstmals zwei unterschiedliche Typen von CD4⁺ Effektor-T-Zellen beschrieben⁶⁰ und später dann als T_H1 und T_H2 klassifiziert⁶¹. Diese beiden Zelllinien fanden daraufhin ein starkes Augenmerk in der immunologischen Forschung. Es wurde eine Dichotomie der T_H-Zelllinien postuliert und lange Zeit verfolgt. Es konnten jedoch weitere Subtypen von CD4⁺ Effektor-T-Zellen, wie T_H3-Zellen⁶², regulatorische T-Zellen Typ 1(T_{reg}1)⁶³ oder folliculäre Helfer-T-Zellen (T_{FH})⁶⁴ unterschieden werden, die aber bisher nicht als eigenständige Zelllinien etabliert werden konnten. Eine Gruppe von immunmodulatorischen T-Zellen wird heute zu einer eigenständigen Zelllinie der regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) zusammengefasst⁶⁵. Hierbei wird zwischen natürlichen T_{reg} (nT_{reg}) und TGF-β-induzierten T_{reg} (iT_{reg}) unterschieden. In jüngster Zeit wurden zusätzlich drei weitere Typen von CD4⁺ T_H-Zellen beschrieben, die T_H17-, T_H22- und T_H9-Zellen, welche die spezifischen Zytokine IL-17, IL-22 bzw. IL-9 in hohen Konzentrationen produzieren⁶⁶⁻⁶⁹. Trotz ungeklärter physiologischer Funktion erfüllen diese Subtypen von Effektor-T-Zellen alle Kriterien einer eigenständigen Zelldifferenzierungslinie. Es wird zudem jedoch eine Differenzierungsplastizität zwischen allen eigenständigen T_H-Subtypen diskutiert.

Um die Definition einer eigenständigen T_H-Zelldifferenzierungslinie zu erfüllen, müssen *in vitro* sowie *in vivo* naive CD4⁺ T-Zellen in die jeweilige Linie unabhängig von den anderen T_H-Zellreihen differenzieren können und dabei ein charakteristisches Genexpressionsmuster zeigen.

Während der T_H-Zelldifferenzierung unterscheidet man folgende drei Phasen: Die Induktion, die Amplifikation und die Stabilisierung. Dabei kann zu jedem Zeitpunkt die Richtung der T_H-Zell-Differenzierung beeinflusst werden. Nach drei bis vier Zellteilungen verliert ein T-Zell-Klon jedoch seine Fähigkeit zum Ansprechen auf Differenzierungsstimuli, d.h. die Differenzierung ist dann abgeschlossen^{70, 71}.

Die Phasen gehen fließend in eine Effektorphase über, da parallel zu Differenzierungsstimuli auch Effektorproteine exprimiert werden können. Die Induktion bedarf *in vivo* der Ausbildung einer sogenannten „immunologischen Synapse“. Während der Amplifikationsphase spielen das Zytokinmilieu und die Expression von

Zytokinrezeptoren eine bedeutende Rolle. Zur Stabilisierung dient einerseits die Potenzierung des eigenen Differenzierungswegs durch eine autokrine positive Rückkopplung und andererseits die Inhibition anderer Differenzierungslinien durch eine negative Rückkopplung. Sowohl Amplifikation als auch Stabilisierung geschehen vornehmlich mittels Zytokinen und deren Rezeptoren über bestimmte Signaltransduktoren und bestimmte Transkriptionsfaktoren, deren Kombination charakteristisch für die jeweiligen Zelltypen ist. Zudem werden bestimmte Zytokinrezeptoren an der eigenen Zelloberfläche überexprimiert, was wiederum die Sensibilität gegenüber deren Liganden erhöht.

Zurzeit werden also folgende Klassen von CD4⁺ T-Zellen als eigenständige Zelldifferenzierungslinien unterschieden: T_H1-, T_H2-, T_H17-, T_H9-, T_H22-, T_{FH}- und T_{reg}-Zellen, wobei die Differenzierungswege von T_H9 und T_H22 noch kontrovers diskutiert werden. Tabelle 2 zeigt die Spezifitäten dieser Zellreihen, die teilweise in den einzelnen Kapiteln erklärt werden.

Außerdem ist noch nicht eindeutig geklärt, in wie weit bereits differenzierte T-Zellen umdifferenzieren können. Auch die Rolle der Gedächtnis-T-Zellen während der T_H-Zell-Differenzierung wird untersucht⁷².

	T_H1	T_H2	T_H17	T_H9	T_H22	T_{FH}	T_{reg}
Zytokinmuster	IFN γ , LT α , IL-2	IL-4, IL-5, IL-13	IL-17, IL17F, IL-21, IL-22	IL-9, IL-10	IL-22	IL-21	TGF- β
Induktionszytokine	IL-12	IL-25 (IL-17E)	TGF- β , IL-6, IL-1 β , IL-23	TGF- β und IL-4	TNF- α und IL-6	IL-6 und IL-21	TGF- β und IL-2
Autokrine Zytokine	IFN γ	IL-4	IL-21	?	?	?	TGF- β
Signaltransduktoren	STAT1 STAT4	STAT6	STAT3	STAT6	?	STAT3	STAT5
Transkriptionsfaktoren	T-bet, HLX	GATA3, MAF	ROR γ T, ROR α	PU.1, IRF4	AhR	Bcl-6	FOXP3
Zytokinrezeptoren	IL-12R β 2	IL-17RB	IL-23R, IL-1R1	?	?	?	?

Tab. 2: Überblick über die wichtigsten Spezifitäten der derzeit unterschiedenen CD4⁺ T-Zellarten^{68, 69, 70, 73}. „?“ steht für „derzeit keine eindeutigen Forschungsergebnisse veröffentlicht“.

3.2.1 T_H1-Zellen

T_H1-Zellen vermitteln die Immunantwort gegen intrazelluläre Pathogene und spielen daher eine entscheidende Rolle in der Abwehr z. B. von Mykobakterien⁷⁴. Es wird ihnen auch eine entscheidende Funktion bei einer Reihe von Autoimmunerkrankungen zugeschrieben. Das spezifische Zytokinprofil von T_H1-Zellen setzt sich zusammen aus IFN γ , Lymphotoxin α (LT α) und IL-2. IFN γ aktiviert die bakterizide Funktion von

Makrophagen⁷⁵. LT α wird als Progressionsmarker bei der Multiple Sklerose (MS) verwendet und mit der Entstehung dieser Autoimmunerkrankung in Verbindung gebracht⁷⁶. Die physiologische Funktion von LT α ist noch nicht geklärt. Die IL-2-Produktion ist neben der Induktion von Proliferation in die Formung eines immunologischen Gedächtnisses involviert⁷⁷.

Durch TCR-Ligation wird in T_H1-Zellen die Expression des IL-12R β 2 induziert und mittels IL-12 sowie IFN γ aufrechterhalten⁷⁸, während die β 1-Untereinheit des IL-12-Rezeptors konstitutiv schon auf naiven CD4⁺ T-Zellen exprimiert wird⁷⁹. Die Hochregulation des IL-12-Rezeptorkomplexes führt zur IFN γ -Induktion und spielt eine wesentliche Rolle während der T_H1-Antwort. Die Chemokin-Rezeptoren CXCR3 und CCR5 werden besonders auf T_H1-Zellen überexprimiert⁸⁰.

Die Transkriptionsfaktoren T-bet und Stat1 sind verantwortlich für die Initiation einer T_H1-Zelldifferenzierung⁸¹. Überexpression von T-bet führt zur IFN γ -Produktion und hemmt reziprok die IL-4-Expression. In Versuchen mit T-bet^{-/-} Mäusen wurde gezeigt, dass die Versuchstiere auf Grund einer unzureichenden T_H1-Differenzierung vermehrt Asthma-ähnliche Erkrankungen aufwiesen⁸². IL-12 verstärkt über Stat4 in der Differenzierungsphase eine T_H1-Antwort, indem es in aktivierten T-Zellen eine IFN γ -Expression induziert⁸³. IL-12/Stat4 führt via Aktivierung von NF κ B auch unabhängig von einer TCR-Stimulation zu einer IFN γ -Produktion⁸⁴. Außerdem scheinen die Transkriptionsfaktoren Runx3 und Hlx die IFN γ -Expression während einer T_H1-Antwort zu verstärken^{85,86}.

Über TLR3, TLR4, TLR7, TLR8, TLR9 oder TLR11 aktivierte DC produzieren erhöhte Mengen an IL-12 und leiten somit eine T_H1-Antwort ein⁸⁷. Über eine folgende Induktion der IFN γ -Produktion und der Expression von IL-12R β 2 wird die T_H1-Zelldifferenzierung dann verstärkt⁸⁸.

3.2.2 T_H2-Zellen

T_H2-Zellen vermitteln die Immunabwehr gegen extrazelluläre Parasiten⁷⁴. Darüber hinaus spielen sie eine wichtige Rolle bei der Entstehung und Aufrechterhaltung von Asthma und allergischen, IgE-vermittelten Reaktionen insgesamt.

T_H2-Zellen produzieren IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13, IL-25 und Amphiregulin. Das T_H2-spezifische Zytokin IL-4 wirkt als positives Rückkopplungszytokin und bewirkt die Umschaltung einer IgG- zu einer IgE-Produktion in B-Zellen⁸⁹. IgE führt über Bindung an den Fc ϵ R1 auf Basophile Granulozyten oder Mastzellen zu einer Histamin-Ausschüttung und gleichfalls zu allergischen Reaktionen vom Typ IV. IL-5 spielt eine bedeutende Rolle

in der Rekrutierung von Eosinophilen Granulozyten⁹⁰. IL-9 induziert die Muzin-Produktion in Epithelzellen während einer allergischen Reaktion⁹¹. Von T_H2-Zellen produziertes IL-10 hemmt DCs und eine T_H1-Proliferation⁹². IL-13 wirkt direkt gegen Parasiten und induziert Atemwegshypersensitivität⁹³. IL-25 (auch IL-17E genannt) führt als T_H2-Zytokin über den IL-17-Rezeptor B (IL-17RB) zur Produktion von IL-4, IL-5 und IL-13⁹⁴. IL-25 wirkt dabei sowohl initiiierend als auch verstärkend auf die T_H2-Zelldifferenzierung. IL-25 induziert auch die Produktion der Chemokine CCL5 und CCL11 zur Rekrutierung von Eosinophilen Granulozyten. Amphiregulin gehört zu der Familie der epidermalen Wachstumsfaktoren (*epidermal growth factor*, EGF) und induziert wahrscheinlich über eine epitheliale Proliferation eine Atemwegshypersensitivität⁹⁵.

Auf T_H2-Zellen werden die Zytokinrezeptoren IL-4R α , IL-2R α und IL-33R α ⁹⁶ hochreguliert sowie die Chemokinrezeptoren CCR3, CCR4, CCR8 und CRTh2 exprimiert^{97, 98}.

Obwohl auch Stat6-unabhängige Differenzierungswege existieren, ist Stat6 der Haupttranskriptionsfaktor der T_H2-Zelldifferenzierung⁹⁹. Eine Stat6-Aktivierung ist für die Expression des T_H2-Genpromotors GATA-3 notwendig und führt zu einer Initiation und Aufrechterhaltung der T_H2-Antwort über die Sekretion von IL-5 und IL-13¹⁰⁰. Außerdem sind die Transkriptionsfaktoren Stat5a/b¹⁰¹, c-Maf¹⁰², IRF-4¹⁰³ und Gfi-1¹⁰⁴ an der T_H2-Antwort beteiligt. Die GATA-3 Expression wird durch IL-4/Stat6 und durch TCR-Aktivierung in Verbindung mit IL-2/Stat5 gesteigert¹⁰⁵. IL-4 scheint allerdings *in vivo* nicht essentiell für eine T_H2-Differenzierung zu sein, während GATA-3 *in vivo* unentbehrlich ist für eine T_H2-Antwort. Das führt zu der Annahme, dass es einen IL4-unabhängigen Weg der GATA-3-Induktion geben muss¹⁰⁶. Hier wird in der Literatur zurzeit die Aktivierung über Notch-Liganden diskutiert¹⁰⁷.

3.2.3 T_{reg}-Zellen

T_{reg}-Zellen sind verantwortlich für Selbsttoleranz und für die Suppression von Immunantworten¹⁰⁸. Das Fehlen dieser Zellen führt zu überschießenden Immunantworten, die sich als diverse Autoimmunerkrankungen manifestieren können.

Sakaguchi et al. entdeckten 1995, dass T_{reg}-Zellen auf ihrer Oberfläche CD25 exprimieren¹⁰⁹. Nachdem im Jahr 2001 die Beobachtung gemacht wurde, dass bei Autoimmun Scurfy Mäusen und bei einem Patienten mit IPEX (*immune dysregulation polyendocrinopathy enteropathy X-linked*) Foxp3-Mutationen vorlagen¹¹⁰, wurde im Jahre 2003 Foxp3 als spezifischer Transkriptionsfaktor für T_{reg}-Zellen klassifiziert¹¹¹. Im selben Jahr zeigte sich dann, dass Foxp3⁻ naive CD4⁺ T-Zellen durch das Zytokin TGF- β zu Foxp3⁺ iT_{reg} differenzieren können¹¹².

Die immunsuppressive Funktion von T_{reg}-Zellen basiert auf der Produktion der Zytokine TGF- β , IL-10 und IL-35. *In vivo* ist TGF- β essentiell für die Immunsuppression durch T_{reg}-Zellen, während in bestimmten Konstellationen *in vitro* auch in Abwesenheit von TGF- β eine suppressive Aktivität nachweisbar ist¹¹³. Die IL-10-Produktion durch T_{reg}-Zellen wirkt präventiv und kurativ auf entzündliche Darmerkrankungen¹¹⁴. Ein Fehlen von IL-10 aus T_{reg}-Zellen führt zu spontaner Kolitis und verstärkter Atemwegsinfektionen. Das von T_{reg}-Zellen exprimierte Zytokin IL-35 hat strukturelle Ähnlichkeiten zu IL-27 und IL-12p35 und besitzt suppressive Aktivität¹¹⁵. Obwohl auf nahezu allen aktivierten T-Zellen CD25 exprimiert wird, stellen die T_{reg}-Zellen mit einer konstitutiven Expression und hoher Rezeptordichte eine Besonderheit dar. Die konstitutive Überexpression von CD25, der IL-2R α -Untereinheit, sowie das Zytokin IL-2 spielen eine besondere Rolle für die immunregulatorische Funktion von T_{reg}-Zellen¹¹⁶. T_{reg}-Zellen exprimieren außerdem CTLA-4 sowie GITR¹¹⁷. Diese Marker dienen der Unterscheidung gegenüber naiven T-Zellen, da nur aktivierte T-Zellen diese exprimieren. T_{reg}-Zellen allerdings produzieren speziell beim Menschen nur sehr wenig oder gar kein CD127 (auch IL-7R α genannt), so stellen hohe Expressionslevel von CD25 neben fehlendem CD127 eine gute Annäherung für den Nachweis von T_{reg}-Zellen dar¹¹⁸.

Eine Überexpression von Foxp3 in konventionellen T-Zellen überführt diese in eine Art T_{reg}-Zellen mit anergen und suppressiven Eigenschaften¹¹⁹. Eine kontinuierliche Foxp3-Expression ist spezifisch für suppressive T_{reg}-Zellen¹²⁰. TGF- β induziert eine Foxp3-Expression¹²¹. Abnehmende Foxp3-Expression kann T_{reg}-Zellen zu T_{H2}-ähnliche Zellen umformen. Dies kann für eine enge Verknüpfung zwischen der T_{reg}- und der T_{H2}-Differenzierungslinie stehen¹²². Außerdem ist eine Aktivierung des Transkriptionsfaktors Stat5 über IL-2 für die T_{H2}- sowie für die T_{reg}-Differenzierung von großer Bedeutung¹²³. Stat5 kann die Foxp3-Induktion durch Bindung an dessen Promotor verstärken¹²⁴.

TGF- β spielt sowohl bei der Differenzierung von iT_{reg} als auch von nT_{reg} eine wichtige Rolle^{112, 125}. TGF- β ist daher essentiell für eine adäquate Immunsuppression durch T_{reg}. Außerdem ist unter Abwesenheit von TGF- β *in vivo* eine schlechte Zellüberlebensrate von T_{reg} nachweisbar¹²⁶. In Mausversuchen führt TGF- β unter nichtentzündlichen Umständen zur Differenzierung von naiven T-Zellen zu iT_{reg}¹¹². TGF- β aktiviert den Transkriptionsfaktor Smad3, während TCR-Stimulation NFAT induziert. Smad3 und NFAT binden zusammen an die Promotorregion des Foxp3-Gens und führen zur verstärkten Expression von Foxp3¹²⁷. Zudem ist IL-2-aktiviertes Stat5 für die Induktion der Foxp3-

Expression nötig¹²⁸. TGF- β und IL-2 sind also für die Differenzierung, das Überleben und die Funktion von T_{reg}-Zellen erforderlich.

3.2.4 T_H17-Zellen

T_H17-Zellen vermitteln Immunantworten gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze durch Rekrutierung von Neutrophilen Granulozyten und Makrophagen in entzündliches Gewebe⁶⁷. Sie sind auch an der Entstehung einiger organspezifischer Autoimmunerkrankungen beteiligt. Für diesen T_H-Zelltyp stellt das namensgebende IL-17 zudem das funktionell bedeutendste Effektorzytokin dar.

IL-17 gehört zu einer Familie von sechs Zytokinen und stellt deren Hauptrepräsentant dar. Zu dieser Familie gehören IL-17A (auch einfach IL-17 genannt), IL-17B, IL-17C, IL-17D, IL-17E (auch IL-25 genannt) und IL-17F. IL-17A wurde zunächst als CTLA-8 und dessen genetischer Code als Homolog eines Gens des Herpesvirus *saimiri* beschrieben. Erst mit der Entdeckung seines Rezeptors wurde es in IL-17 umgenannt¹²⁹. IL-17A und IL-17F werden genetisch durch die gleiche *Locus Control Region* (LCR) reguliert. Sie können sowohl einzeln oder zeitgleich exprimiert werden. Beide Zytokine binden an den IL-17RA, wobei IL-17A eine deutlich höhere Affinität aufweist¹³⁰. IL-17A induziert durch die Bindung an seinen Rezeptor in der Zielzelle unterschiedliche Entzündungszytokine, IL-6 und Chemokine wie IL-8 (CXCL8). IL-17A und IL-17F rekrutieren und aktivieren Neutrophile Granulozyten während einer Immunantwort gegen extrazelluläre Bakterien und Pilze. IL-17 bindet und funktioniert über seinen Rezeptor IL-17RA, der auf unterschiedlichen mesenchymalen Zellen, wie zum Beispiel Epithelzellen oder Endothelzellen oder Fibroblasten, exprimiert wird¹²⁹. IL-17RA aktiviert über das intrazellulär gebundene Adaptor-Protein ACT1 die Signaltransduktion via NF κ B und MAPK (*Mitogen Activated Protein Kinase*)¹³¹⁻¹³³. Eine aberrante IL-17-Expression wird mit Rheumatoider Arthritis, Systemischen Lupus Erythematoses, Asthma und Spenderorgan-Abstoßung in Verbindung gebracht¹³⁴. *In vitro* konnte eine Steigerung der Expression von CCL2, CCL7, CCL20, CXCL1, MMP1, MMP13 durch Maus-Fibroblasten nach IL-17-Stimulation gezeigt werden¹³⁵. IL-17RA-defiziente Mäuse zeigten zudem eine verminderte Abwehr gegenüber Mykobakterien, resultierend aus einer verminderten Produktion von G-CSF und CXCL2 im Lungengewebe¹³⁶.

T_H17-Zellen produzieren außer IL-17A und IL-17F noch die Zytokine IL-21, IL-22 und CCL20. IL-21 dient als stimulatorischer Faktor der T_H17-Zelldifferenzierung und als Mediator ihrer positiven Feedbackschleife¹³⁷. IL-22 wird über eine IL-6-vermittelte oder IL-23-vermittelte Stat3-Aktivierung in T_H17-Zellen produziert¹³⁸, während TGF- β diesen Effekt

unterdrückt. Für die Expression von IL-22 in T_H17-Zellen spielt der *aryl hydrocarbon receptor* (AhR), ein Dioxin-Rezeptor, eine wesentliche Rolle¹³⁹. IL-22 vermittelt eine IL-23-induzierte Akanthose sowie weitere Hautentzündungen. Es besitzt einen protektiven Effekt auf Hepatozyten während einer akuten Hepatitis¹⁴⁰ und ist in die Elimination von bakteriellen Pathogenen involviert¹⁴¹. Da weitaus mehr Zellen des angeborenen Immunsystems die Fähigkeit besitzen IL-22 zu produzieren, liegt nahe, dass die beschriebenen Effekte von IL-22 nicht T_H17-spezifisch sind. Hier wird zurzeit auch die Rolle einer eigenständigen T_H-Zelllinie der T_H22-Zellen diskutiert⁶⁸.

T_H17-Zellen exprimieren vor allem den Zytokinrezeptor IL-23R, sowie zusätzlich geringere Level von IL-1R1 und IL-18R α ¹⁴². Die Funktion des IL-18R α ist noch ungeklärt, könnte aber auf eine Verbindung zu T_H1-Zellreihe hinweisen, während IL-1R1 für die Produktion von IL-17 essentiell zu sein scheint¹⁴³. Die Chemokinrezeptoren CCR4 und CCR6 werden von T_H17-Zellen koexprimiert¹⁴².

Der Transkriptionsfaktor ROR γ t bewirkt eine Differenzierung von naiven T-Zellen zu T_H17-Zellen¹⁴⁴. Eine Überexpression von ROR γ t induziert die Produktion von IL-17, während ROR γ t-defiziente Zellen nur geringe Mengen an IL-17 produzieren können. In der Tat sind ROR γ t-defiziente Mäuse teilweise resistent gegenüber der Ausbildung einer Experimentelle Autoimmun-Enzephalitis (EAE), die als Maus-Modell der Multiplen Sklerose dient. Ein weiterer verwandter Rezeptor, ROR α , weist in T_H17-Zellen eine Überexpression auf¹⁴⁵. Obwohl die Deletion von ROR α einen minimalen Effekt auf T_H17-Zellen zeigt, wird durch eine kombinierte Deletion von ROR α und ROR γ t jegliche Produktion von IL-17 unterdrückt. Stat3 ist für die intrazelluläre Signaltransduktion von IL-6, IL-21 und IL-23 verantwortlich und für die Produktion von IL-17 unentbehrlich, sodass durch die Deletion von Stat3 ein Verlust von T_H17-Zellen resultiert¹⁴⁶. Auch die Expression von IL-23R ist von Stat3 abhängig. Neueste Forschungsergebnisse zeigen, dass der *interferon regulatory factor-4* (IRF-4) eine wesentliche Rolle bei der Differenzierung von T_H17-Zellen spielt¹⁴⁷. IRF-4-deletierte T-Zellen können kein IL-17 produzieren. EAE kann in IRF-4^{-/-} Mäusen nicht ausgelöst werden. IRF-4 scheint dabei wesentlich für die Expression von ROR γ t zu sein. Dem Transkriptionsfaktor ROR γ t in Maus-Zellen entspricht RORC2 in menschlichen Zellen und weist ebenfalls einen T_H17-induzierenden Effekt auf¹⁴⁸.

TGF- β ist für die Differenzierung von T_H17-Zellen wichtig. TGF- β 1-defiziente Mäuse besitzen keine T_H17-Zellen und sind gegenüber EAE resistent¹⁴⁹. IL-6 wird von TLR-aktivierten Zellen des angeborenen Immunsystems produziert. Die Kombination von TGF- β und IL-6 induziert eine T_H17-Differenzierung¹⁵⁰, die Produktion von IL-21 sowie die

Expression von IL-23R und ROR γ t. Dabei kann IL-21 die Rolle des IL-6 teilweise übernehmen und eine Amplifikation der IL-17-Antwort bewirken¹³⁷. IL-23 wurde zwar anfänglich als Differenzierungsfaktor für T_H17-Zellen diskutiert, konnte diesen Effekt allerdings in naiven CD4⁺ Maus-T-Zellen nicht aufweisen. Doch ist IL-23 wichtig für das Überleben und die Funktion von T_H17-Zellen¹⁵¹. Zurzeit besteht die Annahme, dass die T_H17-Immunantwort folgende drei Differenzierungsstufen durchläuft: Eine Initiationsstufe basierend auf IL-1 β und IL-6, eine Amplifikationsstufe vermittelt durch IL-21 sowie eine Stabilisierungsstufe aufrechterhalten durch IL-23. Auf allen drei Stufen ist zur Signaltransduktion Stat3 unentbehrlich¹⁴⁶. Die Rolle des TGF- β in der menschlichen T_H17-Zelldifferenzierung wird weiterhin kontrovers diskutiert^{150,152,153}.

