

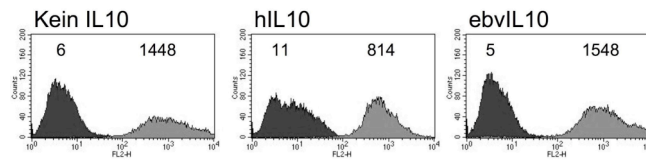
III. Ergebnisse

III.1. Einfluss von ebvIL10 auf den Phänotyp dendritischer Zellen

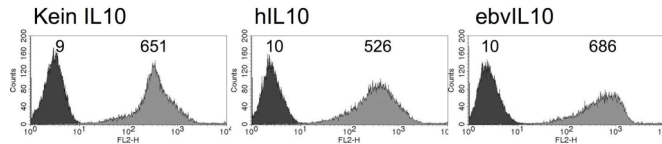
Wir untersuchten den Effekt von ebvIL10 auf den Phänotyp dendritischer Zellen. Es wurde der Einfluss auf Oberflächenmarker der Antigen-Präsentation, Kostimulation, Adhäsion und Toleranzinduktion gemessen. Dafür verwendeten wir DC in verschiedenen Reifungsstadien: unreife, zuvor gereifte und gleichzeitig mit LPS und IL10 gereifte DC. Zum Vergleich wurde zusätzlich die Wirkung von hIL10 untersucht.

Die Abbildung 8 zeigt exemplarisch die Expression verschiedener Oberflächenmoleküle (MHC-Klasse-I, MHC-Klasse-II, CD86, IDO, ICAM1 und DC-SIGN) zum Zeitpunkt der Untersuchung.

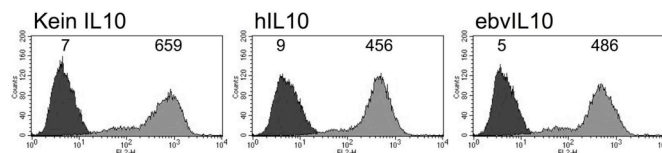
MHCI



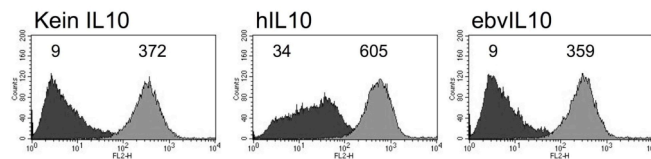
MHCII



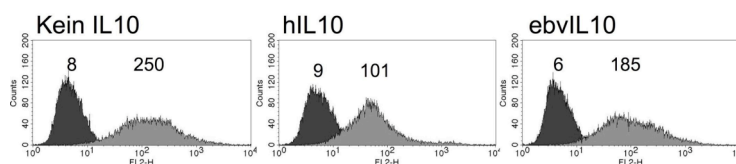
ICAM1



DC-SIGN



CD86



IDO

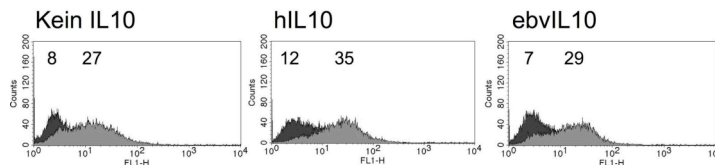


Abb. 8: Expression von MHC I, MHC II, CD86, IDO, ICAM1 und DC-SIGN.

iDC wurden für zwei Tage mit 1 µg/ml LPS in Abwesenheit oder Anwesenheit von 25 ng/ml IL10 (hIL10 oder ebvIL10) behandelt. Die Expression der Oberflächenmoleküle wurde nach zwei Tagen mittels FACS-Analyse bestimmt. Die dunkelgrauen Kurven entsprechen der Isotyp gematchten Kontrolle, die hellgraue Kurve dem Antikörper. Auf der x-Achse ist die Fluoreszenz Intensität (log Scala, 4 Dekaden) aufgetragen, auf der y-Achse die relative Zellzahl. In den Ecken ist die Mean Fluorescence Intensity (MFI) angezeigt.

III.1.1 Wirkung von ebvIL10 auf LPS - exponierte dendritische Zellen

III.1.1.1 Effekt von ebvIL10 auf Moleküle der Antigenpräsentation

Die LPS-induzierte Reifung bewirkt auf DC eine Hochregulation der klassischen MHC-Moleküle (MHC-Klasse-I und MHC-Klasse-II) und eine Herabregulation der nicht-klassischen MHC-Moleküle, wie z.B. HLA-DM.

Für hIL10 konnten wir nachweisen, dass die LPS induzierte Hochregulation der klassischen MHC-Moleküle statistisch signifikant geblockt wurde. Diesen Effekt zeigte ebvIL10 nicht.

Ebenfalls hatte ebvIL10 keinen Einfluss auf das nicht-klassische MHC-Molekül HLA-DM, während hIL10 eine signifikante Hochregulation bewirkte.

Zwischen dem Einfluss von hIL10 und ebvIL10 auf die Expression der Oberflächenmoleküle MHC II und HLA-DM konnte ein statistisch signifikanter Unterschied nachgewiesen werden (Abb. 9).

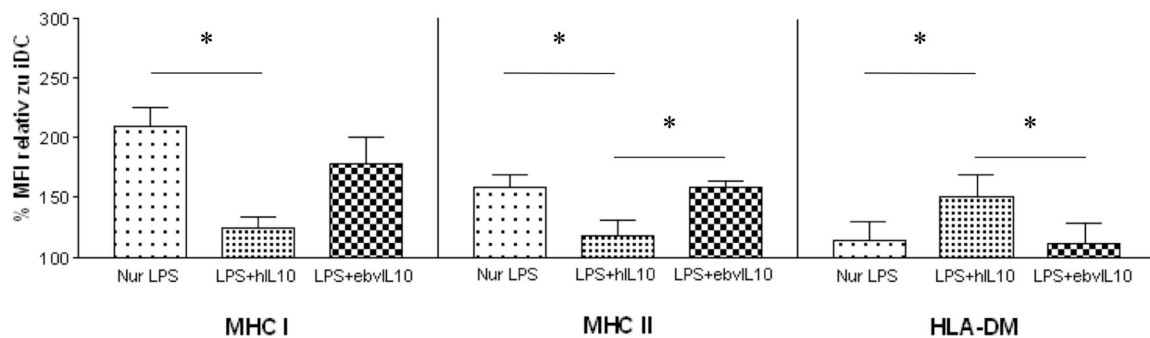


Abb. 9: Einfluss von ebvIL10 im Vergleich zu hIL10 auf die LPS-induzierten Veränderungen der klassischen MHC-Moleküle (MHCI, MHCII) und des nicht-klassischen MHC-Moleküls HLA-DM. iDC wurden für zwei Tage mit 1µg/ml LPS in Abwesenheit (Nur LPS) oder Anwesenheit von IL10 (25 ng/ml hIL10 oder ebvIL10) behandelt. Die Expression der Moleküle wurde nach zwei Tagen mittels FACS-Analyse bestimmt. Parallel wurde die MFI unbehandelter iDC gemessen und als 100% gesetzt (x-Achse). Auf der y-Achse ist der Prozentsatz der MFI relativ zu iDC aufgetragen. Die Ergebnisse sind als Mean +/- Standard Error Mean (SEM) angegeben und repräsentieren vier oder mehr Experimente mit DC unterschiedlicher Spender. Es wurde der gepaarte Student's t test verwendet, (*, p<0.05).

III.1.1.2 Einfluss von ebvIL10 auf kostimulatorische Oberflächenmoleküle

Die LPS-induzierte Reifung bewirkt eine Hochregulation der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86, B7-H1 und B7-DC auf DC.