3.2.5 Differenzierungsplastizität der T_H-Zellen

Die ersten Differenzierungsmodelle für T_H-Zellen gingen von einer strikten Zweiteilung zwischen T_H1- und T_H2-Zellen aus. Mit der Identifizierung weiterer, eigenständiger T_H-Zelltypen, wurde diese Dichotomie zu einem Differenzierungsmodell mehrerer paralleler Zelllinien, die unabhängig voneinander zu existieren schienen, erweitert. Nun ist ein weiterer bedeutender Umbruch im Verständnis der Differenzierungsmodelle zu beobachten. Mit der Möglichkeit der Entdifferenzierung und Umdifferenzierung innerhalb einer Zellgeneration entstehe eine Flexibilität, die evolutionstechnisch einer hohen Effizienz entspräche¹⁵⁴. Dies führt zu einem dynamischen Differenzierungsmodell, das eine Umdifferenzierungsmöglichkeit und eine hierarchische Gliederung mit unterschiedlichen Stabilitätsniveaus jeweiliger Zelllinien annimmt (Abb. 1). So wird hierfür postuliert, dass Zelltypen, die eine positive Rückkopplung bezüglich der eigenen Zelllinie aufweisen, eine relativ hohe Stabilität besäßen. Die Zelltypen wiederum, die sowohl diese positive Rückkopplung als auch eine inhibierende Rückkopplung gegenüber anderer Differenzierungswege aufweisen, zeigten eine höhere Stabilität¹⁵⁵. Die Rückkopplung ist parakrin und autokrin auf Zytokinebene sowie auf intrazellulärer Transkriptionsebene möglich. Am Beispiel von T_{FH} ist auch eine Inhibition der eigenen Zelldifferenzierung durch reziproke Hemmung auf Transkriptionsebene möglich, woraus die relative Instabilität dieser Differenzierungsreihe resultiert. Die T_H17-Zellen nehmen in diesem Modell einen Platz zwischen T_H1- und T_{reg}-Zellen ein^{156, 157}. Es wird derzeit auch mit Hilfe eines Computermodells die T_H-Zell-Differenzierung untersucht. Hierbei wird für die T_H17-Zellen ebenfalls eine enge Verbindung mit entr_e-Zellen beschrieben¹⁵⁸.

Ein Differenzierungsgleichgewicht wird mittels Zell-Zell-Kommunikation aufrechterhalten und gesteuert, Mal zu Gunsten dieses, Mal zu Gunsten jenes T-Zelltyps. Natürlich fließt in

diesem Gleichgewicht neben der Umdifferenzierung auch die *a priori* Differenzierung von naiven T-Zellen einher. Es ist aber auch bekannt, dass T-Zell-Klone nach drei bis vier Zellteilungen die Möglichkeit einer Umdifferenzierung verlieren und somit terminal differenziert sind.

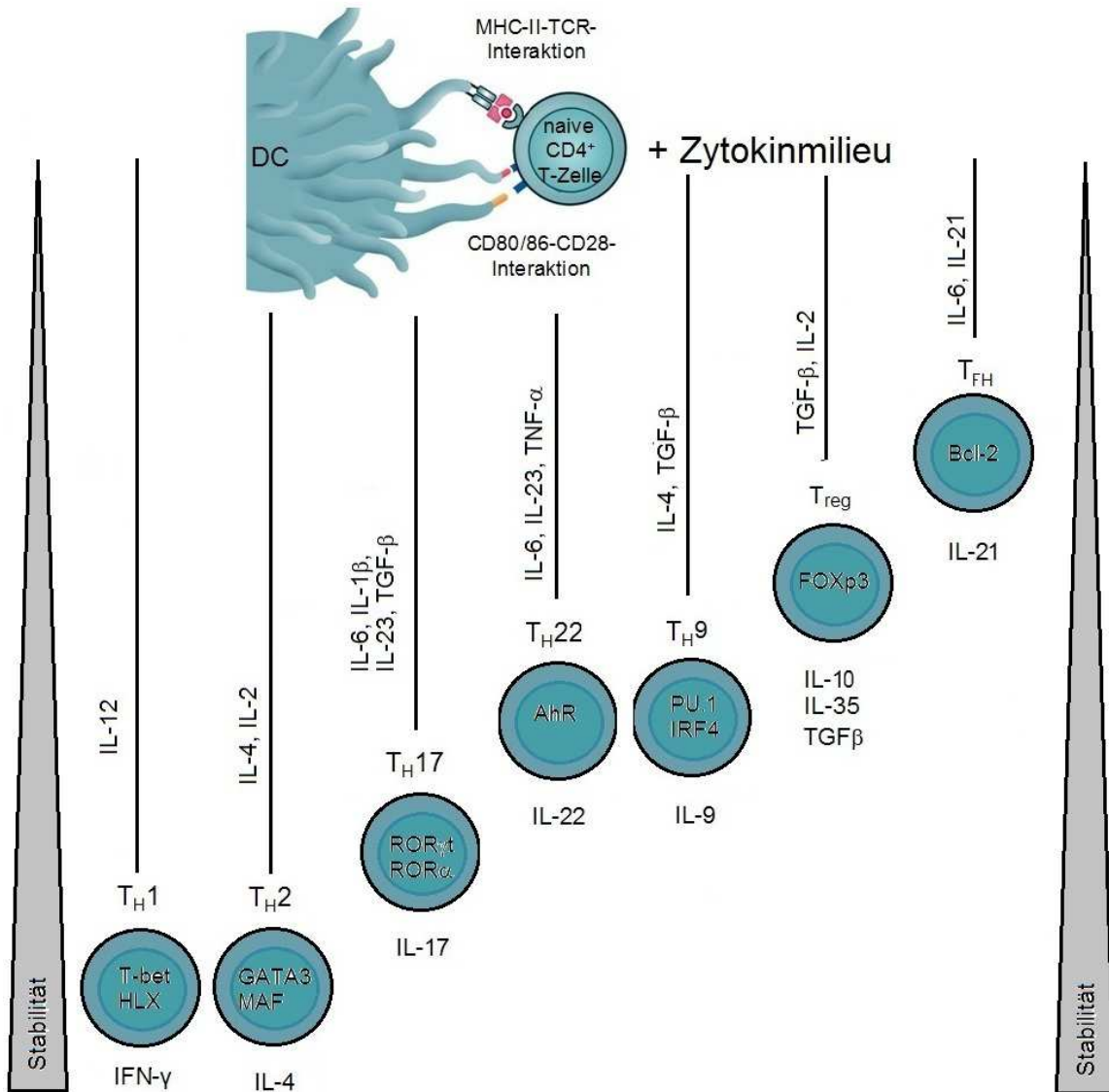


Abb.1: Plastisches Differenzierungsmodell von T_H-Zellen

3.3 Interaktion zwischen DC und T_H-Zellen

Zellen des Makrophagen-Monozyten-Systems vollziehen als Vertreter des angeborenen Immunsystems den primären Pathogen-spezifischen Kontakt zu Pathogenen im Gewebe. Über PRR erkennen sie Pathogen-Bestandteile und aktivieren eine PAMP-spezifische Signaltransduktionskaskade. Zur ihrer Aktivierung benötigen die DC zusätzlich eine inflammatorische Umgebung bestehend aus speziellen Gewebefaktoren, wie Chemokinen, Zytokinen, Eikosanoiden, Hitze-Schock-Proteinen oder Bestandteilen nekrotischer Zellen¹⁵⁹. Interessanterweise sind die DC nach Aktivierung in der Lage, selbst einige

solcher Faktoren zu produzieren. Durch Aktivierung der DC resultiert dann ein Pathogen-spezifisches Proteinbiosynthesemuster, das durch die Produktion von MHCII-Molekülen, kostimulatorischer Oberflächenmoleküle, Enzymen, Chemokinen, Zytokinen sowie deren Rezeptoren umgesetzt wird.

Nach Aktivierung und Bindung von Antigen an MHCII-Moleküle gelangen diese spezialisierten APC geleitet von Chemotaxis zu Keimzentren von sekundären lymphatischen Organen. Hier treten sie als aktivierte Antigen-beladene DC in Kontakt mit naiven T-Zell-Klonen verschiedener TCR. Antigen-beladene MHCII-Moleküle binden aber nur den passenden TCR eines naiven CD4⁺ T-Zell-Klons mit einer so hohen Affinität, dass die Aktivierung der T-Zelle stattfinden kann. Diese Kontaktstelle wird in Anlehnung an die Zell-Zell-Interaktion von Neuronen auch „immunologische Synapse“ genannt. Während des Kontakts dienen die molekularen Verbindungen von CD40/CD40L, CD80/CD28, CD86/CD28, ICOS-L/ICOS (auf DC/auf CD4⁺) als kostimulatorische Faktoren¹⁶⁰. Zusätzlich produzieren die APC ein Pathogen-spezifisches Zytokinmuster, das für die Direktion der T-Zell-Antwort eine entscheidende Rolle spielt. Der besagte T-Zell-Klon wird aktiviert und je nach Stimulismuster in eine unterschiedliche T-Zell-Differenzierungslinie dirigiert. Die klonal-vervielfältigte und differenzierte Effektor-T-Zelle bildet nun mit ihrem Antigen-spezifischen TCR den Hauptakteur des adaptiven Immunsystems, indem sie ihre Differenzierungslinien-spezifische Funktion ausübt.

3.4 Ziel dieser Arbeit

Potentielle Pathogene aus unserer Umwelt werden erst durch Ausfälle unseres Abwehrsystems und der Barriere zu Pathogenen, zuvor sind es apathogene Substanzen oder Lebewesen. Auch unter Abwesenheit von potentiellen Pathogenen kann unser Immunsystem durch Missregulation seine Funktionen auf unterschiedliche Weise verlieren und sogar eigene Zellen und eigenes Gewebe angreifen. Das menschliche Immunsystem vermittelt also ein Spektrum von Toleranz bis Intoleranz gegenüber Fremdem sowie Eigenem.

Immer spielt die Kommunikation zwischen den einzelnen Akteuren unseres Immunsystems dabei eine wesentliche Rolle. Eine Ansammlung von Akteuren wird erst durch deren Kommunikation miteinander zu einer effektiven Gemeinschaft. Je fehlerfreier diese Kommunikation funktioniert, desto wirkungsvoller ist die Gemeinschaft in ihrer Funktion. Nun ist die immunologische Kommunikation derzeit noch nicht vollständig erforscht und verstanden. Vereinfacht besteht jede Kommunikation aus mindestens einer Information und mindestens einem Medium zur dessen Übermittlung. Die Zellen des

Immunsystems kommunizieren untereinander mittels Oberflächenmolekülen, Zytokinen, Chemokinen, Hormonen und deren Rezeptoren. Funktioniert eines der Kommunikationsmedien nicht, sei der Fehler angeboren oder erworben, kommt es zu einer Verschiebung des Gleichgewichtes und es resultiert eine immunologische bzw. infektiologische Erkrankung.

Eines der wichtigsten Punkte während einer erfolgreichen Immunantwort ist der Kontakt zwischen dem angeborenen und adaptiven Immunsystem, die Aktivierung der T_H-Zellen durch APC. APC übermitteln hierbei mittels Oberflächenproteinen und Zytokinen Informationen über die ursprünglichen Spezifitäten des Erregers. Die naive T-Zelle reagiert auf die Information nach einem vorprogrammierten Ablauf mit einer spezialisierten Antwort, indem sie zu einem auf den Erreger spezialisierten T-Zelltyp differenziert und proliferiert. Hier entscheidet sich maßgeblich die Art der Immunantwort und die Immunität des Organismus gegenüber einem Pathogen.

Nach Zusammenschau der bis zum aktuellen Zeitpunkt veröffentlichten Forschungsergebnisse bezüglich der T_H-Zelldifferenzierung wurde in dieser Arbeit die Direktion der T_H-Zellantwort durch TLR-aktivierte APC untersucht. Hierbei interessierte einerseits die Pathogen-spezifische Aktivierung von APC über TLR sowie andererseits das dirigierende Zytokinprofil der aktivierten APC hinsichtlich der möglichen T-Zellantworten mit besonderem Fokus auf die T_H17-Differenzierung. Aufgrund der beschriebenen T_H17-Funktionen wurden TLR-Liganden von extrazellulären Bakterien eingesetzt, um MoLC bzw. MoDC zu aktivieren. In diesem Modell stellen MoLC das Äquivalent von LC der Haut dar, während MoDC die peripheren DC des menschlichen Blutes repräsentieren.

Zu Anfang dieser Arbeit bestand die Aufgabe herauszufinden, welche TLR-Aktivierung in DC zu einer Sekretion der T_H17-dirigierenden Zytokine IL-6, IL-1 β , IL-23 und TGF- β führt und ob dieser Effekt mittels TLR-Blockung inhibierbar ist. Außerdem war die Expression der Aktivierungsmarker HLA-DR, CCR7 und CD83 nach TLR-Stimulation auf DC von Interesse. Um einen direkten Effekt des TLR-Stimulus auf naive CD4⁺ Zellen auszuschließen, wurden Versuche in Abwesenheit von DC mit MicroBeads durchgeführt. Es wurde untersucht ob naive CD4⁺ Zellen tatsächlich in der Lage sind in Kokulturen mit TLR-aktivierten DC das Zytokin IL-17 zu exprimieren und zu sezernieren.

Auch wurde ein durch unsere Arbeitsgruppe vorbeschriebener Unterschied zwischen TLR-aktivierter MoLC und MoDC hinsichtlich der T_H17-Direktion geprüft. Da unterschiedliche Arbeitsgruppen bei ihren Analysen der T_H17-Differenzierung externe Zytokinzugaben

verwenden, wurde in dieser Arbeit auch der Effekt einer externen IL-6- und TGF- β -Zugabe zu den Kokulturen von naiven CD4⁺ Zellen mit TLR-aktivierten DC bezüglich einer IL-17-Sekretion analysiert.

Auf nahezu allen aktivierten T-Zellen wird CD25 exprimiert, dabei stellen die T_{reg}-Zellen mit einer konstitutiven Expression und hoher Rezeptordichte eine Besonderheit dar¹¹⁶. Es wurde hier nun untersucht, ob ausschließlich CD4-isolierte T-Zellen, positiv isolierte CD4⁺CD25⁺ und negativ isolierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen bezüglich einer IL-17-Sekretion einen Unterschied aufweisen. Um die Rolle der vorbeschriebenen T_H17-dirigierenden Zytokine IL-6, IL-1 β , IL-23 und TGF- β während einer TLR2-stimulierten T_H17-Direktion zu verifizieren, wurden Versuchsansätze mit Zytokin-neutralisierende Antikörper durchgeführt. Anschließend wurde untersucht, ob tatsächlich mittels anti-TLR2-Antikörper die IL-17-Sekretion inhibierbar ist.

In dieser Arbeit sollten Forschungsergebnisse erzielt werden, welche unter anderem Erklärungen zu immun-physiologischen sowie immun-pathologischen Abläufen während einer T_H17-Zellantwort bieten.

Um die Funktionsweisen des Immunsystems verständlich zu machen, müssen die Kommunikationswege zwischen den Akteuren sowie Kommunikationsfehler und dessen Auswirkungen weiter erforscht werden. Erst dann können wir Wege suchen um gezielt in diese Kommunikation einzugreifen, Fehler zu beheben und das Gleichgewicht wiederherzustellen. Ziel der immunologischen Grundlagenforschung ist es eines Tages die „Sprache“ des menschlichen Immunsystems zu verstehen und dazu überzugehen das Verstandene zu verwenden um Leid zu lindern.

Diese Arbeit soll seinen kleinen Teil zur Vervollständigung unseres Einblickes in die Komplexität des menschlichen Immunsystems beitragen. Doch ist, je größer unsere Wissenssammlung wird, die Einheit des einzelnen Wissenszuwachses desto kleiner und spezieller, sodass der Wert dieser Arbeit sich erst durch die Verwendung ihrer Ergebnisse zur weiteren Forschung ergibt.

4. Material und Methoden

4.1 Substanzen und Lösungen

In den folgenden Kapiteln 2.1.1 bis 2.1.5 sind alle häufig verwendeten Lösungen, Nährmedien, Medienzusätze, Zytokine, Antikörper und TLR-Stimuli tabellarisch aufgeführt. Deren Zusammensetzungen laut Herstellerangaben werden parallel aufgelistet. Materialien, die für einzelne Methoden benötigt wurden, sind unter den jeweiligen Punkten näher beschrieben. Die bei den Methoden aufgeführten Konzentrationsangaben beziehen sich, wenn nicht anders angegeben, auf die Endkonzentration im Versuchsansatz.

4.1.1 Lösungen/Medien/Medienzusätze

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung/Hersteller</i>
RPMI 1640 BioWhittaker	mit Ultraglutamin 1, Lonza, Verviers Belgien
Penicillin	Biochrom, Berlin
Streptomycin	Biochrom, Berlin
Fötale Kälberserum (FCS)	Biochrom, Berlin
Phythämagglutinin (PHA)	
Histopaque-1077	Dichtegradient aus 5,7 g/dl Ficoll (Typ400, Sucrose Polymer) und 9,0 g/dl Natriumdiatrizoat, Sigma, Deisenhofen
FACSClean	BD Pharmingen, Heidelberg
FACSRinse	BD Pharmingen, Heidelberg
FACSFlow	BD Pharmingen, Heidelberg
DPBS (Phosphat-gepufferte Saline, pH 7,2-7,4)	1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 2,7 mM KCL, 8,1 mM Na ₂ HPO ₄ , 137 mM NaCl
DPBS/BSA	5 g/l Rinderserumalbumin (BSA) in DPBS
DPBS/BSA/Natriumazid (FACS-Puffer)	0,01 % NaH ₃ in DPBS/BSA
DPBS/BSA/EDTA (MACS-Puffer)	2 mM EDTA in DPBS/BSA
DPBS/Tween (Waschpuffer)	DPBS, 0,05 % Tween-20
Fixierungs-Reagenz 2 % und 18,5 %	DPBS-Puffer mit 2 % bzw. 18,5 % Paraformaldehyd (w/v), pH 7,0
Permeabilisierungs-Puffer	FACS-Perm-Solution (BD), 1:10 in Aqua dest.
TBS-Puffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl
TBST-Puffer	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05 % Tween-20

4.1.2 Zytokine

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung/Hersteller</i>
rekombinantes GM-CSF (GM-CSF)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
rekombinantes IL-1 β (IL-1 β)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
rekombinantes IL-2 (IL-2)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
rekombinantes IL-4 (IL-4)	ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
rekombinantes IL-6 (IL-6)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
rekombinantes TGF- β 1 (TGF- β)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
rekombinantes IFN- γ (IFN- γ)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt

4.1.3 Antikörper zur FACS-Färbung

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung/Hersteller</i>
CD4-APC (RPA-T4)	InvivoGen, San Diego, USA
Langerin-PE (CD207, DCGM4)	Coulter, Krefeld, Deutschland
IFN- γ -APC (25723.11)	BD Biosciences, Heidelberg
IL-17A-PE (eBio64DEC17)	eBioscience, Frankfurt
CD83-PE (HB15e) mIgG1	BD Pharmingen, Heidelberg
CCR7 (2H4) mIgM	BD Pharmingen, Heidelberg
IgG1-Isotyp (MOPC-21)	BD Pharmingen, Heidelberg
IgG2b-Isotyp (27-35)	BD Pharmingen, Heidelberg
Anti-IgM-Biotin (G20-127) mIgG1	BD Pharmingen, Heidelberg
Streptavidin-Allophycocyanin (Sav-APC-Konjugat)	BD Pharmingen, Heidelberg
HLA-DR-FITC/PE (B8.12.2) mIgG2b	Coulter, Krefeld
Anti-Biotin-Antikörper	MicroBeads-konjugiertes IgG1, Bio3-18E7, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

4.1.4 Blockierende Antikörper

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung/Hersteller</i>
Anti-IL-6 (6708)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-IL-1 β (8516)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-TGF- β (1D11)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-IL-23 p19 (AF1716)	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Anti-TLR2 (T2.5)	InvivoGen, San Diego, USA

4.1.5 TLR-Stimuli

<i>Bezeichnung</i>	<i>Zusammensetzung/Hersteller</i>
Ultra-pure <i>S. minnesota</i> LPS (LPS)	TLR4-Ligand, InvivoGen, San Diego, USA
Flagellin aus <i>B. subtilis</i> (Flagellin)	TLR5-Ligand, InvivoGen, San Diego, USA
Peptidoglykan (PGN) aus <i>S. aureus</i>	TLR2-Ligand, Sigma-Aldrich Chemie GmbH Buchs, Schweiz
MALP2	Axxora, Lörrach, Deutschland
Endotoxin-freie bakterielle DNA (DNA)	TLR9-Ligand, InvivoGen, San Diego, USA
Poly(I:C)	TLR3-Ligand, InvivoGen, San Diego, USA
ssPolyU/LyoVec (PolyU)	TLR8-Ligand, InvivoGen, San Diego, USA
Pam ₃ CSK ₄ (Pam ₃)	TLR1/2-Ligand, InvivoGen, San Diego, USA
Pam ₂ CSK ₄ (Pam ₂)	TLR2/6-Ligand, InvivoGen, San Diego, USA
Gardiquimod	TLR7-Ligand, InvivoGen, San Diego, USA
CpG	TLR9-Ligand, InvivoGen, San Diego, USA
M-Tri _{DAP}	NOD1/2-Ligand, InvivoGen, San Diego, USA
Muramyldipeptid (MDP)	NOD2-Ligand, InvivoGen, San Diego, USA
BD CaliBRITE PerCP-Cy5.5 Beads	BD Pharmingen, Heidelberg
BD CaliBRITE APC Beads	BD Pharmingen, Heidelberg
BD CaliBRITE 3 Beads	BD Pharmingen, Heidelberg

4.2 Geräte, Instrumente und Kits

Im Folgenden sind alle Geräte, Instrumente und Versuchskits, die in den Experimenten benutzt wurden, aufgelistet.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Kühlschrank (4 °C), Gefrierschrank (-20 °C)	Privileg, Deutschland
Tiefkühlschrank (-80 °C)	Heraeus Instruments, USA
Wasserbad	Köttermann Labortechnik, Deutschland
Sterile Gewebekultur-Schalen (6 cm ø)	Cellstar Greiner, Frickenhausen, Deutschland
Sterile 12-, 24-, 48-, 96-Napf Platten	Costar, Corning Inc., NY, USA
Sterile 2ml-, 5ml-, 10ml-, 25ml-Pipetten	Costar, Corning Inc., NY, USA
Sterile 15ml-, 50ml-Zentrifugen-Röhrchen	Costar, Corning Inc., NY, USA
Sterile 100ml-, 250ml-Zellkulturflaschen	Costar, Corning Inc., NY, USA
Sterile Pipettenspitzen(0,1-10µl; 1-200µl; 100-1000µl)	Costar, Corning Inc., NY, USA
Sterile Multistep-Pipettenspitzen(5ml, 25ml)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Eppendorf-Pipetten(2,5µl; 10µl; 20µl; 200µl; 1000µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Accu-Jet Pipettierhilfe	Brand, Deutschland
Stepmate Multistep-Pipette	Scilogex LCC., Berlin, USA
Megafuge 1.0R Zentrifuge	Heraeus
Biofuge pico Zentrifuge	Heraeus
Labovert-Mikroskop	Leitz, Weztlar, Deutschland
Stericult 200 Incubator Brutschrank	Forma Scientific
Bench	BDK, Sonnenbühl-Genkingen, Deutschland
Vortex Genie 2	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Counter Z1 Zellzähler	Coulter Electronics, England, U.K.
Mini-, Midi-MACS (Magnetischer Zell-Separator)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS-Selektionssäulen (LS, Large Cell Separation Columns, MS)	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS-Separationsfilter	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
23G Kanüle	BD Pharmingen, Heidelberg
MACS Dead Cell Removal Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Diamond Plasmacytoid Dendritic Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS Monocyte Isolation Kit II	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS CD1c ⁺ Dendritic Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS CD4 ⁺ T Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS CD25 MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland
MACS CD1c MicroBeads	Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland

	Deutschland
BD Via Probe Cell Viability Solution	BD Biosciences, Heidelberg
Human IL-4 DuoSet ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human MMP-9 DuoSet ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human CCL1 DuoSet ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human IL-12 p70 DuoSet ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human CCL4 DuoSet ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human TNF- α DuoSet ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human IL-17 DuoSet ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human IL-6 DuoSet ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human IL-1 β DuoSet ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human TGF- β 1 DuoSet ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human IFN γ DuoSet ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human IL-4 DuoSet ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Human IL-21 ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience, San Diego, USA
Human IL-23 ELISA Ready-SET-Go!	eBioscience, San Diego, USA
Human IL-23 Quantikine ELISA-Kit	R&D Systems, Wiesbaden-Nordenstadt
Columbus Pro ELISA-Washer	Tecan, Grödig, Österreich
EMax precision microplate reader	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
96-Napf ELISA-Platten	Nunc, Dänemark
The Belly Dancer	Storall Life Science, Greensboro, North Carolina, USA
FACS-Calibur	Durchflusszytometer, BD Pharmingen, Heidelberg
Apple-PC G4	Apple, Macintosh, USA
Windows-PC	Microsoft, USA

4.3 Computer-Programme

Mit den unten aufgeführten Computer-Programmen und -Betriebssystemen wurden Daten gesammelt und verarbeitet.

<i>Bezeichnung</i>	<i>Hersteller</i>
Elisa-Reader Programm, Softmax Pro	Molecular Devices, Sunnyvale, USA
BD CellQuest Pro Version 5.2.1	Analyse-Software, BD Pharmingen, Heidelberg
Microsoft Office 2007	Microsoft, USA
Microsoft Internet Explorer 6.0	Microsoft, USA
Microsoft Windows XP Professional	Microsoft, USA
Apple Macintosh	Apple, USA

4.4 Isolierung, Zählung, Stimulation und Kultur von Zellen

Jede Arbeit mit menschlichen Zellenreihen wurde unter der *Bench* durchgeführt, um Kontaminationen weitestgehend vorzubeugen. *Buffy-Coat*-Konserven von gesunden Spendern wurden ohne vorangegangene Lymphozytenfiltration vom Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes Wannsee-Heckeshorn, Berlin, bezogen.

MoDCs, MoLCs und T-Zellen wurden in RPMI 1640 kultiviert. Dieses Medium wurde mit 100 U/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin und mit 10 % FCS versetzt. Komplementproteine im FCS für die Zellkultur wurden zuvor bei 56 °C für 40 min hitzeinaktiviert. Primäre Zellen und Zelllinien wurden in separaten Brutschränken unter üblichen Bedingungen (37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit) inkubiert. Zur Bestimmung der Zellzahl in Suspensionen wurde das vollautomatische Counter Z1 der Firma Coulter Electronics eingesetzt. Es basiert auf der elektronischen Pulsflächenanalyse und erlaubt die Messung von Zellzahl sowie tot/lebend-Unterscheidung anhand der Zellgröße mit einer Messgenauigkeit von 0,1 µm. Die zu messende Probe wurde zunächst 1:1000 in PBS verdünnt, der zu erwartende Größenbereich gewählt (für PBMC/MoLC/MoDC > 10 µm, für CD4⁺ Zellen > 7 µm) und die gemessene Zellkonzentration (pro ml) über das LCD-Display ausgegeben.

4.4.1 Isolierung von PBMC

Beim Blutspendedienst werden aus Citrat-Phosphat-Dextrose-Adenin(CPDA)-stabilisiertem Vollblut nach Zentrifugation aufgrund von Dichteunterschieden Plasma und Erythrozytenkonzentrat abgetrennt und beide Fraktionen zurückbehalten. Die Leukozyten- und Thrombozyten-reiche Zwischenschicht einer Blutspende wird als *Buffy-Coat* in einen separaten Satellitenbeutel aufgefangen und für Forschungszwecke dem Abnehmer zur Verfügung gestellt.

Nach Eingang wurde die *Buffy-Coat*-Spende in 50 ml Röhrrchen überführt und direkt bei 400 g zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette vorsichtig von dem roten Pellet am Boden getrennt. Durch diese dem Gradienten vorausgehende Zentrifugation können große Anteile der Erythrozytenpopulation bereits abgetrennt werden.

Die Dichte des Gradienten entspricht mit 1,077 g/ml der von mononukleären Leukozyten des peripheren Bluts (*peripher blood mononuclear cytes*, PBMC), so dass Zellen aufgrund ihrer unterschiedlichen Dichte¹⁶¹ durch das Natriumdiatrizoat getrennt werden können. Außerdem verbinden sich Granulozyten und Erythrozyten während der isopyknischen Zentrifugation mit der hochpolymeren Methylzellulose des Ficolls und sedimentieren als schwere Aggregate am Röhrrchenboden. Nach Zentrifugation kann die PBMC-Zellpopulation in der Phase zwischen dem darüber geschichteten Plasma und dem Erythrozyten-Pellet darunter gewonnen werden. Hierzu wurden die *Buffy-Coat*-Zellen 1:2 (v:v) mit PBS vermischt, jeweils 25 ml der Zellsuspension vorsichtig auf 15 ml Gradient im 50 ml Röhrrchen aufgeschichtet und zentrifugiert (800 g, 20 min bei Raumtemperatur ohne Bremse). Die leukozytenhaltige Intermediärschicht wurde als weißliche Interphase mit der

10 ml Pipette aus der Dichtegradientenschicht vorsichtig abpipettiert. Diese Population der PBMC wurde in PBS (4 °C) überführt, zentrifugiert (400 g, 10 min, mit Bremse) und anschließend mehrfach bei 260 g thrombozytenfrei gewaschen. Die Pellets wurden zuletzt vereinigt und in PBS mit 10 % FCS resuspendiert. Die Zellen wurden gezählt und nur Präparationen mit normaler Anzahl an PBMC wurden weiterverarbeitet.

4.4.2 Isolierung von Monozyten

Monozyten aus dem Blut als Ausgangspopulation für die Generierung Dendritischer Zellen können über ihre Eigenschaft, auf unphysiologischen Oberflächen festzuhaften, gewonnen werden. Dafür wurde die Anzahl der Monozyten in den PBMC durch Auszählung dunkler, größerer Zellen nach 10 min in der Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

In Gewebekultur-Schalen wurden 5×10^6 adhärenente Zellen in Medium mit 10 % FCS ausgesetzt. Für die aktive Adhärenz auf der Plastikoberfläche wurden die Monozyten unter wiederholter Bewegung der Schalen für 40 min bei 37 °C inkubiert. Wenn sich Zellen auf der Oberfläche angeheftet hatten, was durch eine mikroskopische Kontrolle gesichert wurde, wurde die Gewebekultur-Schale in schräger Position aufgestellt¹⁶².

Um ein Trockenfallen der adhärenenten Zellen zu vermeiden, wurde die Schale durch mittelstarken Pipettenstrahl mit 50 ml/Schale warmen Mediums gespült und gleichzeitig der Überstand mit einer zweiten Pipette abgesaugt. Zeigten sich in der optischen Kontrolle keine kontaminierenden T- und B-Zellen mehr, wurde je 5 ml Medium mit 10 % FCS zu den Zellen gegeben und diese im Brutschrank inkubiert.

4.4.3 Generierung von CD1c⁺ MoDCs und MoLCs

Monozyten haben außer der Kompetenz, in Zellkultur durch den Einsatz von Humanserum oder M-CSF zu Makrophagen zu differenzieren, auch die Fähigkeit, Dendritische Zellen zu generieren. Dabei spielen die beiden Zytokine GM-CSF und IL-4 (oder IL-13) eine entscheidende Rolle^{25, 29}. Bei dieser Konversion verlieren die Zellen in der Zellkultur charakteristischerweise das CD14-Antigen und verstärken die Expression von MHC-Klasse-II-Molekülen. Nach sechs Tagen Kultur sind Zellen eines unreifen DC-Phänotyps differenziert. Dieser Zelle wird die terminal differenzierte Dendritische Zelle gegenübergestellt. Dieser Phänotyp reifer Dendritischer Zellen kann *in vitro* durch Inkubation der unreifen MoDC mit dem Medium von Monozytenkulturen generiert werden. Dieser Monozytenüberstand enthält die Zytokine TNF- α , IL-1 β , IL-6 und IFN α ¹⁶³. Nach einem etablierten Protokoll können unreife Dendritische Zellen nach zwei Tagen Kultur mit IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE₂ zu reifen MoDC differenzieren¹⁶⁴.

Für die Differenzierung von MoDC wurde den adhärennten Monozyten in der Gewebekultur-Schale 100 ng/ml GM-CSF und 10 ng/ml IL-4 ergänzt. An Tag 2 und 4 wurden 2 ml Medium von Schalen abgesaugt und 3 ml frisches Medium mit 100 ng/ml GM-CSF zugegeben. An Tag 6 wurden die nun nicht mehr adhärennten Zellen mit dem Mediumüberstand abgenommen, gewaschen und in den Experimenten eingesetzt.

LC-ähnliche Zellen (MoLC) können *in vitro* wie unreife Dendritische Zellen aus Monozyten generiert werden. Neben GM-CSF und IL-4 wird zusätzlich TGF- β 1 zugesetzt¹⁶⁵. Unter dem Einfluss dieses Zytokins kann eine Zellpopulation differenziert werden, die Birbeck Granulae besitzt sowie Langerin exprimiert. Bei der Generierung von MoLC wurden zusätzlich 10 ng/ml TGF- β 1 in das Kulturmedium gegeben.

Für direkte Vergleiche wurden in einigen Experimenten CD1c⁺ Zellen aus der Gesamtpopulation der MoLCs bzw. MoDCs an Tag 6 mittels Biotin-markiertem Anti-CD1c-Antikörper und *Microbeads*-konjugiertem Anti-Biotin-Antikörper durch MACS positiv isoliert. Zur Kontrolle der Zelldifferenzierung wurde nach der Zytokinkultur die Expression des Monozytenantigens CD14, des von Dendritischen Zellen hochregulierten Moleküls HLA-DR und des LC-spezifischen Langerin-Antigens im Durchflusszytometer gemessen.

4.4.4 Stimulation der APC und TLR-Blockade

Nach 6 tägiger Kultivierung von MoLC und MoDC wurden diese Zellen mit RPMI/FCS von den Gewebekulturplatten gewaschen und gezählt. Sie wurden nach Anzahl der geplanten Versuchsreihen auf Napfplatten mit 10⁶ Zellen/ml aufgeteilt und, wie folgt, mit unterschiedlichen Stimuli aktiviert.

Die Zellen wurden entweder mit 20 μ g/ml PGN, mit 500 ng/ml LPS, mit 1 μ g/ml Pam₃, mit 0,1 μ g/ml Pam₂, mit 5 μ g/ml Poly(I:C), mit 5 μ g/ml DNS, mit 5 μ g/ml PolyU, mit 0,1 μ g/ml Flagellin, mit 5 μ g/ml CpG, mit 1 μ g/ml Gardiquimod oder mit 0,05 μ g/ml MALP-2 für 48 h stimuliert. Danach wurde der Kulturüberstand unverdünnt aus den Nöpfen abgenommen, zellfrei gewaschen und für die Analyse im ELISA direkt verwendet oder bei -80 °C weggefroren. Die Pellets aus diesem Waschschrift wurden mit den in den Nöpfen verbliebenen Zellen vereint, vollständig aus den Nöpfen zurückgewonnen und wiederum gezählt.

In einigen Versuchen wurden MoLCs vor Stimulation für 0,5 h entweder mit einem Anti-TLR2-Antikörper (T2.5) oder mit einem Kontrollisotypen (MOPC-21) inkubiert. Hierbei wurden in anfänglichen Versuchen die Konzentrationen des TLR2-Antikörpers zum funktionellen Vergleich in steigender Reihenfolge angesetzt.

4.4.5 Isolierung von CD4⁺ T-Zellen und CD25-Separierung mittels MACS

Nach Zählung der PBMCs wurden alle weiteren Arbeitsschritte in Eiswasser bei 4-8 °C durchgeführt, um eine optimale Bindung der Antikörper an die Zellen zu gewährleisten. Der verwendete Antikörpermix, die Microbeads-Antikörper, der Magnet und die Trennsäule sind Bestandteile des MACS Cell Isolation Kit. Die notwendigen Mengenverhältnisse von Puffer, Antikörperlösung und Zellzahl wurden den Herstellerangaben entsprechend angewandt.

Die Zellen wurden in MACS-Puffer gelöst, 200 µl Hapten-Antikörper-Cocktail/10⁸ Zellen hinzugegeben und 10 min kalt inkubiert. Dieser Mix enthält unterschiedliche Antikörper (gegen CD8, CD11b, CD16, CD19, CD36 und CD56), die mononukleäre Zellen aus humanem Blut markieren (Monozyten, NK-Zellen, zytotoxische T-Zellen, B-Zellen, unreife Erythrozyten, Thrombozyten, Dendritische oder basophile Zellen). Diese unterschiedlichen Antikörper sind mit Biotin-Hapten markiert, an das weitere Antikörper binden können, die auf eisenhaltigen magnetischen Kügelchen (sog. Microbeads) sitzen. Man erhält so ein Konglomerat aus Microbeads und mononukleären Zellen. Es folgt ein weiterer Waschschrift, um freie Antikörper zu entfernen. Dann wird die Zellsuspension auf eine Trennsäule gegeben, die in einem starken Magnetfeld positioniert wird. In der Säule werden die markierten Zellen festgehalten, während die unmarkierten CD4⁺ Zellen als Negativ-Fraktion ausgewaschen werden können. Die erhaltenen CD4⁺ Zellen wurden erneut gezählt, in Zellmedium (RPMI 1640 mit 5% Penicillin/Streptomycin) suspendiert und im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ gelagert.

In parallelen Zellkulturansätzen wurden Viabilität (PI) sowie Spezifität der Isolierung (CD4) beurteilt, indem diese in Zellkultur optisch mittels Mikroskop geprüft wurden und zudem mittels FACS die Fähigkeit der T-Zell-Population, nach Stimulation mit dem polyklonalen Mitogen Phythämagglutinin (5 µg/ml) zu proliferieren, getestet wurde.

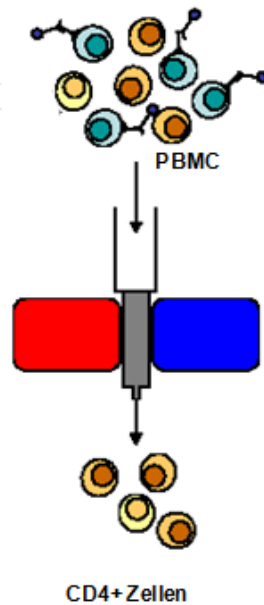


Abb. 2: Schema der CD4-Zellisolation mittels MACS

Zur Isolierung von $CD4^+CD25^+$ und $CD4^+CD25^-$ T-Zellen wurden in gesonderten Versuchsansätzen nach der oben beschriebenen CD4-Isolierung die gewonnenen $CD4^+$ T-Zellen für 15 min in 90 μ l MACS-Puffer und mit 10 μ l Anti-CD25-MicroBeads je 10^7 Zellen bei 4 °C inkubiert. Nach ausführlichem Waschen wurden die Zellen in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert. Für die Selektion wurde eine MS-Säule in einen MiniMACS-Magneten gehängt. Die Suspension wurde auf die Säule gegeben und die $CD25^-$ Fraktion aufgefangen. Die $CD25^+$ T-Zellen wurden aus der Säule entfernt und in ein getrenntes Gefäß eluiert, indem die Säule aus dem Magnetfeld herausgenommen wurde und mit MACS-Puffer unter Verwendung des Stempels mehrmals gespült wurde.

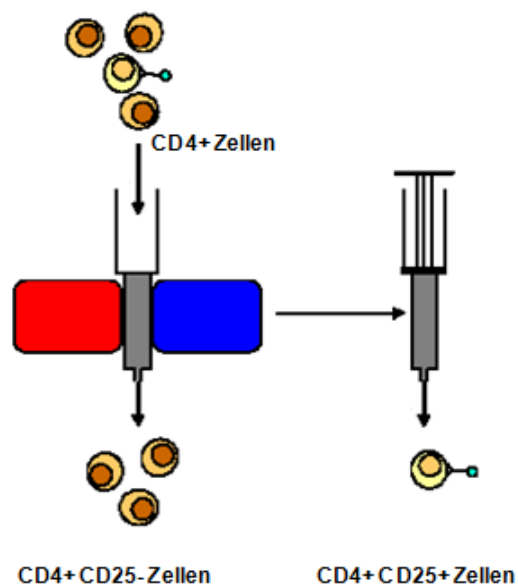


Abb. 3: Schema der Isolierung von $CD25^+$ Zellen aus der $CD4^+$ Population mittels MACS

4.4.6 Kokultur

Nach zweitägiger Stimulation der MoLCs oder MoDCs wurden auf 96-Napf Rundbodenplatten $2,5 \times 10^4$ allogene MoLCs bzw. MoDCs in 50 μ l RPMI/FCS vorgelegt. In weiteren 200 μ l RPMI/FCS wurden $2,5 \times 10^5$ naiven $CD4^+$ T-Zellen dazugegeben. Als Kontrollen dienten Ansätze, die nur stimulierte MoLCs bzw. MoDCs, nur $CD4^+$ T-Zellen mit MicroBeads enthielten. Die Kokulturen wurden als Triplikate angesetzt und für fünf Tage bei 37 °C und 5 % CO_2 inkubiert. Danach wurde der Mediumüberstand unverdünnt aus den Nöpfen abgenommen, zellfrei gewaschen und für die Analyse im ELISA direkt verwendet oder bei -80 °C weggefroren.

Die Zell-Pellets aus diesem Waschschrift wurden in RPMI/FCS resuspendiert, gezählt und für FACS-Färbungen genutzt.

4.5 ELISA (*enzyme linked immuno sorbent assay*)

Mit dieser Methode kann die Konzentration von Proteinen gemessen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden die Konzentrationen der Zytokine IL-17, IL-6, IL-1 β , IL-4, IL-23, IL-12p70, TGF- β und IFN γ im Zellkulturüberstand der Stimulationsansätze oder der Kokulturen bestimmt. Für sämtliche durchgeführten ELISA kam das DuoSet ELISA Development System der Firma R&D Systems zum Einsatz. Die Überstände wurden gewonnen, indem die Zellsuspension nach Stimulation oder Kokultur 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert wurde.

Das Prinzip der Methode wird im Folgenden kurz erläutert: Mittels des *Capture*-Antikörpers, der gegen eine spezielle Struktur (Epitop) im zu untersuchende Protein gerichtet ist, wird das Protein am Boden der Reaktionsplatte festgehalten. An ein anderes Epitop des festgehaltenen Proteins bindet der *Detection*-Antikörper, welcher mit Streptavidin markiert ist. An das Streptavidin kann ein weiterer Antikörper anhaften, der das Enzym *Horsereddish-Peroxidase* trägt. Dieses Enzym bewirkt eine chemische Reaktion, die quantitativ an der Verfärbung (hier Cyan) einer zuvor klaren Indikatorlösung abgelesen werden kann.

Am Vorabend der Versuche wurden die Reaktionsplatten mit 100 μ l/Napf des *Capture*-Antikörpers versetzt, der gegen das gesuchte Protein gerichtet ist. Dieser heftet sich während der nächtlichen Inkubation am Boden der Platte an. Die einzusetzenden Konzentrationen richten sich nach dem zu messenden Protein und finden sich in den Anleitungen der Firma R&D. Am nächsten Morgen wurden die Reaktionsplatten mit einem Waschpuffer unter Verwendung des Plattenwaschautomaten Columbus-Pro gespült. Danach wurde jeder Napf mit 300 μ l Blockpuffer für eine Stunde gefüllt, um später

unspezifische Bindungen von Antikörpern zu verhindern. In der Zwischenzeit wurde eine Verdünnungsreihe (von 0 bis 1000 pg/ml, in 8 Stufen) des zu untersuchenden Proteins in *Reagent Diluent* angesetzt. Diese Reihe diente später als Standardreferenz für die quantitativen Messungen. Nachdem der Blockpuffer ausgewaschen worden war, wurden je 100 µl Standard bzw. zu bestimmende Proben aufgetragen. Danach wurde die Platte zwei Stunden bei Raumtemperatur ruhen gelassen und dann erneut gewaschen. Dann folgte die Zugabe von 100 µl *Detection*-Antikörper, der ebenfalls zwei Stunden inkubiert wurden. Die ungebundenen Antikörper wurden wiederum ausgewaschen und es wurde der enzymmarkierte Antikörper zugegeben, für weitere zwanzig Minuten ruhen gelassen und anschließend ausgewaschen. Nun erfolgte die Zugabe eines farblosen Indikator-Gemisches (v/v) aus 50 % H₂O₂ und 50 % Tetramethylbenzidin. Das Enzym *Horsereddish-Peroxidase* wandelt dieses Gemisch in einen stark gefärbten Komplex um. Diese Reaktion wurde nach zwanzig Minuten durch Zugabe einer kleinen Menge Schwefelsäure (2 N, 50 µl) unterbrochen. Daraufhin konnte die Platte mit einem ELISA-Plate-Reader bei einer Wellenlänge von 450 nm und einer Referenzwellenlänge von 570 nm photometrisch ausgewertet werden.

4.6 Färbemethoden für FACS (*Fluorescence activated cell sorting*)

Nach vorausgehender Blockierung der F_c-Rezeptoren auf den Zielzellen mittels 50 µl Blockpuffer (bestehend aus PBS mit 10% humanem Serum) auf 10⁵ Zellen für 10 min auf Eis, wurden die Zellen in FACS-Puffer gewaschen und resuspendiert, während die eigentliche Färbung der zu untersuchenden Oberflächenmoleküle (z.B. CD4) mit den Fluorchrom-konjugierten Antikörpern vorbereitet wurde. Zunächst wurden die Antikörperverdünnungen für den folgenden Schritt in jeweiliger Konzentration (wie vom Hersteller beschrieben) vorbereitet. Dann wurden in allen Versuchsansätzen 10 µl der jeweiligen Antikörperverdünnung pipettiert. Die Zellsuspensionen wurden mittels Vortexer im FACS-Röhrchen geschleudert und anschließend für 45 min auf Eis ohne direkte Lichteinstrahlung inkubiert. Danach wurden 10⁵/ml Zellen in FACS-Puffer resuspendiert und zweimal bei 260 G, 4° C und 4 min zentrifugiert und gewaschen. Nach dem letzten Waschschrift wurde das Zellpellet in 500 µl FACS-Puffer resuspendiert und anschließend sofort gemessen.

Beim Einsatz biotinylierter Antikörper wurden nach der Antikörperinkubation und den Waschschriften die Zellen in 50 µl FACS-Puffer mit 0,5 µg/ml Streptavidin-APC 30 min lang inkubiert. Anschließend wurden sie in FACS-Puffer ein letztes Mal gewaschen und zur Messung verwendet.

Für die intrazelluläre Färbung hingegen wurden die Zellen in den Kokulturen zunächst für 4 h mit 5 ng/ml TPA und 500 ng/ml Ionomycin unter Zugabe von 1 µg/ml Brefeldin A vorbereitet. Dabei simulieren TPA und Ionomycin die Stimulation von T-Zellen über eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration, sodass die T-Zellen unabhängig von Differenzierungsgrad und -richtung angeregt werden. Brefeldin A, eine aus Pilzen extrahierte Substanz, hemmt die Funktion des endoplasmatischen Retikulums und des Golgi Apparates, sodass produzierte Zytokine nicht sezerniert werden und sich in den Zellen anreichern. Anschließend wurde die Zytokinsekretion der Zellen mit Fixierungsreagenz, das durch Denaturierung und Präzipitation von Struktur- und Funktionsproteinen die Zellen fixiert, gestoppt. Daraufhin wurden die Zellen dann 20 min mit dem Permeabilisierungspuffer, der die Zellwand durch Tenside für die Farbe-Antikörper permeabilisiert, behandelt. Schließlich erfolgte die intrazelluläre Färbung mit den jeweiligen Fluoreszenzfarbstoff-Antikörpern für 30 min abgedunkelt auf Eis.

Für jede FACS-Messreihe wurden Isotyp-Färbungen zum Vergleich und zur Kontrolle durchgeführt. Jede Isotyp-Messung diente auch zum Einstellen der FACS-Messfenster auf eine bestimmte Zellpopulation (z. B. T-Zellen) innerhalb der gefärbten Mischpopulation. Das voreingestellte Messfenster wurde für die restlichen FACS-Messungen derselben Messreihe verwendet.

4.7 Durchflusszytometrie (FACS)

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS, *Fluorescence activated cell sorting*) können Zellen anhand ihrer Lichtstreuungseigenschaften und anhand emittierter Fluoreszenzstrahlung auf Einzelzellebene charakterisiert werden. Je nach verwendetem Gerät können derzeit bis zu 13 Parameter (wie beim FACSAria, BD) gleichzeitig bestimmt werden. Die Zellen werden hierbei mit monoklonalen Antikörpern, die direkt oder über sekundäre Antikörper an Fluoreszenzfarbstoffe gekoppelt sind, wie oben beschrieben markiert und passieren in einem konzentrierten Flüssigkeitsstrom nacheinander Laserstrahlen unterschiedlicher Wellenlänge. Dabei werden die Fluorochrome zur Emission von Fluoreszenzlicht angeregt; zusätzlich streuen die Zellen das auftreffende Laserlicht. Das in einem geringen Winkel (3° bis 10° bzw. 183° bis 190°) gestreute Licht wird als Vorwärtsstreulicht (FSC) bezeichnet und korreliert in erster Näherung mit der Zellgröße. Das in einem Winkel um 90° reflektierte Licht wird als Seitwärtsstreulicht (SSC) bezeichnet und korreliert mit der Granularität und der Membranfaltung der Zelle. Das von den verschiedenen Fluorochromen emittierte Fluoreszenzlicht wird durch Teilerspigel und farbselektive Bandpassfilter in Fluoreszenzspektren aufgetrennt und gelangt dann auf

photosensitive Detektoren, sog. Photomultiplier. Im verwendeten Analysegerät FACSCalibur stehen drei Sensoren für 530 nm (Fluoreszenzkanal: FL1), 585 nm (FL2) und >650 nm (FL3) für den ersten Laser (Argon, 488 nm) zur Verfügung. Über einen zweiten Dioden-Laser (635 nm) kann ein weiteres Fluoreszenzparameter mit einer anderen Anregungswellenlänge zur Verfügung gestellt werden (FL4: 670 nm). Nach Verstärkung wird das optische Signal zunächst in elektrische Ströme und schließlich in ein digitales Signal umgewandelt. FSC- und SSC-Signale werden in linearer, die Fluoreszenz-Signale in logarithmischer Verstärkung aufgenommen.

Die Auswertung der Messungen erfolgte mit der CellQuest Pro Research Software. Die Daten wurden als zweidimensionale Punkt-Diagramme (*dot-plots*) dargestellt. In den Punktdiagrammen repräsentiert jeder Punkt eine Zelle. Durch das Setzen von Analysefenstern (*gates*) kann die Expressionsanalyse auf bestimmte Zellpopulationen beschränkt werden.

4.8 Statistische Auswertung

Mittelwerte, Standardabweichungen und statistische Signifikanzen wurden mit Hilfe von SigmaPlot (SPSS) berechnet. Für die Analyse von Differenzen zwischen experimentellen Gruppen wurde der *student's t test* benutzt.