Es zeigte sich, dass ebvIL10 keinen Einfluss auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86, B7-H1 und B7-DC hatte. Für hIL10 konnte gezeigt werden, dass es die Hochregulation von CD80, CD86, B7-DC und B7-H1 signifikant blockierte. Des Weiteren konnten wir einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen dem Einfluss von hIL10 und ebvIL10 auf die Expression der Oberflächenmoleküle CD86, B7-H1 und B7-DC nachweisen (Abb. 10).

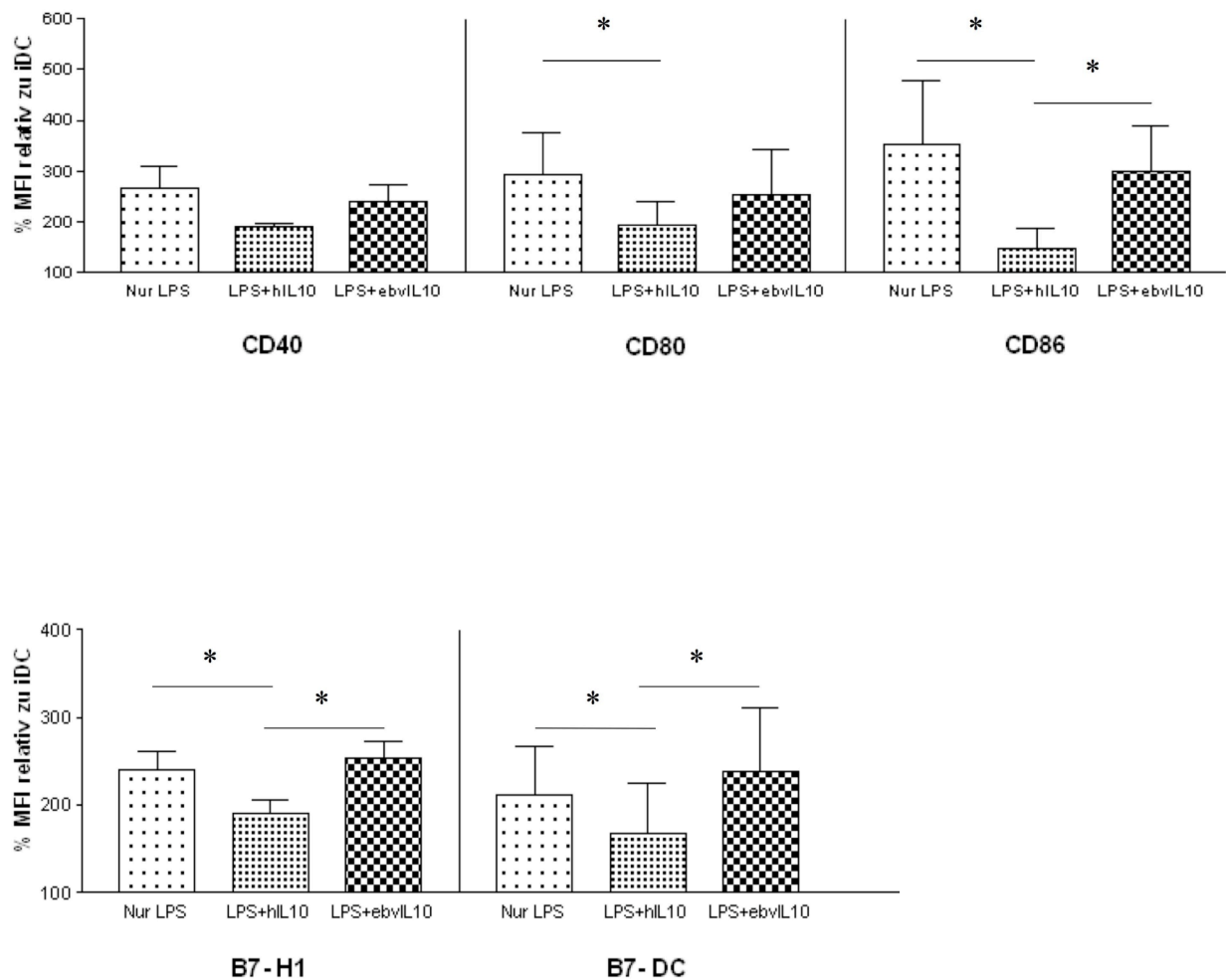


Abb. 10: Einfluss von ebvIL10 im Vergleich zu hIL10 auf die LPS-induzierten Veränderungen der kostimulatorischen Moleküle CD40, CD80, CD86, B7-H1 und B7-DC. iDC wurden für zwei Tage mit 1µg/ml LPS in Abwesenheit (Nur LPS) oder Anwesenheit von IL10 (25 ng/ml hIL10 oder ebvIL10) behandelt. Die Expression der Moleküle wurde nach zwei Tagen mittels FACS-Analyse bestimmt. Parallel wurde die MFI un behandelter iDC gemessen und als 100% gesetzt (x-Achse). Der Prozentsatz der MFI relativ zu iDC ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Ergebnisse sind als Mean +/- SEM angegeben und repräsentieren drei oder mehr Experimente (für CD80 zwei Experimente) mit DC unterschiedlicher Spender. Es wurde der gepaarte Student's t test verwendet. (*, p<0.05).

III.1.1.3 Auswirkung von ebvIL10 auf Adhäsionsmoleküle dendritischer Zellen

Die LPS-induzierte Reifung bewirkt eine Hochregulation der Adhäsionsmoleküle CD11c, CD18 und ICAM1 auf DC. Die Moleküle CD44 und DC-SIGN wiederum werden durch die Reifung herunterreguliert.

Für ebvIL10 konnten wir keinen Einfluss auf die genannten Adhäsionsmoleküle während der Reifung nachweisen. hIL10 blockierte die für die Zelladhäsion relevanten Moleküle (CD11c, CD18, ICAM-1) oder bewirkte eine verstärkte Expression (CD44, DC-SIGN). Dieser Unterschied war für CD11c, ICAM1 und DC-SIGN statistisch signifikant. Für das Adhäsionsmolekül DC-SIGN konnte daneben ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen dem Einfluss von hIL10 und ebvIL10 auf die Expression nachgewiesen werden (Abb. 11 und Abb. 12).

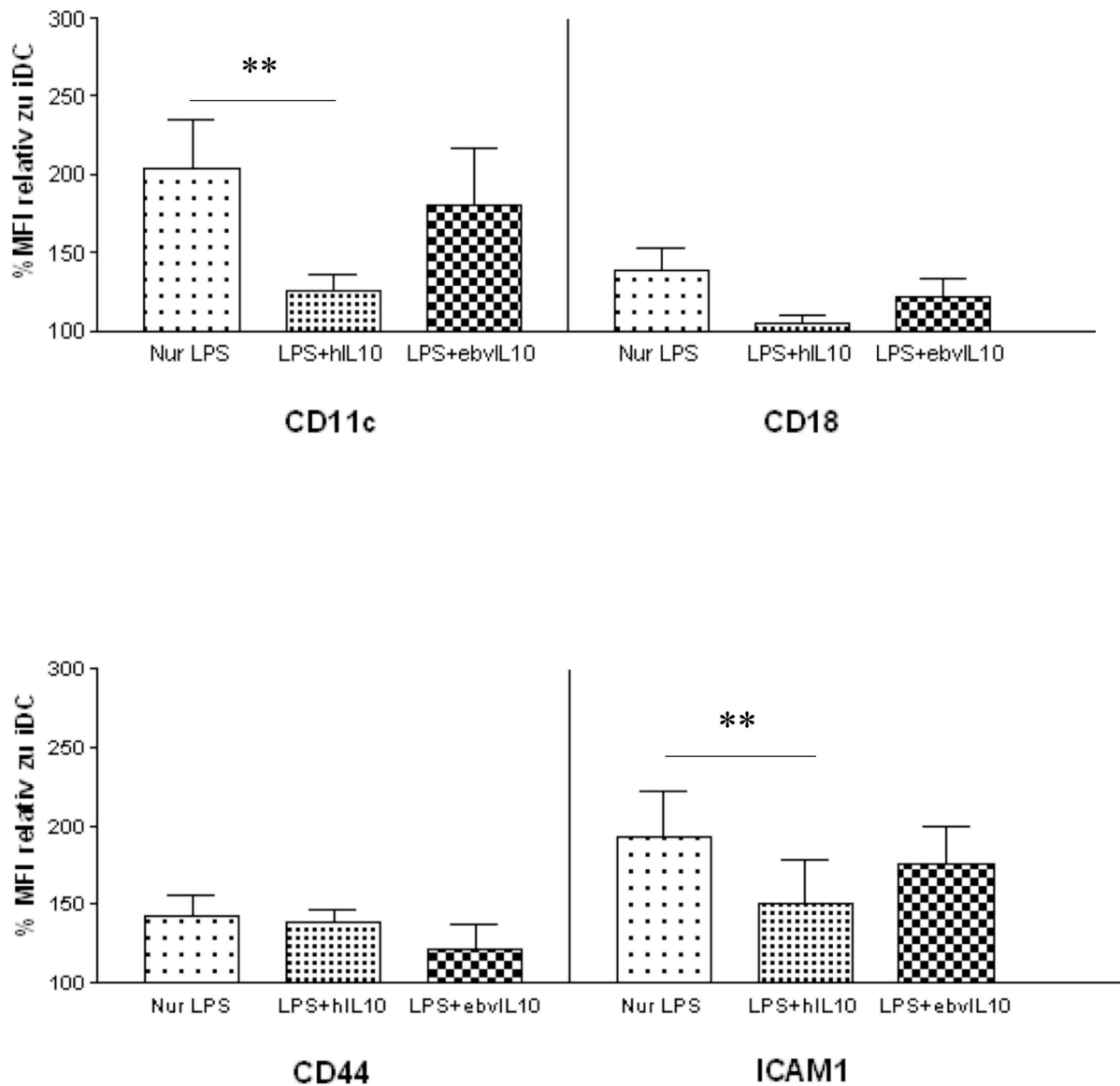


Abb. 11: Einfluss von ebvIL10 im Vergleich zu hIL10 auf die LPS-induzierten Veränderungen der Adhäsionsmoleküle CD11c, CD18, CD44 und ICAM1.

iDC wurden für zwei Tage mit 1µg/ml LPS in Abwesenheit (Nur LPS) oder Anwesenheit von IL10 (25 ng/ml hIL10 oder ebvIL10) behandelt. Die Expression der Moleküle wurde nach zwei Tagen mittels FACS-Analyse bestimmt. Parallel wurde die MFI un behandelter iDC gemessen und als 100% gesetzt (x-Achse). Der Prozentsatz der MFI relativ zu iDC ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Ergebnisse sind als Mean +/- SEM angegeben und repräsentieren drei oder mehr Experimente mit DC unterschiedlicher Spender. Die Wahrscheinlichkeit wurde im Vergleich zu DC, die nur mit LPS behandelt wurden, bestimmt. Es wurde der gepaarte Student's t test verwendet, (*, $p < 0.05$; **, < 0.001).