5. Ergebnisse

Für eine aussagekräftige *in vitro* Untersuchung der T_H17-Zell-Differenzierung wurde ein Versuchsmodell verwendet, das die zeitliche Abfolge der physiologischen Ereignisse während einer Immunantwort der Haut gegen Bakterien näherungsweise berücksichtigt. Es wurden aus Leukozyten verschiedener Spender Monozyten isoliert und 5 Tage lang aus ihnen unterschiedliche Populationen von *Monocytes-derived Langerhans-like Cells*(MoLC) und *Monocytes-derived Dendritic Cells*(MoDC) generiert. Diese Populationen wurden dann mit TLR-Liganden stimuliert und nach weiteren zwei Tagen mit CD4⁺ naiven T-Zellen, mit CD4⁺CD25⁺ T-Zellen oder mit CD4⁺CD25⁻ T-Zellen kokultiviert. Das Verhältnis von APC zu T-Zellen wurde während aller Versuche initial auf 1:10 eingestellt. Nach einer fünf-tägigen Kokultur wurden mit Hilfe von ELISA sowie intrazellulärer FACS-Färbung die Zytokin-Sekretion und -Expression untersucht. Die Versuche wurden mehrmals mit DC und T_H-Zellen verschiedener Spender wiederholt und die Ergebnisse anschließend in Diagrammen zusammengefasst.

In dieser Studie konnten gezeigt werden, dass PGN-stimulierte CD1c⁺ MoLC IL-6, IL-1 β , IL-23 und TGF- β sezernieren. Unstimulierte MoLC hingegen sezernieren keine signifikanten Mengen an IL-6, IL-1 β und IL-23. TGF- β wird hingegen unabhängig von der Stimulation sezerniert. CD4⁺ T-Zellen sezernieren in Kokultur mit PGN-stimulierten MoLC bzw. MoDC IL-17 und IFN γ , jedoch kein IL-4. In MoLC-Kokultur erreichen CD4⁺ T-Zellen eine höhere IL-17-Konzentration als in MoDC-Kokultur. Während die Zugabe von TLR2-Liganden zu MoLC in CD4⁺25⁻ T-Zellen zu einer relativ hohen IL-17-Produktion führt, konnte eine wenn auch geringe Abnahme für naive CD4⁺ und CD4⁺CD25⁺ T-Zellen beobachtet werden. Im FACS ließen sich IFN γ ⁺IL-17⁺ T-Zellen und eine Erniedrigung von IL-17 nach Zugabe von Anti-IL-1 β , Anti-IL-6 und Anti-IL-23 nachweisen. Es konnte gezeigt werden, dass die Blockade von TLR2 auf PGN-stimulierten MoLC die Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu T_H17-Zellen vermindern kann.

5.1. TLR-stimulierte MoLC sezernieren IL-6, IL-1 β , IL-23 und TGF- β

Als Grundlage weiterführender Versuche wurde das Zytokinmuster von MoLC nach Stimulation unterschiedlicher TLR untersucht. Die Untersuchungen beschränkten sich hierbei auf die Zytokine IL-6, IL-1 β , IL-23 und TGF- β , welche als essenziell für die T_H17-Differenzierung gelten. Phänotypisch homogene, Langerin-exprimierende, von Monozyten abgeleitete Langerhanszellen (MoLC) wurden mittels CD1c-MACS (CD1c⁺ MoLC) angereichert. Diese Zellen wurden für 48 h mit PGN, MALP2, LPS, bakterieller DNA, polyI:C und polyU zur Aktivierung von TLR2, TLR4, TLR9, TLR3 und TLR8 stimuliert.

Mittels ELISA-Analysen der Zellkulturüberstände konnte gezeigt werden, dass die TLR2-Liganden PGN und MALP2 in MoLC eine IL-6-, IL-1 β - und IL-23-Sekretion induzieren (Abb. 4). PGN konnte hierbei die stärkste IL-1 β -Sekretion hervorrufen. Die spontane Sekretion von TGF- β wurde jedoch durch keinen der obengenannten Stimuli signifikant beeinflusst. Weiterhin wurde beobachtet, dass bakterielle DNA, Poly(I:C) und PolyU eine geringe Stimulation der Sekretion von IL-6 bewirken. MoLC sezernieren nach Stimulation mit Poly(I:C) vergleichsweise geringe Mengen an IL-1 β .

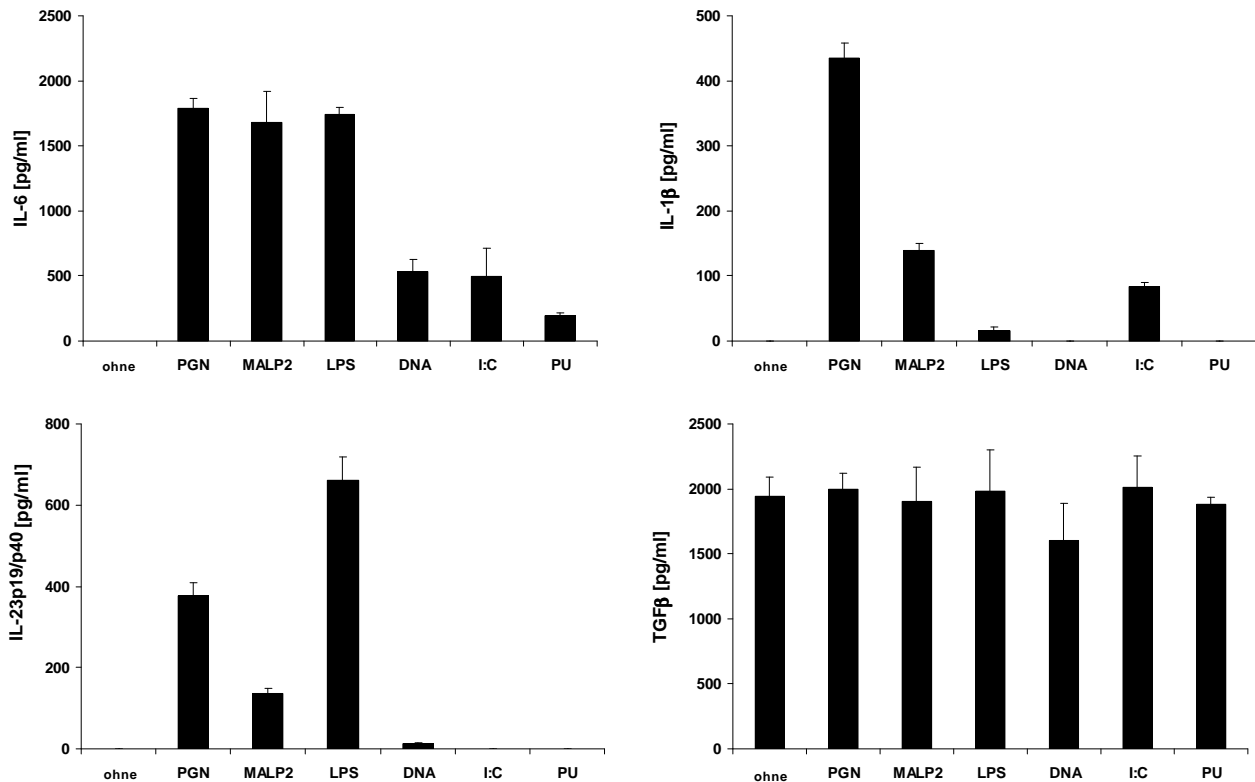


Abb. 4: TLR-stimulierte CD1⁺MoLC sezernieren T_H17-induzierende Zytokine. Aus menschlichem Blut wurden MoLC nach Depletion von CD14⁺ Zellen in einer Zellkultur mit GM-CSF, IL-4 und TGF- β generiert und anschließend mit Hilfe von CD1c-MACS isoliert. Diese Zellen wurden 48 h mit PGN, MALP2, LPS, bakterieller DNA, Poly(I:C) (I:C) und PolyU (PU) stimuliert, um sie über TLR2, TLR2/6, TLR4, TLR9, TLR3, TLR8 zu aktivieren. Eine Population verblieb zur Kontrolle ohne Stimulus (ohne). Mit Hilfe von ELISA wurden die Überstände auf IL-6, IL-1 β , IL-23p19 und TGF- β untersucht. Die Balken stellen Mittelwerte \pm Standardabweichungen von je vier unabhängigen Experimenten dar.

5.2 IL-6, IL-1 β und IL-23 werden TLR2- abhängig freigesetzt, TGF- β jedoch nicht

Während TLR2-Liganden eine signifikante Freisetzung von IL-6, IL-1 β , IL-23 und TGF- β induzierten, wurde analysiert, ob dieser Effekt durch einen TLR2-blockierenden Antikörper hemmbar ist. Vor der Stimulation der CD1c⁺ MoLC mit PGN wurde TLR2 durch sättigende Konzentrationen des Antikörpers T2.5 geblockt. Es konnte gezeigt werden, dass die Sekretion von IL-6, IL-1 β und IL-23 gehemmt wird, während TGF- β TLR2 unabhängig freigesetzt wird (Abb. 5).

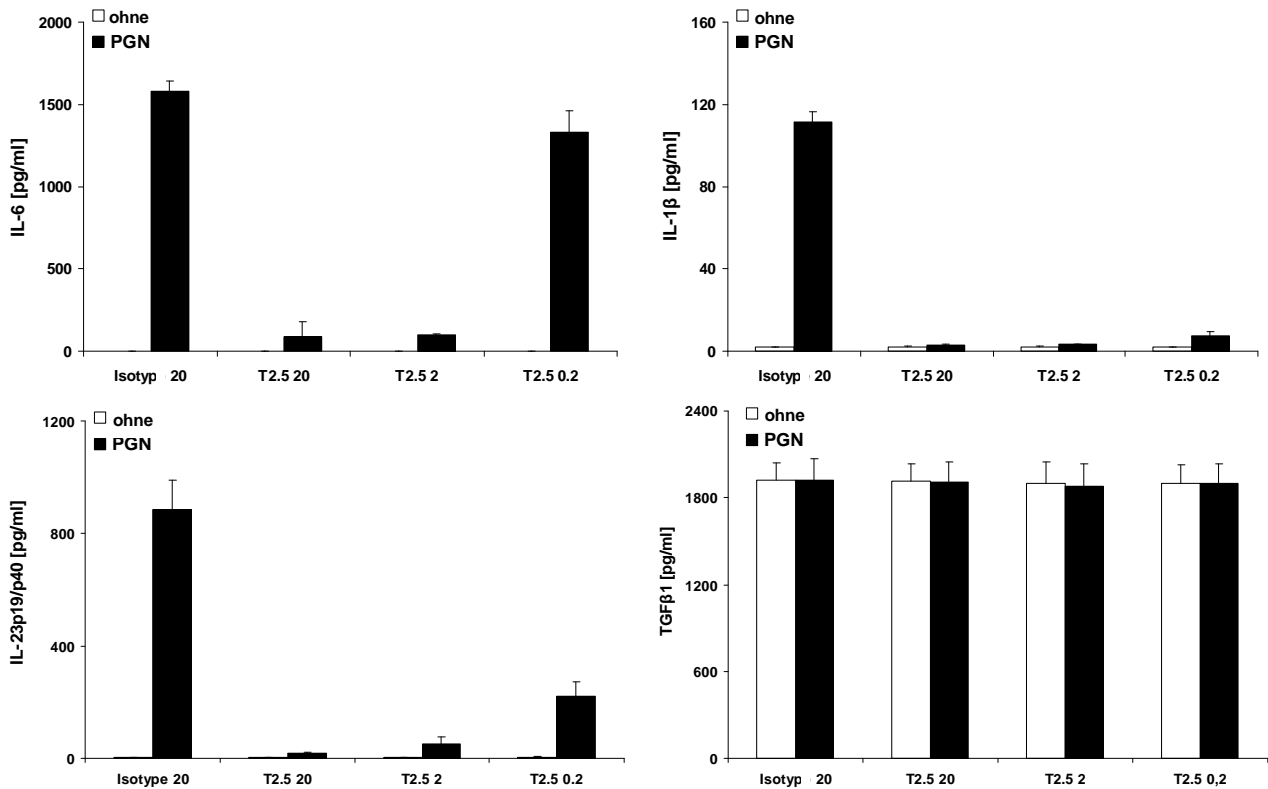


Abb. 5: Anti-TLR2 blockiert die Sekretion von IL-6, IL-1 β und IL-23p19, aber nicht von TGF- β .

CD1c-isolierte MoLC wurden über 0,5 h mit 20 μ g/ml, 2 μ g/ml und 0,2 μ g/ml eines monoklonalen Anti-TLR2-Antikörpers (T2.5) oder zur Kontrolle mit 20 μ g/ml eines Isotyp-IgG1 (MOPC-21) inkubiert. Anschließend wurde eine Population der CD1c⁺ MoLC mit 20 μ g/ml PGN über 48 h stimuliert, während die zweite Kontrollpopulation ohne Stimulus (ohne) verblieb. Mit Hilfe von ELISA wurde in den Zellkultur-Überständen IL-6, IL-1 β , TGF- β und IL-23p19 nachgewiesen. Die Säulen stellen Mittelwerte \pm Standardabweichung von drei Zellkulturen verschiedener Spender dar.

5.3 HLA-DR, CD83 und CCR7 Expression auf MoLC nach TLR2-Stimulation

MoLC exprimierten HLA-DR unabhängig von TLR2-Stimulation. Der Anteil an CCR7⁺ MoLC steigt nach PGN-Stimulation von 5 % bis auf 25 %, während der Anteil an CD83⁺ MoLC einen Wert von 92 % erreichte (Abb. 6). Die CCR7- und die CD83-Expression nach PGN-Stimulation ließen sich durch vorangehender Inkubation mit Anti-TLR2-Antikörper geringfügig hemmen.

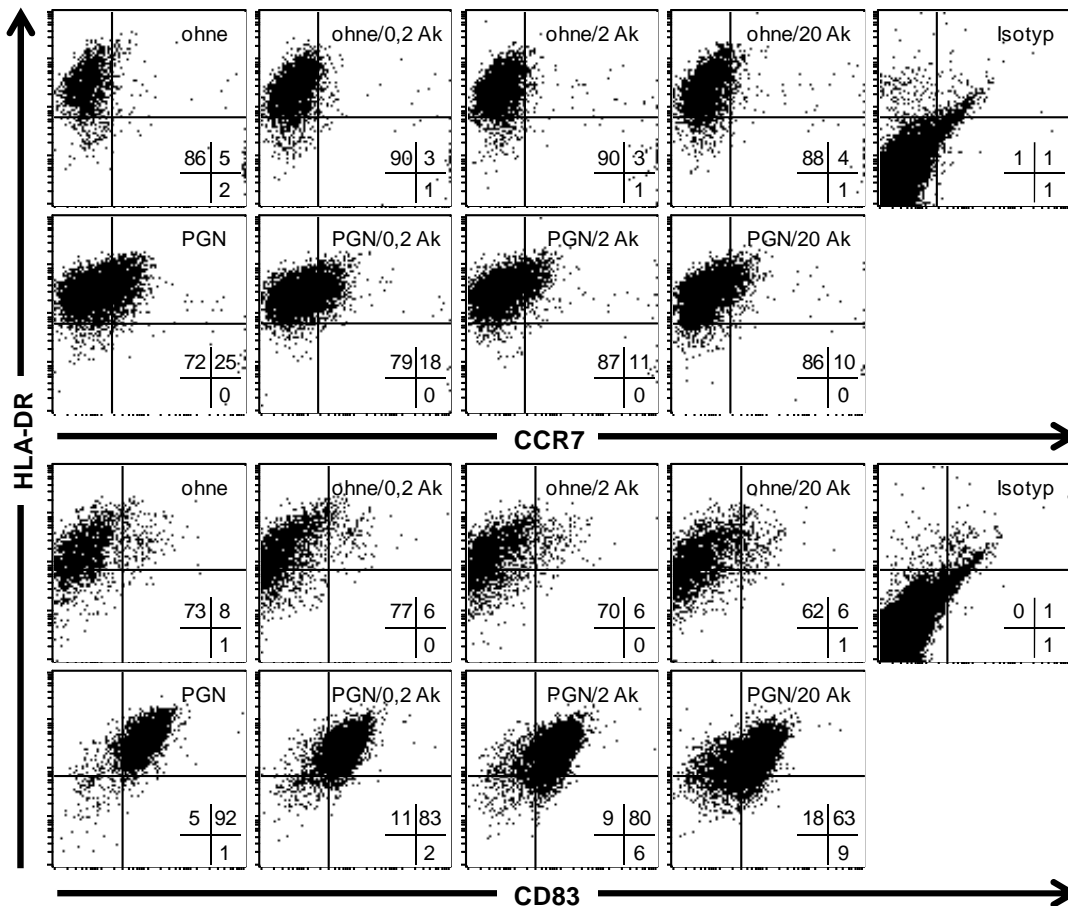


Abb. 6: Expression von Oberflächenmolekülen nach TLR2-Stimulation und TLR2-Block.

CD1c⁺ MoLC wurden über 0,5 h mit 0,2 µg/ml, 2 µg/ml bzw. 20 µg/ml eines monoklonalen Antikörpers gegen TLR2 präinkubiert. Daraufhin wurden die Zellen auf je zwei Populationen aufgeteilt, von denen eine 48 h mit 20 µg/ml PGN stimuliert wurde. Die Zellen wurden nach Markierung mit FITC- und PE-gekoppelten Antikörpern gegen HLA-DR, CCR7 und CD83 durchflusszytometrisch analysiert. Die *Dot-Plot*-Diagramme sind mit einem anhand der Isotypfärbung geeichten Koordinatenkreuzes in vier Quadranten geteilt. Die oberen beiden Quadranten zeigen die HLA-DR⁺, die unteren beiden HLA-DR⁻ Ereignisse. In den beiden rechten Quadranten sind CCR7⁺ bzw. CD83⁺ Ereignisse und in den beiden linken Quadranten sind CCR7⁻ bzw. CD83⁻ Ereignisse aufgezeichnet. Die Zahlenwerte (in %) stehen gerundet für den prozentualen Anteil der Zellen im jeweiligen Quadranten. Die *Dot-Plot*-Diagramme zeigen zwei unterschiedliche repräsentative Färbungen eines Versuches, der viermal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt wurde.

5.4 CD4⁺ T-Zellen benötigen für die Differenzierung zu T_H17-Zellen unter TLR-Stimulation weitere Signale von Dendritischen Zellen

Um eine autonome Differenzierung von CD4⁺ T-Zellen zu T_H17-Zellen durch TLR-Stimulation in Abwesenheit von Dendritischen Zellen auszuschließen, wurden direkt nach der CD4⁺ T-Zell-Isolation diese Zellen mit PGN beziehungsweise mit Anti-CD3-/Anti-CD28-gekoppelten *MicroBeads* stimuliert (Abb. 7). Während PGN-stimulierte CD4⁺ T-Zellen in Abwesenheit von Dendritischen Zellen kein IL-17 produzierten, konnten wir in den Ansätzen, die mit Anti-CD3-/Anti-CD28-gekoppelten *MicroBeads* aktiviert wurden, eine relativ starke intrazelluläre IL-17-Expression nachweisen.

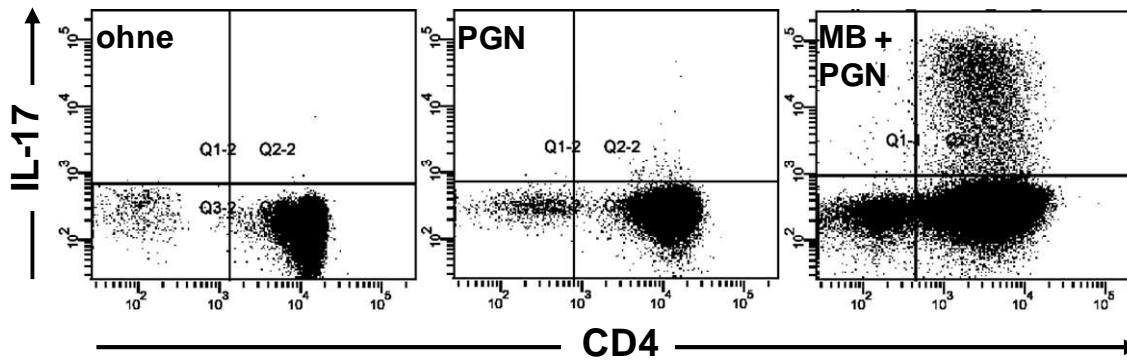


Abb. 7: Intrazelluläre IL-17-FACS-Färbung und Extrazelluläre CD4-FACS-Färbung.

Naive $CD4^+$ T-Zellen wurden nach Isolation 5 Tage mit $20 \mu\text{g/ml}$ PGN und Anti-CD3-/Anti-CD28-gekoppelten *MicroBeads*(MB) stimuliert. Die Zellen wurden intrazellulär (Anti-IL-17) und extrazellulär (Anti-CD4) mit PE- und APC-konjugierten Antikörpern gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Punktdiagramme zeigen die Expression von CD4 und IL-17 und stellen drei Experimente mit ähnlichen Ergebnissen von unterschiedlichen Spendern dar.

5.5 TLR2-aktivierte MoLC induzieren IL-17 und $\text{IFN}\gamma$, aber kein IL-4 in $CD4^+$ T-Zellen

Es wurde herausgefunden, dass unstimulierte $CD1c^+$ MoLC in Kokultur mit $CD4^+$ T-Zellen im gleichen Maße IL-17⁺ Zellen induzieren, wie LPS-stimulierte $CD1c^+$ MoLC. Es ließ sich jedoch in den mit LPS stimulierten Ansätzen eine Zunahme der $\text{IFN}\gamma$ -Expression nachweisen. Im Vergleich dazu waren TLR2-Liganden, wie PGN und Pam₃, im Stande eine starke T_H17 -Antwort zu hervorzurufen. Interessanterweise stieg in diesen Stimulationsreihen auch die Anzahl an $\text{IFN}\gamma^+$ Zellen moderat an (Abb. 8).

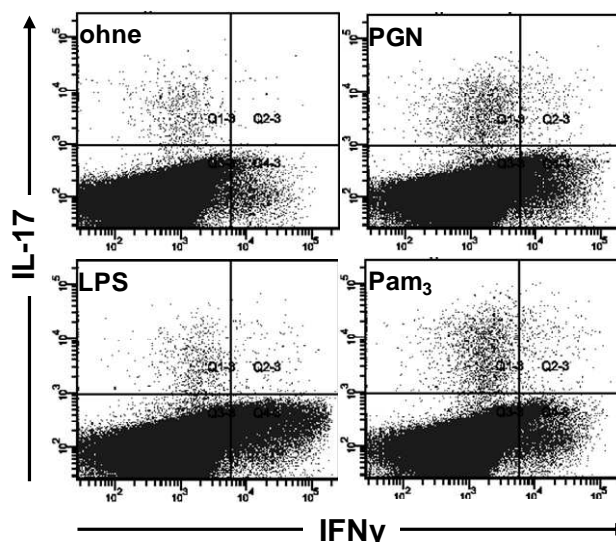


Abb. 8: Intrazelluläre IL-17- und $\text{IFN}\gamma$ -FACS-Färbung von $CD4^+$ in Kokultur mit stimulierten MoLC.

$CD1c^+$ MoLC wurden mit $20 \mu\text{g/ml}$ PGN, mit $1 \mu\text{g/ml}$ LPS oder mit $1 \mu\text{g/ml}$ Pam₃ über 48 h stimuliert und daraufhin gründlich gewaschen. Stimulierte und unstimulierte $CD1c^+$ MoLC wurden 5 Tage mit naiven $CD4^+$ T-Zellen kokultiviert. Die Zellen wurden gewaschen, intrazellulär mit FITC- und APC-konjugierten Antikörpern gegen IL-17 und $\text{IFN}\gamma$ gefärbt und anschließend im Durchflusszytometer analysiert. Die Punktdiagramme zeigen die intrazelluläre Expression der Zytokine und stellen drei Experimente mit ähnlichen Ergebnissen von unterschiedlichen Spendern dar.

Zur Untersuchung, ob MoLC nach Aktivierung via TLR2 und durch Sekretion von polarisierenden Zytokinen eine T_H17-Antwort hervorrufen, wurden IL-17, IFN γ und IL-4 in Kokulturüberständen von MoLC mit naiven CD4⁺ T-Zellen gemessen. CD1c⁺ MoLC und CD1c⁺ MoDC wurden vom selben Spender isoliert und generiert. Die Zellgruppen wurden je in zwei Populationen aufgeteilt, von denen eine über 48 h mit 20 μ g/ml PGN stimuliert wurde. Nach dem Waschen der Zellen wurden Kokulturen mit naiven CD4⁺ T-Zellen angesetzt. Die naiven CD4⁺ T-Zellen wurden zuvor durch eine CD4⁺ MACS-Depletion aus den Leukozyten eines Spenders isoliert. Nach 5 Tagen wurden die Überstände auf T_H1-, T_H2- und T_H17-typischen Zytokine untersucht. Um ein möglichst naturgetreues System zu etablieren und reine Zellinteraktionen zu untersuchen, wurde ein Stimulationsprotokoll verwendet, welches keine externen T-Zell-Signale, blockierende Antikörper oder einen Zusatz von IL-2 bzw. anderen Zytokinen beinhaltet. CD4⁺ T-Zellen produzierten in Kokultur mit TLR2-aktivierten MoLC bzw. MoDC die Zytokine IL-17 und IFN γ (Abb. 9). Im Vergleich von MoLC- und MoDC-Kokulturen zeigte sich eine Veränderung des IL17:IFN γ -Verhältnisses zu Gunsten von IL-17 für CD4⁺ T-Zellen in Kokultur mit MoLC. In diesen Kokulturen waren sogar die absoluten Höchstwerte der gemessenen IL-17-Konzentrationen höher. Nicht-stimulierte MoLC beziehungsweise MoDC führten in CD4⁺ T-Zellen zwar zur Freisetzung von IFN γ , jedoch nicht von IL-17. In keinem der Fälle konnten wir das T_H2-Zytokin IL-4 nachweisen.

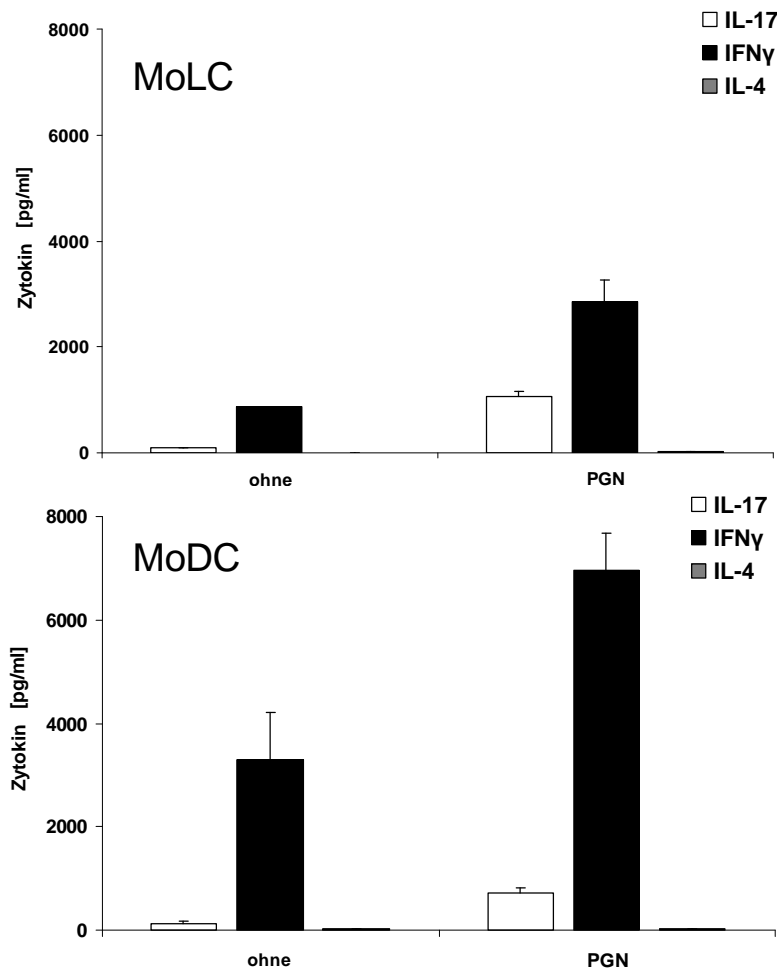


Abb. 9: Sekretion von IL-17, IFN γ und IL-4 durch T-Zellen aus Kokultur mit TLR2-aktivierten MoLC und MoDC.

CD1c⁺ MoLC (oben) und CD1c⁺ MoDC (unten) wurden vom selben Spender isoliert und generiert. Die Zellen wurden je in zwei Populationen aufgeteilt, von denen eine über 48 h mit 20 μ g/ml PGN stimuliert wurde. Nach dem Waschen der Zellen wurden Kokulturen mit naiven CD4⁺ T-Zellen angesetzt. Die naiven CD4⁺ T-Zellen wurden zuvor durch eine CD4⁺MACS-Depletion aus den Leukozyten eines Spenders isoliert. Die Säulen repräsentieren die Sekretion von IL-17 (weiß), IFN γ (schwarz) und IL-4 (grau) aus den Überständen dieser Kokulturen nach 5 Tagen. Sie stellen den Mittelwert \pm Standardabweichung von vier unabhängigen Spendern dar.

5.6 Zusatz von externem IL-6 und TGF- β verringert die Sekretion von IL-17

Es wurde untersucht, ob der externe Zusatz von IL-6 und TGF- β die Sekretion von IL-17 durch T_H17-Zellen verändern kann. Interessanterweise ergab sich, dass die Fähigkeit der CD4⁺ T-Zellen zur Sekretion von IL-17 mit externem Zusatz der Zytokine IL-6 und TGF- β in Kokultur mit MoLC bzw. MoDC, die mit LPS, PGN, Pam₂ oder Pam₃ stimuliert wurden, sinkt. Im Gegensatz dazu hatte der Zusatz der oben genannte Zytokine in DC-freien CD4⁺ T-Zellen in Anwesenheit von CD3/CD28-Beads einen positiven Effekt auf die IL-17-Sekretion (Abb. 10).

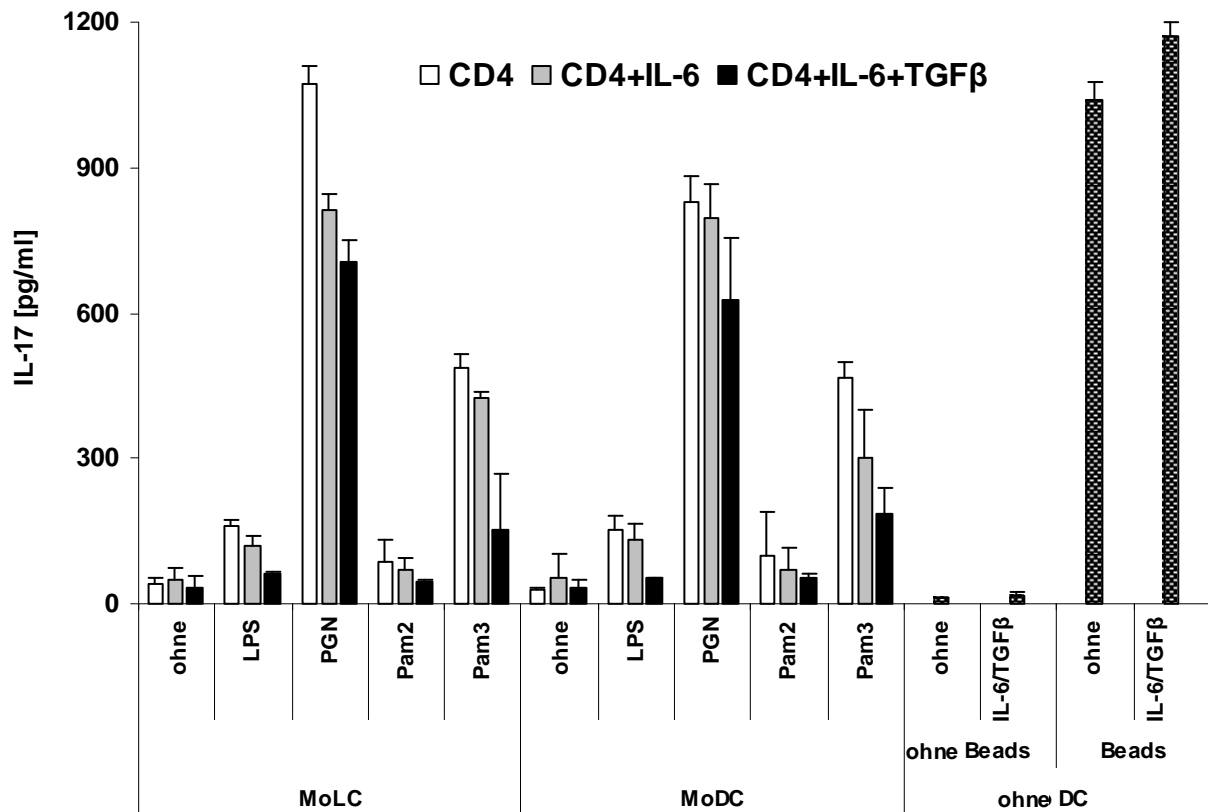


Abb. 10: Externes IL-6 und TGF-β hemmt die Freisetzung von IL-17 durch differenzierte T_H17-Zellen. CD1c⁺ MoDC/MoLC eines Spenders wurden über 48 h mit PGN, LPS, Pam₂CSK₄ sowie Pam₃CSK₄ aktiviert und mit CD4⁺ T-Zellen ohne Zusatz von Zytokinen (weiß), mit externem Zusatz von IL-6 (grau) und mit externem Zusatz von IL-6 und TGF-β (schwarz) kokultiviert. Als Kontrolle wurden T-Zellen ohne DC jedoch mit Anti-CD3/Anti-CD28-benetzten Beads und Zusatz von Zytokinen (gepunktet) stimuliert. Die Säulen stellen Mittelwerte der IL-17-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen ± Standardabweichung eines Spenders dar. Der Versuch wurde dreimal mit ähnlichen Ergebnissen wiederholt.

5.7 Vergleich unterschiedlicher Subpopulationen von T_H-Zellen

Es wurden unterschiedliche Subpopulationen von T_H-Zellen auf die Sekretion von IL-17 in Kokultur mit MoLC, die mit 10 verschiedenen TLR-Liganden stimuliert wurden, untersucht. Dazu wurden mit Hilfe von CD4⁺- und CD25⁺-MACS drei unterschiedliche Populationen von CD4⁺ T-Zellen separiert.

Es konnte gezeigt werden, dass CD4⁺CD25⁻ T-Zellen (ohne Expression der α-Untereinheit des IL-2-Rezeptors) in allen Fällen die höchsten IL-17-Konzentrationen erzielen (Abb. 11).

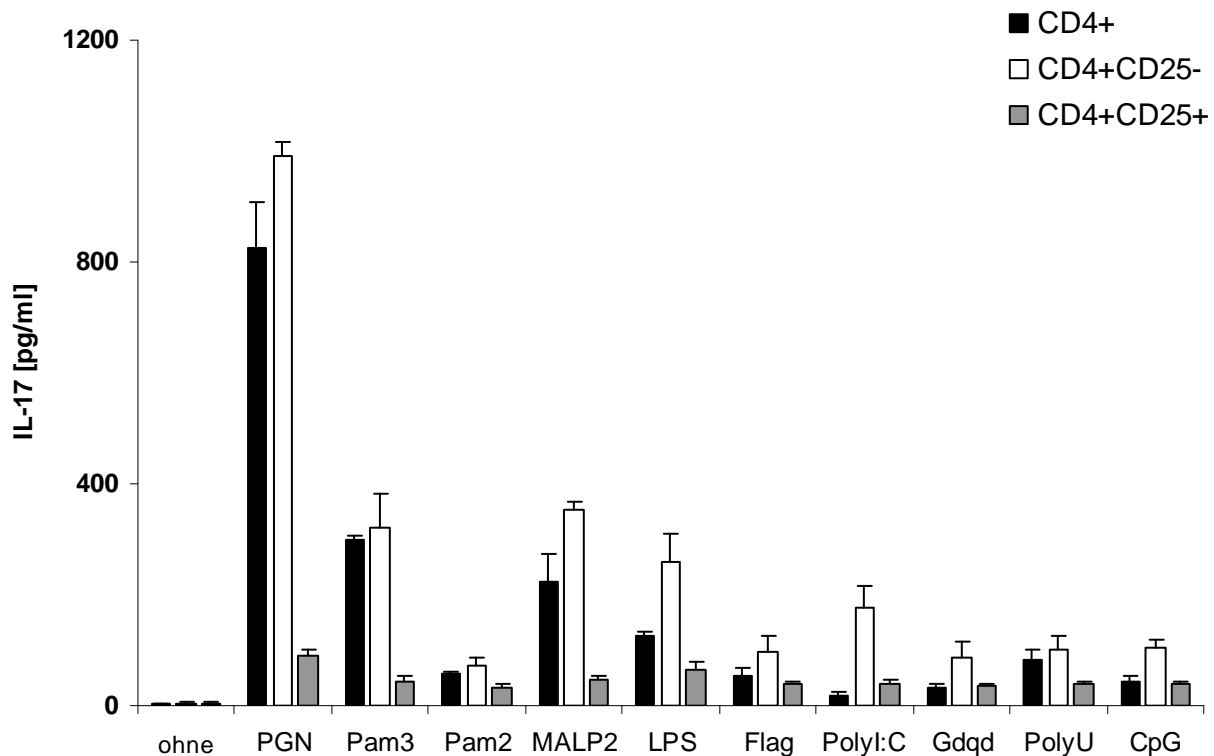


Abb. 11: IL-17 Sekretion durch drei T_H-Zellpopulationen in Kokultur mit TLR-stimulierten MoLC
 CD1c⁺ MoLC wurden über 48 h mit den TLR-Liganden PGN, Pam₃, Pam₂, MALP2, LPS, Flagellin, Poly(I:C), Gardiquimod (Gdqd), PolyU und CpG stimuliert. Nach wiederholtem Waschen wurden diese Zellpopulationen jeweils mit naiven CD4⁺ T-Zellen (schwarz), positiv isolierten CD4⁺CD25⁺ (grau) und negativ isolierten CD4⁺CD25⁻ (weiß) Zellen kokultiviert. Es werden Mittelwerte der Zytokinkonzentration ± Standardabweichung von drei unabhängigen Versuchen gezeigt.

5.8 Blockierung von MoLC-induzierter T_H17-Antwort durch Anti-IL-1β, Anti-TGF-β und Anti-IL-23

Um den Einfluss der von TLR2-stimulierten MoLC abgeleiteten Zytokine IL-6, IL-1β, IL-23 und TGF-β auf die Differenzierung von T_H17-Zellen zu untersuchen, wurden diese Zytokine mit Hilfe von Antikörpern selektiv neutralisiert. Vor dem Ansetzen der Kokulturen mit PGN-stimulierten MoLC wurden die isolierten CD4⁺CD25⁻ T-Zellen mit Anti-IL-6, -IL-1β, -IL-23 und -TGF-β präinkubiert. Einzeln und in Kombination hemmen Anti-IL-1β, Anti-TGF-β und Anti-IL-23 die Sekretion von IL-17 (Abb. 12). Die Neutralisation von IL-1β und IL-23 verminderte außerdem die Sekretion von IFN_γ, während Anti-IL-6 und Anti-TGF-β keinen signifikanten Effekt auf die IFN_γ-Sekretion zeigten.

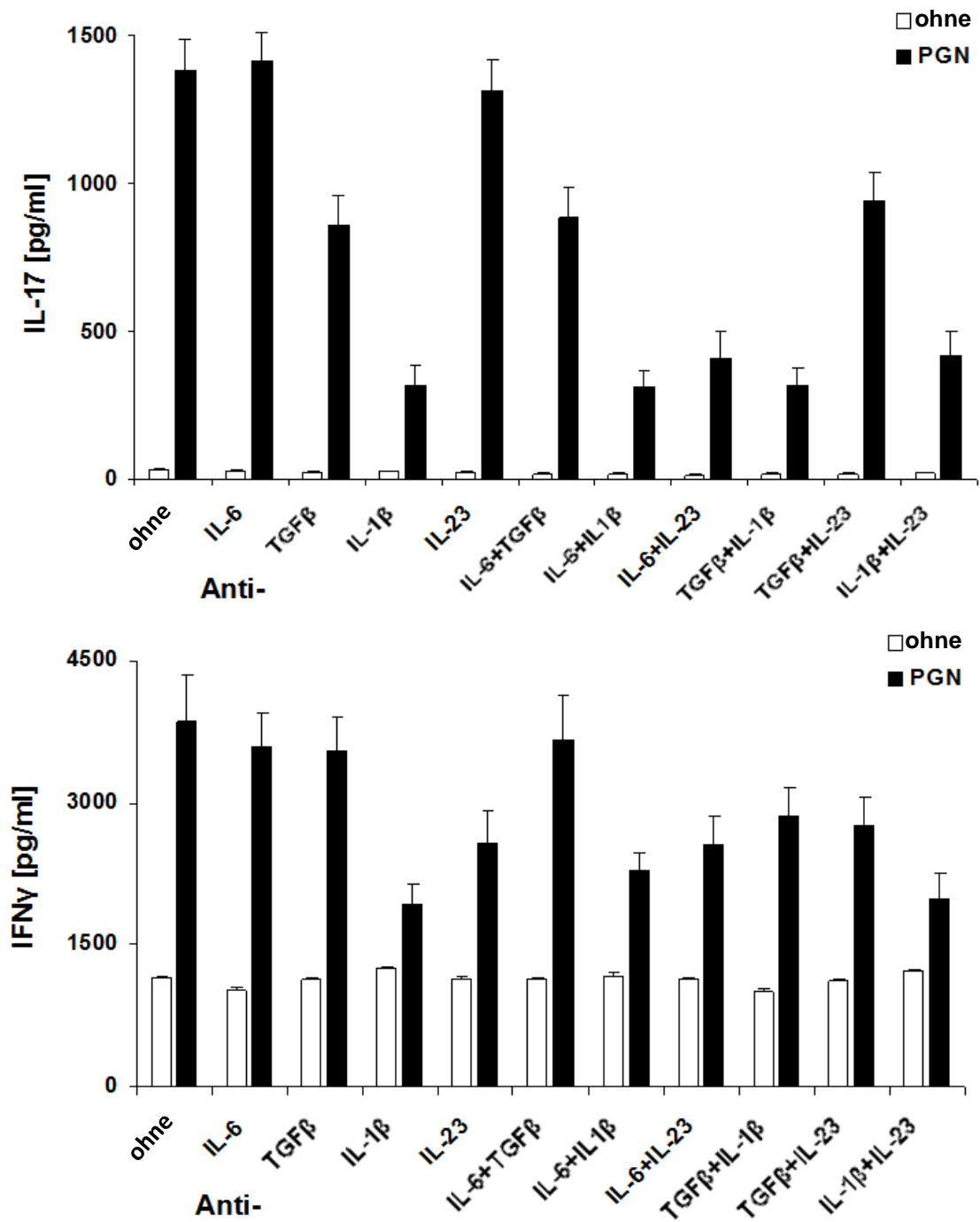


Abb. 12: Wirkung Zytokin-neutralisierender Antikörper auf IL-17-/IFN γ -Sekretion

Den Kokulturen von PGN-aktivierten CD1c⁺ MoLC und CD4⁺CD25⁻ T-Zellen wurden Antikörper zugesetzt, die IL-6, IL-1 β , IL-23p19 und TGF- β blockieren. Nach 5 tägiger Inkubation wurden mit Hilfe von ELISA die IL-17- und IFN γ -Konzentrationen in den Zellkulturüberständen gemessen. Das Säulendiagramm zeigt die Mittelwerte der Zytokinkonzentrationen (\pm Standardabweichung) von drei Spendern ohne Stimulation (weiß) und unter Stimulation mit 20 μ g/ml PGN (schwarz).

5.9 IL-17- und IFN γ -Expression von CD4⁺ T-Zellen nach Blockierung von IL-6, IL-1 β , TGF- β und IL-23

Es konnte mit Hilfe einer FACS-Färbung gezeigt werden, dass TLR2-aktivierte MoLC IL-17/IFN γ -doppelt-positive CD4⁺ T-Zellen induzieren (Abb. 13). Es konnte nachgewiesen werden, dass die IL-17-Expression in CD4⁺ T-Zellen mit Hilfe von neutralisierenden Antikörpern gegen IL-6, IL-1 β , TGF- β und IL-23 signifikant abnimmt. Hierbei ist allerdings der Effekt für Anti-IL-6 am geringsten ausgefallen. Weiterhin konnte der Nachweis erbracht werden, dass im Vergleich zu den anderen untersuchten Zytokin-Antikörpern Anti-IL-1 β das stärkste Potential hat, eine IL-17-Antwort zu unterdrücken. Diese T_H17-Unterdrückung ließ sich jedoch nicht signifikant durch eine Kombination von Zytokin-Antikörpern steigern, während sie durch die Kombination mit Anti-IL-6 partiell aufgehoben wurde.

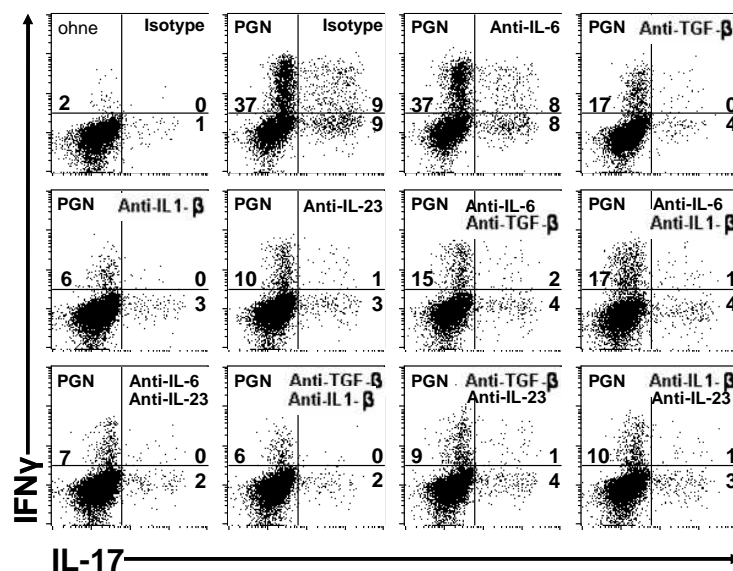


Abb. 13: Wirkung von Zytokin-neutralisierenden Antikörpern auf IL-17/IFN γ -Expression

Intrazelluläre FACS-Färbung von IL-17 und IFN γ nach 5 Tagen Kokultur wie in Material und Methoden beschrieben. Die Punkt-Diagramme zeigen die Ergebnisse eines Spenders von insgesamt drei Spendern. Die Zahlen in den Quadranten repräsentieren den prozentualen Anteil von IL-17⁺ und/oder IFN γ ⁺ Zellen an der gesamten CD4⁺ T-Zellpopulation.

5.10 TLR-2-Block hemmt die T_H17-Antwort in Kokultur mit MoLC und MoDC

Um eine mögliche direkte Aktivierung von CD4⁺ T-Zellen durch PGN und eine Umgehung der T-Zell-Interaktion mit TLR2-aktivierten MoLC bzw. MoDC zu überprüfen, wurden Blockversuche mit TLR2-Antikörper durchgeführt. Hierfür wurden MoLC und MoDC mit Anti-TLR2 präinkubiert, mit PGN stimuliert und nach intensivem Waschen mit CD4⁺ CD25⁻ T-Zellen kokultiviert. Es konnte für T-Zellen in Interaktion mit TLR2-geblockten PGN-stimulierten MoLC bzw. MoDC im Vergleich zur ungeblockten Population eine signifikante Abnahme der IL-17-Sekretion nachgewiesen werden. In den selbigen Versuchsreihen

wurde der oben genannte Effekt stärker in MoLC- als in MoDC-Kokulturen beobachtet (Abb. 14).

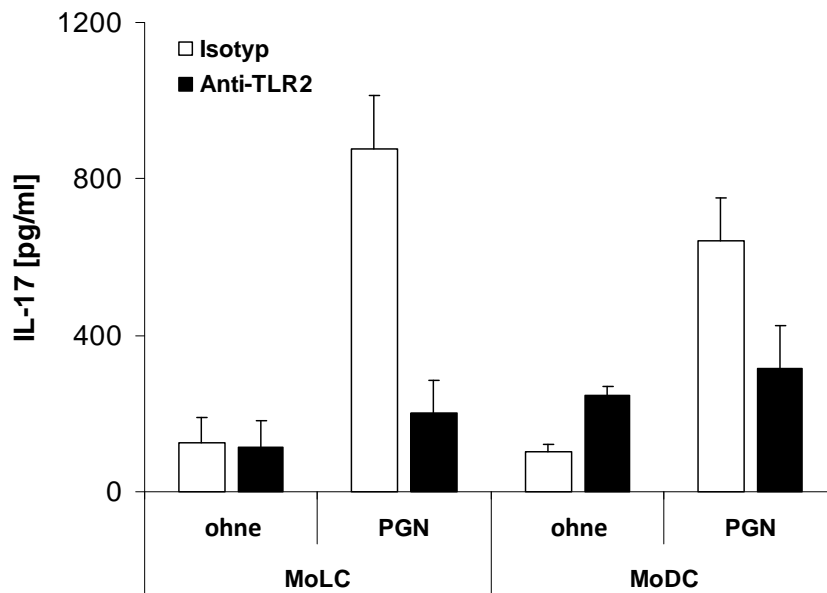


Abb. 14: Die Blockade von TLR2 auf MoLC hemmt die Freisetzung von IL-17 aus CD4⁺ T-Zellen.

CD1c⁺ MoLC und CD1c⁺ MoDC eines Spenders wurden für 30 Minuten mit 10 µg/ml Anti-TLR2 (T2.5, schwarz) oder Kontroll-Isotyp (weiß) inkubiert. Nach 48 stündiger Stimulation mit PGN wurden die Zellen mehrfach gewaschen und mit naiven CD4⁺ T-Zellen kokultiviert. Nach 5 Tagen wurden in den Überständen mit Hilfe von ELISA die IL-17 Konzentrationen bestimmt. Die Säulen stellen die Mittelwerte der IL-17 Konzentrationen (± Standardabweichung) von drei unabhängigen Spendern dar.

6. Diskussion

In dieser Arbeit wurde *in vitro* die Direktion einer potentiellen T_H-Zell-Antwort durch Antigen-präsentierende Zellen nach simuliertem Pathogenkontakt untersucht. Gegenstand der Experimente war die TLR-Aktivierung von DC und die kürzlich zuvor beschriebene eigenständige T_H17-Differenzierungslinie, der unter anderem eine wichtige Rolle bei der Abwehr von extrazellulären Bakterien und Pilzen zugeschrieben wird.