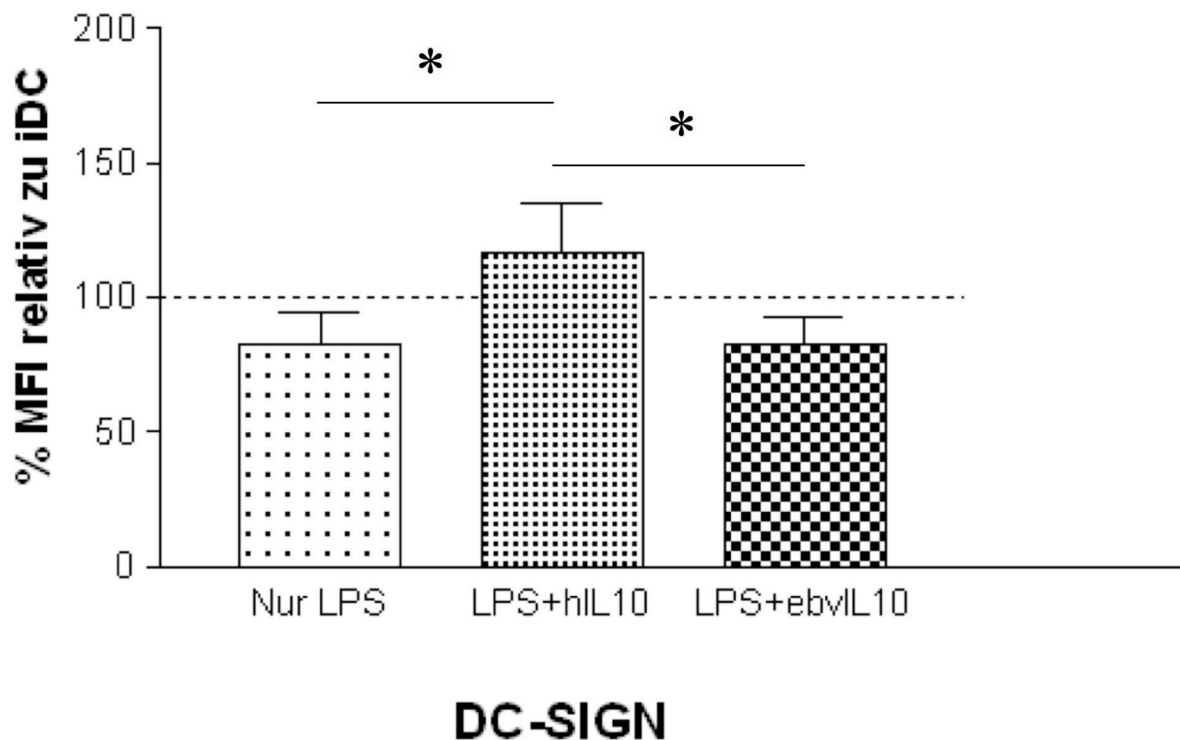


Abb. 12: Einfluss von ebvIL10 im Vergleich zu hIL10 auf die LPS-induzierten Veränderungen des Adhäsionsmoleküls DC-SIGN.

iDC wurden für zwei Tage mit 1µg/ml LPS in Abwesenheit (Nur LPS) oder Anwesenheit von IL10 (25 ng/ml hIL10 oder ebvIL10) behandelt. Die Expression der Moleküle wurde nach zwei Tagen mittels FACS-Analyse bestimmt. Parallel wurde die MFI unbehandelter iDC gemessen und als 100% gesetzt (gepunktete Linie). Der Prozentsatz der MFI relativ zu unreifen DC ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Ergebnisse sind als Mean +/- SEM angegeben und repräsentieren 7 Experimente mit DC unterschiedlicher Spender. Es wurde der gepaarte Student's t test verwendet (*, p<0.05).

III.1.1.4 Expression der Indolamin 2,3-Dioxygenase unter Einfluss von ebvIL10

Die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) ist ein wichtiges Regulationsmolekül, seine Produktion durch DC bewirkt eine Verringerung von Tryptophan und dadurch eine Unterdrückung der T-Zell-Antwort [46]. Wir untersuchten den Einfluss von ebvIL10 auf die Expression von IDO auf DC während der Reifung. Es zeigte sich, dass ebvIL10 keinen statistisch nachweisbaren Einfluss auf die Expression von IDO hatte, während die Gegenwart von hIL10 eine statistisch signifikante Hochregulation von IDO bewirkte (Abb. 13).