Die Interaktion zwischen dem angeborenen und dem erworbenen Immunsystem ist für die Elimination von Pathogenen sowie für die Bildung eines immunologischen Gedächtnisses von entscheidender Bedeutung. Während des ersten Pathogenkontaktes produzieren Immunzellen und ortsansässige Zellen Gewebshormone sowie Zytokine und lösen dadurch eine lokale Entzündungsreaktion aus. Über PRR, wie z.B. TLR, erkennen insbesondere DC als zelluläre Akteure des angeborenen Immunsystems PAMP. Die aktivierten DC wandern mit Hilfe von Chemotaxis in anatomisch nachgeschaltete T-Zell-reiche Areale sekundärer immunologischer Organe, wie Lymphknoten, Milz oder MALT. Dort treten sie in direkten Kontakt mit Zellen des adaptiven Immunsystems, den naiven T-Zellen. Eine Vielzahl von naiven T-Zellklonen als Träger spezifischer TCR interagieren mit den DC mit jeweils unterschiedlichen Bindungsvermögen. Fremde Peptide werden in der Bindungsfurche von MHCII-Molekülen durch einen spezifischen TCR erkannt. Der TCR bildet auf den T-Zellen einen Rezeptorkomplex mit nicht-kovalent gebundene CD3-Molekülen. Der Co-Rezeptor CD4 stabilisiert durch laterale Assoziation an MHCII den Rezeptorkomplex. Außerdem stärken kostimulatorische Oberflächenmoleküle (z. B. CD28) mittels Rezeptor-Ligand-Prinzip diese direkte Zell-Zell-Verbindung. Bei ausreichender Affinität kommt es zur Ausbildung einer sogenannten immunologischen Synapse, deren Resultat die Aktivierung und Differenzierung eines Pathogen-spezifischen T-Zellklons ist. Abhängig von der Pathogen-spezifischen DC-Aktivierung differenziert die gebundene naive T-Zellen zur Effektorzelle einer spezialisierten T-Zellreihe, zu denen zur Zeit folgende Typen gezählt werden: T_H1, T_H2, T_H17, T_H9, T_H22, T_{FH} und T_{reg}. Die individuellen Differenzierungswege dieser eigenständigen Zellreihen werden dabei durch verschiedene Stimuluskombinationen induziert und sind zudem auf verschiedenen Ebenen so miteinander verbunden, dass eine komplexe Interaktion für eine Direktion der T-Zellantwort nötig ist.

In dem hier vorgestellten *in-vitro*-Modell einer potenziellen T-Zellantwort auf Pathogenkontakt, wurde die immunologischen Kompetenz des größten menschlichen Organs, der Haut, gezielt eingesetzt. Diese tritt physiologisch nach Verlust der

physikalischen Barriere auf oder wird auch in der Medizin in Form von subkutanen Injektionen von Impfstoffen genutzt. Bei den Versuchen wurde darauf geachtet, einerseits die zeitliche Abfolge eines Pathogenkontaktes sowie andererseits eine möglichst unbeeinflusste Situation für die Direktion der Immunantwort zu bieten, um eine bestmögliche Annäherung an die physiologischen Abläufe *in vivo* zu erreichen. Es wurde die Rolle der DC-Aktivierung via TLR in der Direktion der potentiellen T-Zellantwort untersucht. Dazu wurden Monozyten aus Leukozyten menschlicher Vollblutspenden isoliert und MoDC generiert, die den peripheren Blut-DC, sowie MoLC, die den spezialisierten Haut-DC, den LC, entsprechen. Analog zum Pathogenkontakt in der Haut wurden unterschiedliche Pathogen-Bestandteile als TLR-Liganden für eine zweitägige Aktivierungsphase der DC verwendet. Es wurde das Zytokinprofil der aktivierten DC bezüglich T_H17-relevanter Zytokine analysiert. Nach Anlegen einwöchiger Kokulturen von TLR-aktivierten DC mit naiven CD4⁺ T-Zellen wurden die Zellen und deren Zellkulturüberstände mittels FACS und ELISA auf die spezifischen Expressionsmuster der zu erwartenden T_H-Zelldifferenzierungslinien untersucht.

Zu Beginn der Forschungsreihe wurden unterschiedliche TLR auf MoLC stimuliert und in Zellüberständen auf Produktion T_H17-differenzierender Zytokine detektiert. Ein wichtiges Ergebnis war, dass insbesondere der TLR2-Ligand PGN ein T_H17-induzierendes Zytokinprofil in MoLC hervorrufen kann. MALP2 sowie LPS lösten zwar auch die Freisetzung T_H17-induzierender Zytokine in MoLC aus, konnten jedoch im direkten Vergleich zu PGN keine gleichzeitig hohen Zytokinkonzentrationen für IL-6, IL-1 β und IL-23 hervorrufen.

Während MALP-2 einen aktivierenden Ligand des TLR2/6-Dimers und LPS des TLR4 darstellen, besitzt PGN die Besonderheit, die Zielzelle über unterschiedliche Rezeptoren aktivieren zu können. PGN, auch Murein genannt, ist die Bezeichnung eines Zellwand-Makromoleküls von Prokaryoten. Dessen polymere Struktur besteht aus den beiden β (1,4)-glycosidisch verbundenen Zuckerresten N-Acetylglucosamin und N-Acetylmuraminsäure. Diese parallelen Zuckerpolymerketten sind untereinander über Oligopeptidketten quervernetzt. Außerdem beinhaltet PGN Wandteichonsäuren (WTA), welche im PGN verankerte Teichonsäureketten darstellen, und Lipoteichonsäuren (LTA), welche das PGN-Makromolekül an Glykolipide der Zytoplasmamembran binden. Das PGN als Bestandteil der Bakterienzellwand lässt sich ab einer bestimmten Größe mittels Gram-Färbung lichtmikroskopisch darstellen. Es ist allerdings sowohl bei Gram-positiven als auch Gram-negativen Bakterien vorhanden. Zu Forschungszwecken wird PGN u. a. aus

Staphylococcus aureus und *Escherichia coli* Stämmen isoliert, enzymatisch bzw. thermisch gespalten und je nach Herstellungsweg unterschiedlich gereinigt. Als Kontamination werden Spuren von potentiellen T-Zell-Superantigenen angesehen, die via direkter Aktivierung des TCR auch zu einer erhöhten IL-17-Sekretion führen könnten¹⁶⁶. Das hier eingesetzte PGN wird von Firma Sigma-Aldrich Chemie aus *Staphylococcus aureus* enzymatisch isoliert und nach Fraktionierung und Reinigung der Forschung zur Verfügung gestellt. Es konnte in den durchgeführten Versuchen keine direkte Superantigen-ähnliche Wirkung auf naive CD4⁺ T-Zellen durch das eingesetzte PGN nachgewiesen werden.

PGN wird als potenter TLR2-Stimulus beschrieben, dabei wird sowohl eine Aktivierung von TLR2/1- als auch eine des TLR2/6-Dimers postuliert. In jüngster Zeit ist jedoch die Bedeutung des TLR2 hinsichtlich der Erkennung von PGN durch die Beschreibung von anderen potentiellen, intrazellulären PGN-Rezeptoren (NOD und PGRP) in eine Kontroverse geraten. So wird nun beschrieben, dass niedrigmolekulare PGN-Bestandteile intrazelluläre Stimuli von NOD1, NOD2 und PGRP darstellen. Durch Ergebnisse von Forschungsgruppen, die in ihren Versuchen hochgereinigtes, enzymatisch gespaltenes und lösbares PGN benutzten, wird die These aufgestellt, dass PGN nicht über TLR2 die Zielzelle aktiviert, sondern ausschließlich via NOD1/2 oder PGRP¹⁶⁷. In dieser Studie wird eine dennoch beobachtete Wirkung von PGN am TLR2 durch die Bindung mit Lipoteichonsäure (LTA) erklärt. Um allerdings die intrazellulären NOD-Rezeptoren zu aktivieren, müssen die potentiellen NOD-Liganden aus dem PGN-Makromolekül freigesetzt werden und als niedrigmolekulare Verbindungen in die Zielzelle gelangen. Interessanterweise sind diesbezüglich Bakterien in der Lage ihre eigene Zellwand mittels PGN-spaltender Enzyme zu modellieren. Während dieses Vorgangs werden *in vivo* lösliche PGN-Bestandteile frei, die wiederum auch einen intrazellulären Effekt auf Immunzellen haben könnten¹⁶⁸. Um eine Beeinflussung der hier vorgestellten Ergebnisse durch DC-Stimulation via NOD-Rezeptoren auszuschließen, wurden in parallelen Versuchen MoLC mit MDP(NOD2) und M-Tri_{DAP}(NOD1/2) stimuliert, wobei keine Sekretion von IL-6, IL-1 β oder IL-12p70 durch MoLC nachgewiesen werden konnte. Neueste Forschungsergebnisse bestätigen außerdem die direkte und aktivierende Bindung von PGN an TLR2 und konnten zusätzlich eine unterschiedliche Affinität von TLR2 gegenüber PGN aus Gram-positiven oder Gram-negativen Bakterien zeigen¹⁶⁹. Der letztere Effekt wird mit den unterschiedlichen Anteilen an 2,6-Diaminopimelinsäure und Lysin als Bestandteile der Oligopeptid-Brücken im PGN-Molekül erklärt. Es konnte bereits nachgewiesen werden, dass humane LC wie auch MoLC das TLR2-Protein exprimieren

und dessen Stimulation durch Liganden über eine Phosphorylierung von IRAK-1 (IL-1R associated kinase-1) und NFκB zur vermehrten Expression von CD86, CD83 und CCR7 sowie zu einer Sekretion von TNF-α und IL-6 führt¹⁷⁰. Zusätzlich zu IL-6 konnten nun in diesen Experimenten in den Überständen von TLR2-stimulierten MoLC sowohl eine vermehrte Sekretion von IL-1β als auch von IL-23 nachgewiesen werden. Auch Versuche mit MoDC zeigten eine Zellreifung nach Stimulation von TLR2 mit mikrobiellen Lipopeptiden¹⁷¹. Es konnte zwar in mit LPS via TLR4 stimulierten MoLC auch eine erhöhte Sekretion von IL-6 und IL-23 beobachtet werden. Da allerdings TLR4 in menschlichen Haut-LC nicht nachgewiesen werden konnte, wurden die Untersuchungen auf die TLR2-Aktivierung ausgerichtet. Die hier erhobenen Versuchsergebnisse legen nahe, dass die Sekretion von TGF-β durch MoLC spontan ohne Regulation durch TLR erfolgt.

Die in MoLC-Überständen nachgewiesenen Zytokine IL-1β, IL-6, IL-23 und TGF-β werden zurzeit als bedeutend für die T_H17-Differenzierung angesehen¹⁵⁰⁻¹⁵². IL-1β induziert in CD4⁺ T-Zellen via RORγt (human: RORC2) die Produktion von IL-17 und IFNγ. In Anwesenheit von IL-6 wird die Expression von RORγt aufrechterhalten und das Zytokinproduktionsverhältnis Richtung IL-17 verschoben. TGF-β ist in Mäusen für die Differenzierung von T_H17-Zellen wichtig. TGF-β1-defiziente Mäuse besitzen keine T_H17-Zellen und sind gegenüber EAE resistent¹⁷². Hingegen konnte für menschliche CD4⁺ T-Zellen durch die Zugabe von TGF-β eine Inhibition der Differenzierung zu T_H1, T_H2 und T_H17 nachgewiesen werden¹⁵². Interessanterweise waren dabei menschliche T-Zellen, die nur IL-17 produzieren, resistenter gegenüber einer Inhibition mittels TGF-β als Zellen, die IL-17/IFNγ oder nur IFNγ produzierten. Diese Effekte sind mit der Beobachtung vereinbar, dass die Kombination von TGF-β und IL-6 eine T_H17-Differenzierung, die Produktion von IL-21 sowie die Expression von IL-23R und RORγt induziert^{142, 144, 146}. Dabei kann IL-21 die Rolle des IL-6 teilweise übernehmen und eine Amplifikation der T_H17-Antwort bewirken¹³⁷. IL-23 wurde zwar anfänglich als Initiationsfaktor für die T_H17-Differenzierung diskutiert. Dieser Effekt konnte allerdings in naiven CD4⁺ Maus-T-Zellen nicht bestätigt werden. Dennoch ist IL-23 wichtig für das Überleben und die Funktion von T_H17-Zellen. Während IL-23 in T-Zellen eher eine Aufrechterhaltung als eine Induktion der T_H17-Differenzierung bewirkt¹⁵¹, konnte in CD8⁺ T-Zellen auch eine T_H17-Induktion durch IL-23 nachgewiesen werden¹⁷³. Zurzeit besteht die Annahme, dass die T_H17-Immunantwort folgende drei Differenzierungsstufen durchläuft: Eine Initiationsstufe basierend auf IL-1β und IL-6, eine Amplifikationsstufe vermittelt durch IL-21 sowie eine Stabilisierungsstufe aufrechterhalten durch IL-23. Da allerdings in neueren Studien eine Umdifferenzierungsmöglichkeit und somit eine gewisse Plastizität auch innerhalb der *de-*

novo T_H-Zelldifferenzierung beschrieben wird, sind die Forschungsergebnisse bezüglich Induktion und Aufrechterhaltung der T-Zelldifferenzierung unter diesem neuen Gesichtspunkt zu verifizieren. Die Rolle des TGF- β in der menschlichen T_H17-Zelldifferenzierung wird derzeit weiterhin kontrovers diskutiert^{150,152, 172}.

Das Zytokinprofil von TLR2-aktivierten MoLC und MoDC in den hier vorliegenden Experimenten könnte spezifisch für einen CD1c⁺ Phänotyp sein, was zu einer Expression von IL-6 und IL-1 β in TLR-aktivierten CD1c⁺ im menschlichen Blut zirkulierenden DC⁴⁹ passt. Es konnte gezeigt werden, dass Bestandteile der bakteriellen Zellwand auch im Stande sind, in MoLC die Expression von T_H17-spezifischen Zytokinen zu induzieren. Außerdem konnte in den Versuchen nachgewiesen werden, dass die Konzentration von sezerniertem IL-6, IL-1 β und IL-23 in MoLC-Überständen signifikant geringer ist als in MoDC-Überständen. Dieser Sekretionsunterschied wurde zuvor für IL-6 beschrieben und mit der Zugabe von TGF- β zur Differenzierung von MoLC in Zellkultur erklärt⁵⁶. MoDC, die ohne CD1c-Reinigungsschritt generiert wurden, produzieren nach Aktivierung mit PGN in unterschiedlich hohen Maßen IL-6^{49, 171}. Nach Aktivierung mit Pam₃CSK₄ wurden in diesen beiden Studien hingegen annähernd gleiche Mengen an IL-6 nachgewiesen. Diesbezüglich könnten LC im Vergleich zu peripheren Blut-DC mit geringeren Konzentrationen parakrin sezernierter Zytokine in ihrem abgegrenzten immunologischen Versorgungsbereich suprabasaler Keratinozyten auskommen. Es bleibt jedoch endgültig zu klären, ob aus der Haut isolierte LC ähnliche Mengen an proinflammatorischen Zytokinen sezernieren wie MoLC in Zellkultur. Dies konnte in dem hier vorgestellten *in-vitro*-Modell aufgrund geringer Überlebensraten humaner Haut-LC in Zellkulturen nicht überprüft werden. Ein möglicher *in vivo* Ansatz könnte eine LC Isolierung nach intrakutaner TLR2-Stimulation sowie eine Sentinel-Lymphknoten-Untersuchung bezüglich T_H-Zelltypen im Mausversuch darstellen¹⁷⁴.

Um die TLR2-Abhängigkeit in der Sekretion der T_H17-relevanten Zytokine nach Stimulation von MoLC mit PGN zu verifizieren, wurden Titrationsversuche mit einem TLR2-blockierenden Antikörper durchgeführt. Tatsächlich konnte gezeigt werden, dass bereits geringste Konzentrationen des TLR2-Antikörpers T2.5 von 0,2 μ g/ml ausreichen, um eine signifikante Verringerung der Sekretion von IL-6, IL-23 und IL-1 β zu bewirken. Außerdem konnten eine nahezu lineare Konzentrationsabhängigkeit für die Inhibition des TLR2 mittels T2.5 im Bereich von 0,2 μ g/ml bis 20 μ g/ml nachgewiesen werden. Die Sekretion von TGF- β wird hingegen durch Stimulation mit PGN nicht beeinflusst, somit war ein Effekt des TLR2-Antikörpers diesbezüglich unwahrscheinlich. Zuvor konnte unsere

Arbeitsgruppe zeigen, dass durch Ligation des TLR2 mit dem gleichen Antikörper die Sekretion von IL-6 durch LC bis auf das Niveau von nicht-stimulierten LC gesenkt werden konnte¹⁷⁰. Meng et al. konnten bereits 2004 in Mausversuchen zeigen, dass die systemische Applikation des TLR2-Antikörpers T2.5 von 20 mg/kg Körpergewicht nach Lipopeptid-Stimulation sowohl die Freisetzung von Entzündungsmediatoren mindert als auch vor einem fatalen Ausgang eines septischen Schocks schützt¹⁷⁵. Außerdem konnte in weiteren Mausversuchen gezeigt werden, dass nach Induktion eines Hirninfarktes die TLR2-vermittelte Leukozyten/Mikroglia-Infiltration durch TLR2-Inhibition mittels T2.5 herabgesetzt werden kann¹⁷⁶.

Auch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine durch Ito-Zellen der Leber nach PGN-Stimulation kann mit der Applikation von T2.5 vermindert werden¹⁷⁷. Ito-Zellen speichern Vitamin A und spielen in der Pathologie der Leberverfettung und Leberzirrhose eine wesentliche Rolle.

In aktuellen Studien wird die Produktion sowie die Anwendung eines intrazellulären TLR2-Antikörperfragments im Endoplasmatischen Retikulum (*anti-TLR2 intrabody*, α T2ib) überprüft. Dabei handelt es sich um ein scFv-Fragment, das aus den variablen Domänen der schweren und leichten Kette des monoklonalen TLR2-Antikörpers T2.5 synthetisiert wird. Dieser ist im Stande, *in vitro* und *ex vivo* eine TLR2-Ligand-vermittelte Zellaktivierung spezifisch und effizient zu supprimieren, weswegen eine künftige therapeutische Benutzung dieses Antikörperfragments in Betracht gezogen wird¹⁷⁸. In Einklang mit den in unserer Gruppe gewonnenen Ergebnissen kann die medizinische Anwendung eines inhibierenden TLR2-Antikörpers bei diversen Autoimmunerkrankungen allgemein so gedeutet werden, dass durch eine TLR2-Inhibition die Sekretion proinflammatorischer Zytokine herabgesetzt wird, während die Produktion von TGF- β als potentem Induktor immunsuppressiver T_{reg}-Zellen nicht beeinflusst wird. So könnte das immunologische Gleichgewicht zu Gunsten einer relativen Immunsuppression durch T_{reg} verändert werden. Zu beachten wäre allerdings das Vorkommen von TLR2 in diversen menschlichen Zellarten, sodass je nach Ort der Autoimmunerkrankung möglicherweise eine gezielte topische Anwendung des TLR2-Antikörpers nötig sein könnte. Beispielsweise ist in Speicheldrüsen von Patienten mit primärem Sjögren-Syndrom eine TLR2-Aktivierung nachgewiesen, die für die Erkrankung ursächlich sein könnte¹⁷⁹. Die Ätiologie der EAE, die als Forschungsäquivalent der MS in Mäusen dient, wird ebenfalls über die Aktivierung von TLR2 und Proliferation von T_H17-Zellen erklärt¹⁸⁰. Hier könnte im Anfangsstadium der Erkrankung eine Applikation eines inhibierenden TLR2-Antikörpers den Krankheitsverlauf verlangsamen oder als tertiäre Prävention nach Erstmanifestation dienen.

Es konnte zudem eine erhöhte Expression von Reifungsmarkern nach PGN-Stimulation in MoLC nachgewiesen werden. Dieser Effekt konnte für die beiden Reifungsmarker CCR7 und CD83 beobachtet werden und war ebenfalls mit T2.5 konzentrationsabhängig inhibierbar, sodass eine Induktion der Zellreifung in MoLC über TLR2 mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden kann. Auch in LC, die aus menschlicher Haut isoliert wurden, konnte die Expression u. a. ebendieser Reifungsmarker via TLR2-Aktivierung gesteigert werden¹⁷⁰. Die Expression von HLA-DR (MHCII) auf MoLC konnte hingegen durch eine Stimulation mit PGN nicht signifikant erhöht werden, da nicht-stimulierte MoLC bereits in hohem Maße HLA-DR auf ihrer Oberfläche exprimieren. HLA-DR gilt als Bestandteil der MHC-II-Moleküle und Biomarker für APC, außerdem wird es als Marker für den Aktivierungsgrad von MoDC und MoLC herangezogen¹⁸¹⁻¹⁸³. In aktuellen Westernblot-Untersuchungen von DC nach TLR-Aktivierung wird die Expression von HLA-DR dennoch nicht als Reifungsmarker berücksichtigt¹⁸⁴. Funktionell dient die Hochregulierung der CCR7-Expression nach TLR2-Aktivierung der Steigerung der migratorischen Eigenschaft von aktivierten LC aus der Epidermis in Richtung anatomisch nachgeschalteter Lymphknoten¹⁸⁵. CD83 stellt einen charakteristischen Zelloberflächenmarker für vollständig ausgereifte Dendritische Zellen dar. Es wird in einer löslichen und in einer membrangebundenen Isoform von unterschiedlichen Zelltypen wie DC, T- und B-Lymphozyten produziert. Während das membrangebundene CD83 auf DC eine T-Zell-aktivierende Kapazität als kostimulatorisches Oberflächenmolekül besitzt, dient die lösliche Form der Inhibition ebendieser Funktion¹⁸⁶.

Interessanterweise wird TLR2 außer in DC in diversen anderen Zelltypen, wie Keratinozyten, Endothelzellen sowie T-Lymphozyten exprimiert, was zu der Annahme führen könnte, dass PGN direkt TLR2 in CD4⁺ T-Lymphozyten aktiviert und so zu einer T_H17-Antwort führt. Diesen Effekt beschrieben Reynolds et al. im Jahr 2010¹⁸⁷. Sie konnten zusätzlich nachweisen, dass unter allen bekannten T_H-Subtypen die T_H17-Zellen die höchste Expression von TLR2 zeigen und dass die Aktivierung von TLR2 mit Pam₃ zur vermehrten Expression von T_H17-Transkriptionsfaktoren und -Zytokinen führt. Die Ergebnisse dieser Arbeit deuten ebenfalls auf einen direkten Einfluss von TLR2-Liganden auf naive CD4⁺ T-Zellen hin, allerdings sind in allen Versuchsansätzen anti-CD3-/anti-CD28-Microbeads für die unmittelbare Aktivierung von T-Zellen via TLR2 nötig. Die benutzten Microbeads simulieren einen Bindungspartner (APC) in einer immunologischen Synapse, indem sie den TCR (CD3) und CD28, ein kostimulatorisches

Oberflächenmolekül auf T-Zellen, binden. Sowohl CD3/CD28 als auch TLR2 verwenden NFkB als Endstrecke in ihrer intrazellulären Signaltransduktion. Die Translokation von NFkB in den Nucleus naiver T-Zellen führt zu einer proliferativen Aktivierung mit selektiver Unterdrückung der T_{reg}-Differenzierungslinie¹⁸⁸. Aktuelle Forschungsergebnisse belegen zusätzlich, dass durch die Kooperation der T_H17-Transkriptionsfaktoren RORγt/-α mit IκBζ die IL-17a-Expression gesteigert werden kann¹⁸⁹. Die hier verwendeten Microbeads wie auch APC können ohne zusätzliche Stimuli keine signifikante T_H17-Differenzierung induzieren. So lässt sich mit hoher Sicherheit daraus schließen, dass naive CD4⁺ T-Zellen, obwohl sie TLR2 exprimieren, ohne zeitgleiche Bindung von APC nicht auf eine TLR2-Stimulation mit einer T_H17-Differenzierung reagieren können. Die Notwendigkeit von APC für eine T_H17-Differenzierung wird ebenfalls von Studien gestützt, die zeigen, dass aus Knochenmark abgeleitete DC nach Stimulation in CD4⁺ T-Zellen eine T_H17-Differenzierung einleiten¹⁹⁰. Um in den hier beschriebenen Experimenten eine direkte Interaktion des Stimulus mit CD4⁺ T-Zellen auszuschließen, wurde vor dem Ansetzen der Kokulturen von DC und naiven CD4⁺ T-Zellen darauf geachtet, die DC nach Stimulation ausgiebig zu waschen, um einerseits die übrigen TLR-Stimuli in den DC-Überständen zu entfernen und andererseits ein genaues Zellmischungsverhältnis von 1:10 (DC:CD4⁺ T-Zellen) zu erhalten. Unserer Ansicht nach könnte die direkte TLR2-Aktivierung auf T-Zellen einerseits der Reaktivierung von Gedächtnis-T-Zellen sowie zur positiven Verstärkung während der de-novo-Differenzierung von T_H17-Zellen dienen. Allerdings konnte in diesen Versuchen eine IL-17-Sekretion durch vorgeformte Gedächtnis-T-Zellen, welche vor kurzem als potentielle IL-17-Produzenten beschrieben wurden¹⁴², nicht ausgeschlossen werden.

Wie oben beschrieben sind MoLC nach TLR2-Stimulierung in der Lage, IL-6, IL-1β und IL-23 zu sezernieren sowie vermehrt CCR7 und CD83 zu exprimieren und verfügen somit theoretisch über die Kapazität, die Differenzierung naiver T-Zellen in Richtung T_H17 zu dirigieren. Um letzteres nachzuweisen, wurden 5-tägige Kokulturen von TLR2-/TLR4-stimulierten MoLC und naiven CD4⁺ T-Zellen angesetzt und die tatsächliche Direktion der T-Zell-Antwort untersucht. Die Zellkulturen wurden während der Kokulturphase im Brutschrank nicht manipuliert. Andere Forschungsgruppen verwenden Zytokine oder Zytokin-Antikörper, um ein dirigierendes Zytokinmilieu für eine bestimmte Differenzierungsrichtung vorzugeben^{137, 138, 143}. In den vorliegenden Versuchen konnte mittels intrazellulärer FACS-Färbungen gezeigt werden, dass unstimulierte MoLC in Kokultur mit naiven CD4⁺ T-Zellen eher eine IFNγ- als eine IL-17-Produktion induzieren.

Das Verhältnis von IFN γ - zu IL-17-Expression ließ sich durch MoLC-Stimulation mittels LPS (TLR4) in Richtung IFN γ verschieben, während die TLR2-Liganden PGN und Pam₃ eine Verschiebung in Richtung IL-17 hervorriefen. Interessanterweise wurden in den TLR2-stimulierten Ansätzen IFN γ /IL-17 doppelpositive Zellen identifiziert, was auf eine parallele Expressionsmöglichkeit und eine Plastizität während der T_H-Zelldifferenzierung hindeutet. Weiterhin konnte mittels ELISA in T-Zell-Kokulturen mit PGN-stimulierten MoLC oder MoDC eine erhöhte Sekretion von IFN γ sowie IL-17, nicht jedoch von dem T_H2-spezifischen Zytokin IL-4 nachgewiesen werden.

Der direkte Vergleich zwischen MoLC und MoDC zeigt deutlich, dass PGN-aktivierte MoLC eher eine IL-17-Sekretion in naiven CD4⁺ T-Zellen induzieren, als PGN-aktivierte MoDC. Bezüglich der IFN γ -Sekretion lässt sich ein umgekehrter Effekt beobachten. Eine andere Forschungsgruppe konnte bereits eine Steigerung der IFN γ -Expression durch IL-2-behandelte T-Zellen in Kokultur mit PGN-stimulierten MoLC (TGF-DC) und MoDC (IL-4-DC) nachweisen¹⁵². Sie konnten allerdings mit MoLC/MoDC ohne CD1c-Sortierung nur eine vergleichsmäßig schwache IL-17-Sekretion in CD4⁺ T-Zellen induzieren. Da dieselbe Arbeitsgruppe mit TLR2-stimulierten CD1c⁺ Blut-DC eine stärkere IL-17-Expression induzieren konnte¹⁴², kann angenommen werden, dass die in dieser Arbeit beobachtete Sekretion von IL-17 durch CD4⁺ T-Zellen ohne IL-2-Zusatz in Zusammenhang mit einem CD1c⁺ Phänotyp der MoLC/MoDC in Kokultur steht. Außerdem konnten diesbezüglich auch Wang et al. bei der Hauterkrankung Vitiligo herausfinden, dass die CD1c⁺ Subpopulation von dermalen DC eine signifikant stärkere T_H17-Differenzierung induzieren kann¹⁹¹.

Interessanterweise sind in diesen Versuchen sowohl MoLC als auch MoDC in der Lage, ohne zusätzliche TLR-Stimulation in CD4⁺ T-Zellen eine IFN γ -Sekretion zu induzieren. Dieses Phänomen könnte einerseits auf den reaktivierenden Effekt unstimulierter DC auf präformierte Gedächtnis-T-Zellen beruhen, welche bereits als Kontamination in den FACS-Untersuchungen nachgewiesen werden konnten. Andererseits kann auch eine Wirkung durch die Allogrenität der benutzten Zellen in Kokultur nicht ausgeschlossen werden.

Zur Beantwortung der Frage des Zytokinbedarfs von T_H17-Zellen konnte gezeigt werden, dass die externe Zugabe von IL-6 und IL-6/TGF- β zu den Kokulturen von CD4⁺ T-Zellen mit TLR2/TLR4-stimulierten MoLC bzw. MoDC die Sekretion von IL-17 zunehmend mindert. Dies wird teilweise durch die Beobachtung erklärt, dass eine hohe Konzentration von TGF- β in CD4⁺ T-Zellkulturen eine Differenzierung zu induzierten T_{reg}-Zellen

bewirkt¹⁹², welche ihrerseits mittels eigenständiger TGF- β -Sekretion die Differenzierung und Proliferation von Effektor-T-Zellen inhibieren¹⁹³. Außerdem kann die T_H17-Differenzierungsreihe durch TGF- β via Induktion des T_{reg}-spezifischen Transkriptionsfaktors Foxp3 und Inhibition des T_H17-spezifischen ROR γ t unterdrückt werden¹⁹⁴. Im Gegensatz dazu bewirkt die Zugabe von IL-6/TGF- β zu CD4⁺ T-Zellen mit Anti-CD3/-CD28-Microbeads eine leichte Steigerung der IL-17 Sekretion nach PGN-Stimulation. Dies ist mit einem Verlust der inhibitorischen Eigenschaft potentieller T_{reg} durch eine starke CD3-Bindung¹⁹⁵ erklärbar, so dass die Zytokine IL-6/TGF- β ihre T_H17-aktivierende Wirkung entfalten können.

Während der Generierung von MoLC aus isolierten Monozyten ist die Zugabe von TGF- β methodisch notwendig. So musste angenommen werden, dass in den MoLC-Kokulturen dieses Zytokin, obwohl es essentiell für T_H17-Zellen zu sein scheint, durch eine Aktivierung präformierter CD4⁺ CD25⁺ T_{reg} eine potentielle T_H17-Direktion von vornherein abschwächt. CD25 (IL-2-Rezeptor) wird auf T_{reg} und aktivierten T-Zellen exprimiert. Um einen Effekt dieser CD25⁺ Zellen auf die Direktion einer potentiellen T_H17-Antwort zu untersuchen, wurden Kokulturen von TLR-aktivierten MoLC mit drei unterschiedlichen Populationen von T-Zellen angesetzt: CD4⁺, CD4⁺CD25⁺, CD4⁺CD25⁻. Dabei zeigte sich eindeutig die höchste IL-17-Produktion in der CD4⁺CD25⁻ T-Zellpopulation. Diese Beobachtung bestätigt die Annahme, dass in T-Zell-Kokulturen durch präformierte T_{reg}-Zellen oder durch andere bereits aktivierte T-Zellen, die auch den CD25 exprimieren, eine T_H17-Differenzierung geschwächt werden kann.

Im weiteren Verlauf wurde untersucht, wie sich das Abfangen von IL-6, TGF- β , IL-1 β und IL-23 mittels der jeweiligen Zytokin-Antikörper auf die Produktion von IL-17 und IFN γ in MoLC-Kokulturen nach PGN-Stimulation auswirkt. Es konnte beobachtet werden, dass Anti-IL-1 β , Anti-TGF- β sowie die Kombination Anti-IL-6/Anti-IL-23 hierbei einen inhibitorischen Effekt auf die IL-17 Sekretion aufweisen, wohingegen weder Anti-IL-6 noch Anti-IL-23 separat diesen Effekt auslösen konnten. Im Gegensatz hierzu konnten Acosta-Rodriguez et al. die Sekretion von IL-17 durch Monozyten mit anti-TGF- β nicht mindern, während sie in ihren Versuchen mit Anti-IL-23 vergleichbare Ergebnisse erzielten¹⁵². Als Ursache hierfür können unterschiedliche Zytokinprofile von PGN-stimulierten Monozyten und CD1c⁺ MoLC angenommen werden. Doch zeigten Mausversuche der T_H17-Polarisation durch Zytokinzugabe, dass in Abwesenheit von DC IL-6 und die Kombination IL-23/TGF- β einen vernachlässigbaren Effekt haben¹⁹⁶. Die vorliegenden Ergebnisse aus ELISA- und FACS-Versuchen zusammen weisen darauf hin, dass die

Differenzierung zu T_H17-Zellen durch TLR2-stimulierte CD1c⁺ MoLC stark von den Zytokinen IL-1 β und TGF- β abhängig ist.

Da divergente Ergebnisse bei den ELISA-Untersuchungen der Zellkulturüberstände und FACS-Untersuchungen der Zellen bezüglich des IL-17/IFN γ -Verhältnisses in Anwesenheit von Anti-TGF- β oder Anti-IL-23 erzielt wurden, kann eine nicht-lineare Kinetik in der Expression und Sekretion von IL-17 und IFN γ in diesem Versuchsaufbau postuliert werden. Bei der intrazellulären Fluoreszenzmarkierung des jeweiligen Zytokins für die FACS-Untersuchung wird dessen gemessene Konzentration zudem durch die Benutzung des Golgi-Apparat-Inhibitors Brefeldin A erhöht, der trotz allem zur Markierung methodisch notwendig ist. Von einer Verzerrung der Ergebnisse kann man dabei jedoch nicht ausgehen, da die Konzentration aller gemessenen Zytokine gleichermaßen betroffen ist.

Eine methodisch bisher ungelöste Problematik ist möglicherweise in der Benutzung von Zellen unterschiedlicher Spender für das Anlegen von DC/CD4-Kokulturen zu sehen. Es ist nicht eindeutig vorhersagbar, inwieweit die Interaktion von APC mit allogenen naiven T-Zellen eine Auswirkung auf die Ergebnisse dieser Studien hat. Die Ergebnisse deuten allerdings auch auf eine Aktivierung in Richtung IFN γ -produzierende T-Zellen (am ehesten T_H1-Zellen), nur durch die beschriebene allogene Kokultur ohne zusätzliche Stimulation durch TLR-Liganden, hin. Es konnten auf Grund der benötigten Zeitdauer von 7 Tagen für die Isolierung, Generierung und Stimulation von MoLC bzw. MoDC methodisch keine naiven T-Zellen aus derselben Vollblutspende isoliert werden, um eine Kokultur autologer Zellen anzulegen. Es besteht allerdings ein wesentlicher Vorteil in der Benutzung von allogenen Kokulturen: APC können autologe im Gegensatz zu allogenen T-Zellen nur in Anwesenheit eines Antigen-spezifischen TCR aktivieren. Da nun der Anteil an Antigen-spezifischer CD4⁺ T-Zellen in einer nicht vorselektierten Lymphozytenpopulation sehr gering ist, kann keine signifikante Aktivierung des gesamten Zellpools stattfinden. So musste hier die Untersuchung der Rolle von TLR auf APC bei der Direktion einer T-Zellantwort nicht von einer kleinen Population Antigen-spezifischer T-Zellen abhängig gemacht werden. Es wurde daher in Kauf genommen, dass die T-Zellen in diesem Modell einem unphysiologischen Fremdstimulus ausgesetzt sind, welcher auch medizinisch in Form von *Graft-versus-Host*-Reaktionen in Erscheinung tritt¹⁹⁷. Bei der Durchführung ähnlicher Versuche in Zukunft könnte diese methodische Problematik durch eine zweimalige Blutabnahme eines einzigen Spenders zur DC und T-Zell-Gewinnung, falls ethisch vertretbar, beseitigt werden. Allerdings müssten dann möglicherweise physiologische Gefahrensignale, wie Bestandteile des Komplementsystems, hinzugefügt

werden. Interessant wären außerdem ähnliche vergleichende Versuche mit Zellen von unterschiedlichen, jedoch *human leukocyte antigen* (HLA)-abgeglichenen Spendern.

Um abschließend die Rolle des TLR2 auf MoLC bzw. MoDC in der Direktion der T-Zellantwort in Richtung T_H17 zu verifizieren, wurde TLR2 auf den DC vor Stimulation mit PGN blockiert, nach ausgiebigen Waschschritten Kokulturen mit naiven CD4⁺ T-Zellen angesetzt und die Konzentration von IL-17 in den Zellkulturüberständen bestimmt. Es zeigte sich sowohl für MoLC als auch für MoDC eine deutliche Abnahme der IL-17-Sekretion nach Blockierung der TLR2 mit T2.5. Wir konnten unseres Wissens als erste Forschungsgruppe die Induktion von T_H17-Zellen durch PGN-aktivierte CD1c⁺ MoLC aufzeigen und die Rolle des TLR2 aufzeigen.

In Einklang mit dieser Forschungsarbeit erschienen in jüngster Zeit weitere Artikel, die dem PGN eine pathophysiologische Bedeutung durch T_H17-Polarisierung einräumen. DC von Morbus-Crohn-Patienten sind zum Beispiel durch einen Verlust der Erkennungsmöglichkeit von intrazellulären PGN-Bestandteilen nicht in der Lage, eine IL-17 Sekretion hervorzurufen¹⁹⁸. Auch konnte bereits gezeigt werden, dass Monozyten, die mit Hyphen von *Candida albicans* stimuliert wurden, eine T_H17-Differenzierung induzieren können¹⁹⁹. Hierfür könnten aktuelle Forschungsergebnisse, die die Bedeutung von *C. albicans*-Bestandteilen als TLR2-Liganden in Verbindung mit PGE₂ belegen, eine Erklärung bieten²⁰⁰. Mit Hilfe des experimentellen Mausmodells der MS, der experimentellen Autoimmun-Encephalomyelitis (EAE), ist es Forschungsgruppen gelungen, die Rolle des TLR2 und der T_H17-Zellen bei neuroinflammatorischen Erkrankungen zu erklären²⁰¹. Im experimentellen Modell der ANCA-assoziierten Vaskulitis konnten Summers et al. zudem feststellen, dass TLR2 via Induktion einer T_H17-Antwort eine Autoimmunreaktion hervorrufen kann²⁰². Die Rolle der TLR2-Aktivierung und eine einhergehende T_H17-Antwort wird außerdem für die Entstehung der Wegner Granulomatose²⁰³ und die Elimination von *Mycobacterium tuberculosis* diskutiert²⁰⁴. Auch Nyirenda et al. konnten die Differenzierung von naiven CD4⁺ T-Zellen zu T_H17-Zellen durch eine TLR2-Stimulation nachweisen²⁰⁵.

In Vergleich zur Aktivierung anderer T-Zellreihen erweist sich die Differenzierung zu T_H17-Zellen direkt abhängig von einer Aktivierung der APC via TLR2, von der Bildung einer immunologischen Synapse und der einhergehenden TCR-Aktivierung, von kostimulatorischen Oberflächenmolekülen sowie von einem dirigierenden Zytokinmilieu. In dieser Arbeit konnte nun für LC, an deren Stelle aus methodischen Gründen CD1c⁺ MoLC verwendet werden mussten, gezeigt werden, dass sie nach TLR2-Stimulation in der Lage

sind, eine T_H17-Differenzierung zu induzieren. Insgesamt kann angenommen werden, dass für die Initiation einer T_H17-Antwort TLR2 auf APC von entscheidender Bedeutung ist, während für die Aufrechterhaltung sowie Reaktivierung von Gedächtnis-T_H17-Zellen TLR2 auf T-Zellen mitverantwortlich sein könnten. Durch die Benutzung des inhibitorischen anti-TLR2-Antikörpers T2.5 vor TLR2-Stimulation auf MoLC bzw. MoDC konnte die Direktion der T-Zellantwort in Richtung T_H17 signifikant inhibiert werden, sodass die Annahme bestätigt wurde. In Zusammenschau der oben genannten aktuellen Publikationen kann davon ausgegangen werden, dass auch die hier vorgestellten Ergebnisse für die künftige Erforschung bzw. Behandlung von Autoimmunerkrankungen, wie Multiple Sklerose, Morbus Crohn oder Psoriasis, sowie von infektiologischen Erkrankungen von Bedeutung sein werden.

7. Literaturverzeichnis

1. Langerhans P. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Virchows Pathol Arch* 1868;44:325-327.
2. Breathnach AS, Birbeck MS, Everall JD. Observations on Langerhans cells in leprosy. *Br J Dermatol* 1962;74:243-53.
3. Steinman RM, Witmer MD. Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978;75:5132-6.
4. Stingl, G. & Bergstresser, P. R. Dendritic cells: a major story unfolds. *Immunol Today* 1995;16:330-333.
5. Mazzoni A, Segal DM. Controlling the Toll road to dendritic cell polarization. *J Leukoc Biol* 2004;75:721-30.
6. Reid CD, Fryer PR, Clifford C, Kirk A, Tikerpae J, Knight SC. Identification of hematopoietic progenitors of macrophages and dendritic Langerhans cells (DL-CFU) in human bone marrow and peripheral blood. *Blood* 1990;76(6):1139-49.
7. Husbands SD, Schönrich G, Arnold B, et al. Expression of major histocompatibility complex class I antigens at low levels in the thymus induces T cell tolerance via a non-deletional mechanism. *Eur J Immunol* 1992;22:2655-61.
8. Van Vliet SJ, den Dunnen J, Gringhuis SI, Geijtenbeek TB, van Kooyk Y. Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol* 2007;19(4):435-40.
9. Pasare C, Medzhitov R. Toll-like receptors: linking innate and adaptive immunity. *Adv Exp Med Biol* 2005;560:11-8.
10. Benko S, Magyarics Z, Szabó A, Rajnavölgyi E. Dendritic cell subtypes as primary targets of vaccines: the emerging role and cross-talk of pattern recognition receptors. *Biol Chem* 2008;389:469-85.
11. Jensen SS, Gad M. Differential induction of inflammatory cytokines by dendritic cells treated with novel TLR-agonist and cytokine based cocktails: targeting dendritic cells in autoimmunity. *J Inflamm (Lond)* 2010;7:37.
12. Cappello P, Fraone T, Barberis L, et al. CC-chemokine ligand 16 induces a novel maturation program in human immature monocyte-derived dendritic cells. *J Immunol* 2006;177(9):6143-51.
13. Maldonado RA, Irvine DJ, Schreiber R, Glimcher LH. A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. *Nature* 2004;431(7008):527-32.
14. Caux C, Ait-Yahia S, Chemin K, et al. Dendritic cell biology and regulation of dendritic cell trafficking by chemokines. *Springer Semin Immunopathol* 2000;22(4):345-69.
15. Robinson SP, Patterson S, English N, Davies D, Knight SC, Reid CD. Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999;29:2769-78.

16. Grabbe S, Kampgen E, Schuler G. Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunol Today* 2000;21:431-433.
17. Engering A., Van Vliet SJ, Geijtenbeek TB, Van Kooyk Y. Subset of DC-SIGN(+) dendritic cells in human blood transmits HIV-1 to T lymphocytes. *Blood* 2002;100:1780-1786.
18. Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, et al.. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000;165:6037-6046.
19. Romani N, Holzmann S, Tripp CH, Koch F, Stoitzner P. Langerhans cells – dendritic cells of the epidermis. *APMIS* 2003;111:725-740.
20. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nat Immunol* 2004;5:1219-1226.
21. Penna G, Vulcano M, Sozzani S, Adorini L. Differential migration behavior and chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Hum Immunol* 2002;63:1164-1171.
22. de la Rosa G, Longo N, Rodríguez-Fernández JL, et al. Migration of human blood dendritic cells across endothelial cell monolayers: adhesion molecules and chemokines involved in subset-specific transmigration. *J Leukoc Biol* 2003;73:639-49.
23. Xu H, Krämer M, Spengler HP, Peters JH. Dendritic cells differentiated from human monocytes through a combination of IL-4, GM-CSF and IFN-gamma exhibit phenotype and function of blood dendritic cells. *Adv Exp Med Biol* 1995;378:75-8.
24. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, et al. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor alpha: II. Functional analysis. *Blood* 1997;90:1458-70.
25. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-1118.
26. Brossart P, Grünebach F, Stuhler G, et al. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998;92(11):4238-47.
27. Ebner S, Hofer S, Nguyen VA, et al. A novel role for IL-3: human monocytes cultured in the presence of IL-3 and IL-4 differentiate into dendritic cells that produce less IL-12 and shift Th cell responses toward a Th2 cytokine pattern. *J Immunol* 2002;168(12):6199-207.
28. Steinbach F, Krause B, Bläss S, Burmester GR, Hiepe F. Development of accessory phenotype and function during the differentiation of monocyte-derived dendritic cells. *Res Immunol* 1998;149(7-8):627-32.

29. Romani N., Gruner S, Brang D, et al. Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J Exp Med* 1994;180:83-93.
30. Medzhitov R, Preston-Hulburt P, Janeway CA. A human homologue of the *Drosophila* Toll protein signals activation of adaptive immunity. *Nature* 1997;388:394-397.
31. Roach JC, Glusman G, Rowen L, et al. The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:9577-9582.
32. Rock FL, Hardiman G, Timans JC, Kastelein RA, Bazan JF. A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998;95:588-593.
33. Rast JP, Smith LC, Loza-Coll M, Hibino T, Litman GW. Genomic insights into the immune system of the sea urchin. *Science* 2006;314:952-956.
34. Janeway CA, Medzhitov R. Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* 2002;20:197-216.
35. Akira S, Hemmi H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol Lett* 2003;85:85-95.
36. Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol* 2004;4:499-511.
37. Hasan U, Chaffois C, Gaillard C, et al. Human TLR10 is a functional receptor, expressed by B cells and plasmacytoid dendritic cells, which activates gene transcription through MyD88. *J Immunol* 2005;174:2942-2950.
38. Kanzler H., Barrat FJ, Hessel EM, Coffman RL. Therapeutic targeting of innate immunity with Toll-like receptor agonists and antagonists. *Nat Med* 2007;13(5):552-9.
39. Napolitani G, Rinaldi A, Bertoni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol* 2005;6:769-776.
40. Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 2001;276:37692-9.
41. Mäkelä SM, Strengell M, Pietilä TE, Osterlund P, Julkunen I. Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells. *J Leukoc Biol* 2009;85(4):664-72.
42. Yadav M, Schorey JS. The beta-glucan receptor dectin-1 functions together with TLR2 to mediate macrophage activation by mycobacteria. *Blood* 2006;108(9):3168-75.
43. Albrecht I, Tapmeier T, Zimmermann S, Frey M, Heeg K, Dalpke A. Toll-like receptors differentially induce nucleosome remodelling at the IL-12p40 promoter. *EMBO Rep* 2004;5(2):172-7.
44. Re F, Strominger JL. Toll-like receptor 2 (TLR2) and TLR4 differentially activate human dendritic cells. *J Biol Chem* 2001;276(40):37692-9.

45. van der Kleij D, Latz E, Brouwers JF, et al. A novel host-parasite lipid cross-talk. Schistosomal lyso-phosphatidylserine activates toll-like receptor 2 and affects immune polarization. *J Biol Chem* 2002;277(50):48122-9.
46. Reithmeier-Rost D, Bierschenk S, Filippova N, Schröder-Braunstein J, Sing A. Yersinia V antigen induces both TLR homo- and heterotolerance in an IL-10-involving manner. *Cell Immunol* 2004;231(1-2):63-74.
47. Netea MG, Suttmüller R, Hermann C, et al. Toll-like receptor 2 suppresses immunity against *Candida albicans* through induction of IL-10 and regulatory T cells. *J Immunol* 2004;172(6):3712-8.
48. Rutella S, Danese S, Leone G. Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age. *Blood* 2006;108(5):1435-40.
49. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, Malefyt RW, Kastelein RA, Bazan F, Liu YJ. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med* 2001;194:863-869.
50. Rothenfusser S, Tuma E, Endres S, Hartmann G. Plasmacytoid dendritic cells: the key to CpG. *Hum Immunol* 2002;63:1111-1119.
51. Ito T, Wang YH, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol* 2005;26(3):221-9.
52. Wagner H. Interactions between bacterial CpG-DNA and TLR9 bridge innate and adaptive immunity. *Curr Opin Microbiol* 2002;5:62-69.
53. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 2004;303:1529-1531.
54. Liu YJ, Kanzler H, Soumelis V, Gilliet M. Dendritic cell lineage, plasticity and crossregulation. *Nat Immunol* 2001;2:585-589.
55. Ito T, Liu YJ, Kadowaki N. Functional diversity and plasticity of human dendritic cell subsets. *Int J Hematol* 2005;81:188-196.
56. Zou GM, Tam YK. Cytokines in the generation and maturation of dendritic cells: recent advances. *Eur Cytokine Netw* 2002;13(2):186-99.
57. Stober D, Schirmbeck R, Reimann J. IL-12/IL-18-dependent IFN-gamma release by murine dendritic cells. *J Immunol* 2001;167(2):957-65.
58. Frick JS, Grünebach F, Autenrieth IB. Immunomodulation by semi-mature dendritic cells: a novel role of Toll-like receptors and interleukin-6. *Int J Med Microbiol* 2010;300(1):19-24.
59. Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002;23(9):445-9.

60. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986;136:2348-2357.
61. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-173.
62. Chen Y, Kuchroo VK, Inobe J, Hafler DA, Weiner HL. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 1994;265(5176):1237-40.
63. Levings MK, Roncarolo MG. T-regulatory 1 cells: a novel subset of CD4 T cells with immunoregulatory properties. *J Allergy Clin Immunol* 2000;106:109-12.
64. Ma CS, Deenick EK, Batten M, Tangye SG. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med.* 2012;209(7):1241-53.
65. Josefowicz SZ, Lu LF, Rudensky AY. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu Rev Immunol* 2012;30:531-64.
66. Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT. Interleukin 17-producing CD4 effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 2005;6:1123–1132.
67. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity* 2006;24:677-688.
68. Eyerich S, Eyerich K, Pennino D, et al. Th22 cells represent a distinct human T cell subset involved in epidermal immunity and remodeling. *J Clin Invest* 2009;119(12):3573-85.
69. Stassen M, Schmitt E, Bopp T. From interleukin-9 to T helper 9 cells. *Ann N Y Acad Sci* 2012;1247:56-68.
70. Bird JJ, Brown DR, Mullen AC et al. Helper T cell differentiation is controlled by the cell cycle. *Immunity* 1998;9:229–37.
71. Grogan JL, Mohrs M, Harmon B, Lacy DA, Sedat JW, Locksley RM. Early transcription and silencing of cytokine genes underlie polarization of T helper cell subsets. *Immunity* 2001;14:205–15.
72. Stockinger B, Bourgeois C, Kassiotis G. CD4+ memory T cells: functional differentiation and homeostasis. *Immunol Rev* 2006;211:39-48.
73. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010;327(5969):1098-102.
74. Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol* 1989;7:145-173.
75. Suzuki Y, Orellana MA, Schreiber RD, Remington JS. Interferon-gamma: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii*. *Science* 1988;240:516-518.

76. Suen WE, Bergman CM, Hjelmstrom P, Ruddle NH. A critical role for lymphotoxin in experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med* 1997;186:1233-1240.
77. Williams MA, Tyznik AJ, Bevan MJ. Interleukin-2 signals during priming are required for secondary expansion of CD8⁺ memory T cells. *Nature* 2006;441:890-893.
78. Szabo SJ, Dighe AS, Gubler U, Murphy KM. Regulation of the interleukin (IL)-12R beta 2 subunit expression in developing T helper 1 (Th1) and Th2 cells. *J Exp Med* 1997;185:817-824.
79. Afkarian M, Sedy JR, Yang J, et al. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4⁺ T cells. *Nat Immunol* 2002;3:549-557.
80. Loetscher P, Ugucioni M, Bordoli L, et al. CCR5 is characteristic of Th1 lymphocytes. *Nature* 1998;391:344-345.
81. Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 2007;8:145-153.
82. Finotto S, Neurath MF, Glickman JN, et al. Development of spontaneous airway changes consistent with human asthma in mice lacking T-bet. *Science* 2002;295:336-338.
83. Kaplan MH, Sun YL, Hoey T, Grusby MJ. Impaired IL-12 responses and enhanced development of Th2 cells in Stat4-deficient mice. *Nature* 1996;382:174-177.
84. Munk RB, Sugiyama K, Ghosh P, Sasaki CY, Rezanka L, Banerjee K, Takahashi H, Sen R, Longo DL. Antigen-independent IFN- γ production by human naïve CD4 T cells activated by IL-12 plus IL-18. *PLoS One* 2011;6(5):e18553.
85. Mullen AC, Hutchins AS, High FA, et al. Hlx is induced by and genetically interacts with T-bet to promote heritable T(H)1 gene induction. *Nat Immunol* 2002;3:652-658.
86. Djuretic IM, Levanon D, Negreanu V, Groner Y, Rao A, Ansel KM. Transcription factors T-bet and Runx3 cooperate to activate Ifng and silence Il4 in T helper type 1 cells. *Nat Immunol* 2007;8:145-153.
87. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol* 2007;7:179-190.
88. Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2:933-944.
89. Swain SL, Weinberg AD, English M, Huston G. IL-4 directs the development of Th2-like helper effectors. *J Immunol* 1990;145:3796-3806.
90. Coffman RL, Seymour BW, Hudak S, Jackson J, Rennick D. Antibody to interleukin-5 inhibits helminth-induced eosinophilia in mice. *Science* 1989;245:308-310.
91. Longphre M, Li D, Gallup M, et al. Allergen-induced IL-9 directly stimulates mucin transcription in respiratory epithelial cells. *J Clin Invest* 1999;104:1375-1382.

92. Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL, O'Garra A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683-765.
93. Wynn TA. IL-13 effector functions. *Annu Rev Immunol* 2003;21:425-456.
94. Fort MM, Cheung J, Yen D, et al. IL-25 induces IL-4, IL-5, and IL-13 and Th2-associated pathologies in vivo. *Immunity* 2001;15:985-995.
95. Zaiss DM, Yang L, Shah PR, Kobie JJ, Urban JF, Mosmann TR. Amphiregulin, a TH2 cytokine enhancing resistance to nematodes. *Science* 2006; 314:1746.
96. Schmitz J, Owyang A, Oldham E, et al. IL-33, an interleukin-1-like cytokine that signals via the IL-1 receptor-related protein ST2 and induces T helper type 2-associated cytokines. *Immunity* 2005;23:479-490.
97. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science* 1997;277:2005-2007.
98. Ebert LM, Schaerli P, Moser B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. *Mol Immunol* 2005;42(7):799-809.
99. Finkelman FD, Morris SC, Orekhova T, et al. Stat6 regulation of in vivo IL-4 responses. *J Immunol* 2000;164:2303-2310.
100. Zhu J, Min B, Hu-Li J, et al. Conditional deletion of Gata3 shows its essential function in T(H)1-T(H)2 responses. *Nat Immunol* 2004;5:1157-1165.
101. Zhu J, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. Stat5 activation plays a critical role in Th2 differentiation. *Immunity* 2003;19:739-748.
102. Kim JI, Ho IC, Grusby MJ, Glimcher LH. The transcription factor c-Maf controls the production of interleukin-4 but not other Th2 cytokines. *Immunity* 1999;10:745-751.
103. Lohoff M, Mittrucker HW, Prechtel S, et al. Dysregulated T helper cell differentiation in the absence of interferon regulatory factor 4. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:11808-11812.
104. Zhu J, Jankovic D, Grinberg A, Guo L, Paul WE. Gfi-1 plays an important role in IL-2-mediated Th2 cell expansion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103:18214-18219.
105. Zhu J, Yamane H, Cote-Sierra J, Guo L, Paul WE. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Res* 2006;16:3-10.
106. Ouyang W, Lohning M, Gao Z, et al. Stat6-independent GATA-3 autoactivation directs IL-4-independent Th2 development and commitment. *Immunity* 2000;12:27-37.
107. Amsen D, Blander JM, Lee GR, Tanigaki K, Honjo T, Flavell RA. Instruction of distinct CD4 T helper cell fates by different notch ligands on antigenpresenting cells. *Cell* 2004;117:515-526.

108. Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory T cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol* 2004;22:531-562.
109. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol* 1995;155:1151-1164.
110. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, et al. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat Genet* 2001;27:18-20.
111. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-1061.
112. Chen W, Jin W, Hardegen N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med* 2003;198:1875-1886.
113. Li MO, Sanjabi S, Flavell RA. Transforming growth factor-beta controls development, homeostasis, and tolerance of T cells by regulatory T cell-dependent and -independent mechanisms. *Immunity* 2006;25:455-471.
114. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* 1999;190:995-1004.
115. Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature* 2007;450:566-569.
116. Turka LA, Walsh PT. IL-2 signaling and CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells. *Front Biosci.* 2008 Jan 1;13:1440-6.
117. Taams LS, Akbar AN. Peripheral generation and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 2005;293:115-31.
118. Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, et al. Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 2006;203(7):1693-700.
119. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003;4:330-336.
120. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* 2007;8:277-284.
121. Hori S, Nomura T, Sakaguchi S. Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3. *Science* 2003;299:1057-1061.

122. Wan YY, Flavell RA. Regulatory T-cell functions are subverted and converted owing to attenuated Foxp3 expression. *Nature* 2007;445:766-770.
123. Davidson TS, DiPaolo RJ, Andersson J, Shevach EM. Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta mediated induction of Foxp3⁺ T regulatory cells. *J Immunol* 2007;178:4022-4026.
124. Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 2007;178:280-290.
125. Liu Y, Zhang P, Li J, Kulkarni AB, Perruche S, Chen W. A critical function for TGF-beta signaling in the development of natural CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ regulatory T cells. *Nat Immunol* 2008;9:632-640.
126. Marie JC, Letterio JJ, Gavin M, Rudensky AY. TGF-beta1 maintains suppressor function and Foxp3 expression in CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *J Exp Med* 2005;201:1061-1067.
127. Tone Y, Furuuchi K, Kojima Y, Tykocinski ML, Greene MI, Tone M. Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer. *Nat Immunol* 2008;9:194-202.
128. Burchill MA, Yang J, Vogtenhuber C, Blazar BR, Farrar MA. IL-2 receptor beta-dependent STAT5 activation is required for the development of Foxp3⁺ regulatory T cells. *J Immunol* 2007;178:280-290.
129. Yao Z, Fanslow WC, Seldin MF, et al. Herpesvirus Saimiri encodes a new cytokine, IL-17, which binds to a novel cytokine receptor. *Immunity* 1995;3:811-821.
130. Hymowitz SG, Filvaroff EH, Yin JP, et al. IL-17s adopt a cystine knot fold: structure and activity of a novel cytokine, IL-17F, and implications for receptor binding. *EMBO J* 2001;20:5332-5341.
131. Shalom-Barak T, Quach J, Lotz M. Interleukin-17-induced gene expression in articular chondrocytes is associated with activation of mitogenactivated protein kinases and NF-κB. *J Biol Chem* 1998;273:27467–27473.
132. Schwandner R, Yamaguchi K, Cao Z. Requirement of tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF)6 in interleukin-17 signal transduction. *J Exp Med* 2000;191:1233–1240.
133. Chang SH, Park H, Dong C. Act1 adaptor protein is an immediate and essential signaling component of interleukin-17 receptor. *J Biol Chem* 2006;281:35603-35607.
134. Kolls JK, Linden A. Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* 2004;21:467–476.
135. Park H, Li Z, Yang XO et al. A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin-17. *Nature Immunol* 2005;6:1133–1141.
136. Ye P, Rodriguez FH, Kanaly S, et al. Requirement of interleukin-17 receptor

- signaling for lung CXC chemokine and granulocyte colony-stimulating factor expression, neutrophil recruitment, and host defense. *J Exp Med* 2001;194:519–527.
137. Korn T, Bettelli E, Gao W, et al. IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells. *Nature* 2007;448:484-487.
138. Zheng Y, Danilenko DM, Valdez P, et al. Interleukin-22, a T(H)17 cytokine, mediates IL-23-induced dermal inflammation and acanthosis. *Nature* 2007;445:648-651.
139. Veldhoen M, Hirota K, Westendorf AM, et al. The aryl hydrocarbon receptor links TH17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature* 2008;453:106-109.
140. Zenewicz LA, Yancopoulos GD, Valenzuela DM, Murphy AJ, Karow M, Flavell RA. Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. *Immunity* 2007;27:647-659.
141. Zheng Y, Valdez PA, Danilenko DM, et al. Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nat Med* 2008;14:282-289.
142. Acosta-Rodriguez EV, Rivino L, Geginat J, et al. Surface phenotype and antigenic specificity of human interleukin 17-producing T helper memory cells. *Nat Immunol* 2007;8:639-646.
143. Sutton C, Brereton C, Keogh B, Mills KH, Lavelle EC. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17-producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 2006;203:1685-1691.
144. Ivanov II, McKenzie BS, Zhou L, et al. The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* 2006;126:1121-1133.
145. Yang XO, Pappu BP, Nurieva R, et al. T helper 17 lineage differentiation is programmed by orphan nuclear receptors ROR α and ROR γ . *Immunity* 2008;28:29-39.
146. Harris TJ, Grosso JF, Yen HR, et al. Cutting edge: An in vivo requirement for STAT3 signaling in TH17 development and TH17-dependent autoimmunity. *J Immunol* 2007;179:4313-4317.
147. Ciofani M, Madar A, Galan C, et al. A validated regulatory network for Th17 cell specification. *Cell*. 2012; 151(2):289-303.
148. Unutmaz D. RORC2: the master of human Th17 cell programming. *Eur J Immunol*. 2009 Jun;39(6):1452-5.
149. Li MO, Wan YY, Flavell RA. T cell-produced transforming growth factor-beta1 controls T cell tolerance and regulates Th1- and Th17-cell differentiation. *Immunity* 2007;26:579-591.
150. Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006;24:179-189.

151. Mus AM, Cornelissen F, Asmawidjaja PS, van Hamburg JP, Boon L, Hendriks RW, Lubberts E. Interleukin-23 promotes Th17 differentiation by inhibiting T-bet and FoxP3 and is required for elevation of interleukin-22, but not interleukin-21, in autoimmune experimental arthritis. *Arthritis Rheum* 2010;62(4):1043-50.
152. Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat Immunol* 2007;8(9):942-9.
153. Schumann J, Muller U, Blessing M. TGF- β signaling in T cells is not essential for Th17 cell development in the mouse. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2012;26(3):357-66.
154. Murphy KM, Stockinger B. Effector T cell plasticity: flexibility in the face of changing circumstances. *Nat Immunol* 2010;11(8):674-80.
155. O'Shea JJ, Paul WE. Mechanisms underlying lineage commitment and plasticity of helper CD4+ T cells. *Science* 2010;327(5969):1098-102.
156. Basu R, Hatton RD, Weaver CT. The Th17 family: flexibility follows function. *Immunol Rev*. 2013;252(1):89-103.
157. Cohen CJ, Crome SQ, MacDonald KG, Dai EL, Mager DL, Levings MK. Human Th1 and Th17 cells exhibit epigenetic stability at signature cytokine and transcription factor loci. *J Immunol*. 2011 Dec 1;187(11):5615-26.
158. Carbo A, Hontecillas R, Kronsteiner B, et al. Systems Modeling of Molecular Mechanisms Controlling Cytokine-driven CD4+ T Cell Differentiation and Phenotype Plasticity. *PLoS Comput Biol*. 2013; 9(4): e1003027.
159. Reis e Sousa C, Edwards AD, Manickasingham SP, Schulz O. Conditioning of dendritic cells by pathogen derived stimuli. *Immunobiology* 2001; 204:595-7.
160. Maldonado RA, Irvine DJ, Schreiber R, Glimcher LH. A role for the immunological synapse in lineage commitment of CD4 lymphocytes. *Nature* 2004;431(7008):527-32.
161. Boyuma A. Separation of white blood cells. *Nature* 1964;204:793-4.
162. Van Voorhis WC, Hair LS, Steinman RM, Kaplan G. Human dendritic cells. Enrichment and characterization from peripheral blood. *J Exp Med* 1982;155(4):1172-87.
163. Reddy A, Sapp M, Feldman M, Subklewe M, Bhardwaj N. A monocyte conditioned medium is more effective than defined cytokines in mediating the terminal maturation of human dendritic cells. *Blood* 1997;90(9):3640-6.
164. Jonuleit H, Kühn U, Müller G, Steinbrink K, Paragnik L, Schmitt E, Knop J, Enk AH. Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol* 1997;27(12):3135-42.
165. Geissmann F, Prost C, Monnet JP, Dy M, Brousse N, Hermine O. Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor

and interleukin 4, induces differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells. *J Exp Med* 1998;187(6):961-6.

166. Li H, Nooh MM, Kotb M, Re F. Commercial peptidoglycan preparations are contaminated with superantigen-like activity that stimulates IL-17 production. *J Leukoc Biol* 2008;83(2):409-18.

167. Dziarski R, Gupta D. Peptidoglycan recognition in innate immunity. *J Endotoxin Res* 2005;11(5):304-10.

168. Nigro G, Fazio LL, Martino MC, et al. Muramylpeptide shedding modulates cell sensing of *Shigella flexneri*. *Cell Microbiol* 2008;10(3):682-95.

169. Asong J, Wolfert MA, Maiti KK, Miller D, Boons GJ. Binding and Cellular Activation Studies Reveal That Toll-like Receptor 2 Can Differentially Recognize Peptidoglycan from Gram-positive and Gram-negative Bacteria. *J Biol Chem* 2009;284(13):8643-53.

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

171. Hertz CJ, Kiertscher SM, Godowski PJ, Bouis DA, Norgard MV, Roth MD, Modlin RL. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol* 2001;166:2444–2450.

172. Cautain B, Damoiseaux J, Bernard I, et al. Essential role of TGF-beta in the natural resistance to experimental allergic encephalomyelitis in rats. *Eur J Immunol* 2001;31(4):1132-40.

173. Vanden Eijnden S, Goriely S, De Wit D, Willems F, Goldman M. IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human. *Eur J Immunol* 2005;35:469–475.

174. Wang LF, Chiu HC, Hsu CJ, Liu CY, Hsueh YH, Miaw SC. Epicutaneous sensitization with a protein antigen induces Th17 cells. *J Dermatol Sci* 2009;54(3):192-7.

175. Meng G, Rutz M, Schiemann M, et al. Antagonistic antibody prevents toll-like receptor 2-driven lethal shock-like syndromes. *J Clin Invest* 2004;113(10):1473-81.

176. Ziegler G, Freyer D, Harhausen D, Khojasteh U, Nietfeld W, Trendelenburg G. Blocking TLR2 in vivo protects against accumulation of inflammatory cells and neuronal injury in experimental stroke. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011;31(2):757-66.

177. Paik YH, Lee KS, Lee HJ, et al. Hepatic stellate cells primed with cytokines upregulate inflammation in response to peptidoglycan or lipoteichoic acid. *Lab Invest* 2006;86(7):676-86.

178. Arslan F, Smeets MB, O'Neill LA, et al. Myocardial ischemia/reperfusion injury is mediated by leukocytic toll-like receptor-2 and reduced by systemic administration of a novel anti-toll-like receptor-2 antibody. *Circulation* 2010;121(1):80-90.

179. Kwok SK, Cho ML, Her YM, et al. TLR2 ligation induces the production of IL-23/IL-17 via IL-6, STAT3 and NF- κ B pathway in patients with primary Sjogren's syndrome. *Arthritis Res Ther* 2012;14(2):R64.
180. Reynolds JM, Pappu BP, Peng J, et al. Toll-like receptor 2 signaling in CD4(+) T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease. *Immunity* 2010;32(5):692-702.
181. Hoene V, Peiser M, Wanner R. Human monocyte-derived dendritic cells express TLR9 and react directly to the CpG-A oligonucleotide D19. *J Leukoc Biol* 2006;80(6):1328-36.
182. De Gassart A, Camosseto V, Thibodeau J, Ceppi M, Catalan N, Pierre P, Gatti E. MHC class II stabilization at the surface of human dendritic cells is the result of maturation-dependent MARCH I down-regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2008;105(9):3491-6.
183. Reis e Sousa C. Dendritic cells in a mature age. *Nat Rev Immunol* 2006;6(6):476-83.
184. Ida JA, Shrestha N, Desai S, Pahwa S, Hanekom WA, Haslett PA. A whole blood assay to assess peripheral blood dendritic cell function in response to Toll-like receptor stimulation. *J Immunol Methods* 2006;310(1-2):86-99.
185. Villablanca EJ, Mora JR. A two-step model for Langerhans cell migration to skin-draining LN. *Eur J Immunol* 2008;38(11):2975-80.
186. Prechtel AT, Steinkasserer A. CD83: an update on functions and prospects of the maturation marker of dendritic cells. *Arch Dermatol Res* 2007;299(2):59-69.
187. Reynolds JM, Pappu BP, Peng J, et al. Toll-like receptor 2 signaling in CD4(+) T lymphocytes promotes T helper 17 responses and regulates the pathogenesis of autoimmune disease. *Immunity* 2010;32(5):692-702.
188. Molinero LL, Miller ML, Evaristo C, Alegre ML. High TCR stimuli prevent induced regulatory T cell differentiation in a NF- κ B-dependent manner. *J Immunol* 2011;186(8):4609-17.
189. Okamoto K, Iwai Y, Oh-Hora M, et al. IkappaBzeta regulates T(H)17 development by cooperating with ROR nuclear receptors. *Nature* 2010;464(7293):1381-5.
190. LeibundGut-Landmann S, Gross O, Robinson MJ, et al. Syk- and CARD9-dependent coupling of innate immunity to the induction of T helper cells that produce interleukin 17. *Nat Immunol* 2007;8(6):630-8.
191. Wang CQ, Cruz-Inigo AE, Fuentes-Duculan J, et al. Th17 cells and activated dendritic cells are increased in vitiligo lesions. *PLoS One* 2011;6(4):e18907.
192. Zheng SG, Gray JD, Ohtsuka K, Yamagiwa S, Horwitz DA. Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors. *J Immunol* 2002;169:4183-4189.
193. Gorelik L, Flavell RA. Transforming growth factor- in T-cell biology. *Nat Rev Immunol* 2002;2:46-53.

194. Zhou L, Lopes JE, Chong MM, et al. TGF-beta-induced Foxp3 inhibits T(H)17 cell differentiation by antagonizing RORgammat function. *Nature* 2008;453:236–240.
195. George TC, Bilsborough J, Viney JL, Norment AM. High antigen dose and activated dendritic cells enable Th cells to escape regulatory T cell-mediated suppression in vitro. *Eur J Immunol* 2003;33(2):502-11.
196. Zhou L, Ivanov II, Spolski R, et al. IL-6 programs Th17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways. *Nat Immunol* 2007;8:967–974.
197. Zeiser R, Penack O, Holler E, Idzko M. Danger signals activating innate immunity in graft-versus-host disease. *J Mol Med (Berl)* 2011;89(9):833-45.
198. Sakuraba A, Sato T, Kamada N, Kitazume M, Sugita A, Hibi T. Th1/Th17 immune response is induced by mesenteric lymph node dendritic cells in Crohn's disease. *Gastroenterology* 2009;137(5):1736-45.
199. Rizzetto L, Kuka M, De Filippo C, et al. Differential IL-17 production and mannan recognition contribute to fungal pathogenicity and commensalism. *J Immunol* 2010;184(8):4258-68.
200. Smeekens SP, van de Veerdonk FL, van der Meer JW, Kullberg BJ, Joosten LA, Netea MG. The *Candida* Th17 response is dependent on mannan- and beta-glucan-induced prostaglandin E2. *Int Immunol* 2010;22(11):889-95.
201. Herrmann I, Kellert M, Schmidt H, Mildner A, Hanisch UK, Brück W, Prinz M, Nau R. *Streptococcus pneumoniae* Infection aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis via Toll-like receptor 2. *Infect Immun* 2006;74(8):4841-8.
202. Summers SA, Steinmetz OM, Gan PY, Ooi JD, Odobasic D, Kitching AR, Holdsworth SR. Toll-like receptor 2 induces Th17 myeloperoxidase autoimmunity while Toll-like receptor 9 drives Th1 autoimmunity in murine vasculitis. *Arthritis Rheum* 2011;63(4):1124-35.
203. Tadema H, Heeringa P, Kallenberg CG. Bacterial infections in Wegener's granulomatosis: mechanisms potentially involved in autoimmune pathogenesis. *Curr Opin Rheumatol* 2011;23(4):366-71.
204. Teixeira-Coelho M, Cruz A, Carmona J, et al. TLR2 deficiency by compromising p19 (IL-23) expression limits Th 17 cell responses to *Mycobacterium tuberculosis*. *Int Immunol* 2011;23(2):89-96.
205. Nyirenda MH, Sanvito L, Darlington PJ, et al. TLR2 stimulation drives human naive and effector regulatory T cells into a Th17-like phenotype with reduced suppressive function. *J Immunol* 2011;187(5):2278-90.

Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Ehsan Aliahmadi, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: "Polarisierung von naiven CD4⁺ T-Lymphozyten zu IL-17-produzierenden T_H17-Zellen durch TLR2 stimulierte Dendritische Zellen" selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE - www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit den Betreuern angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum

Unterschrift

Anteilserklärung an etwaigen erfolgten Publikationen

Ehsan Aliahmadi hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Aliahmadi E, Gramlich R, Grützkau A, Hitzler M, Krüger M, Baumgrass R, Schreiner M, Wittig R, Peiser M. *TLR2-activated human langerhans cells promote Th17 polarization via IL-1b, TGF-b and IL-23*. European Journal of Immunology 2009, 39: 1-10.

Beitrag im Einzelnen: Gemeinsame Gestaltung der Arbeitshypothese und der experimentellen Methodik, eigenständige experimentelle Laborarbeit unter Aufsicht, eigenständige Auswertung und Präsentation der Ergebnisse, gemeinsame Diskussion der Ergebnisse und Methodik, gemeinsame Gestaltung und Verfassung der Veröffentlichungsschrift

Unterschrift, Datum und Stempel des betreuenden Hochschullehrers/der betreuenden Hochschullehrerin

Unterschrift des Doktoranden/der Doktorandin

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater PD Dr. Matthias Peiser für seine wissenschaftliche Anleitung, für seine ständige Ansprechbarkeit und Unterstützung und für die Heranführung an das wissenschaftliche Schreiben.

Mein besonderer Dank gilt PD Dr. Reinhard Wanner, der vor Abschluss dieser Arbeit unerwartet viel zu früh verstarb und seine Familie hinterließ.

Ich danke meinem guten Freund Dr. med. Robert Gramlich dafür, dass er mein Interesse an einer experimentellen Doktorarbeit geweckt hat und mich stets motivierend durch das Studium der Medizin begleitete.

Ich danke außerdem den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Molekularbiologie und Bioinformatik der Charité, der Firma Mologen und des Instituts für Klinische Pharmakologie und Toxikologie der Charité für ihre Hilfe und Unterstützung. Ich danke insbesondere Prof. Dr. Stahlmann und Prof. Dr. Wittig für die Ermöglichung dieser Arbeit an ihren Instituten.

Besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester. Ihre Liebe und Geduld ermöglichten mir eine gute Bildung und helfen mir somit in jeder Phase meines Lebens, die richtigen Entscheidungen zu treffen.