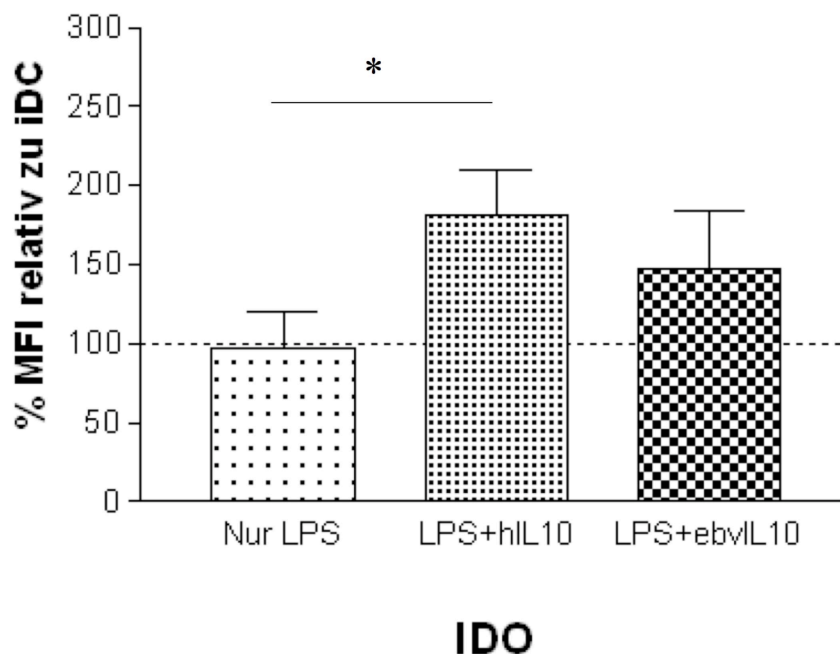


Abb. 13: Einfluss von ebvIL10 und hIL10 auf die Expression von IDO.

iDC wurden für zwei Tage mit 1µg/ml LPS in Abwesenheit (Nur LPS) oder Anwesenheit von 25 ng/ml IL10 (hIL10, ebvIL10) behandelt. Die Expression der Moleküle wurde nach zwei Tagen mittels FACS-Analyse bestimmt. Parallel wurde die MFI unbehandelter iDC gemessen und als 100% gesetzt (gepunktete Linie). Der Prozentsatz der MFI relativ zu iDC ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Ergebnisse sind als Mean +/- SEM angegeben und repräsentieren 6 Experimente mit DC unterschiedlicher Spender. Die Wahrscheinlichkeit wurde im Vergleich zu DC, die nur mit LPS behandelt wurden, bestimmt. Es wurde der gepaarte Student's t test verwendet, (*, $p < 0.05$).

III.1.1.5 Dosis-abhängiger Effekt von ebvIL10

Wir untersuchten, ob ein dosisabhängiger Effekt von ebvIL10 besteht. Dafür wählten wir exemplarisch die Oberflächenmoleküle DC-SIGN und ICAM1. Wie bereits zuvor gezeigt, blockierte hIL10 die LPS-induzierte Hochregulation von ICAM1, der maximale Effekt von hIL10 auf die Expression von ICAM1 war bei einer Konzentration von 25 ng/ml erreicht. Für ebvIL10 war es nicht möglich eine Konzentration zu finden, bei der eine Wirkung auf ICAM1 bestand (Abb.14).

Die Expression von DC-SIGN auf unreifen DC, die mit LPS behandelt wurden, nimmt ab. In Gegenwart von hIL10 jedoch erfolgt eine Hochregulation von DC-SIGN auf DC. Während der maximale Effekt für hIL10 auf die Expression von DC-SIGN bei 25 ng/ml lag, konnte ebvIL10 die Expression sogar bei Konzentrationen bis 200 ng/ml nicht signifikant beeinflussen (Abb. 15 und Abb. 16).

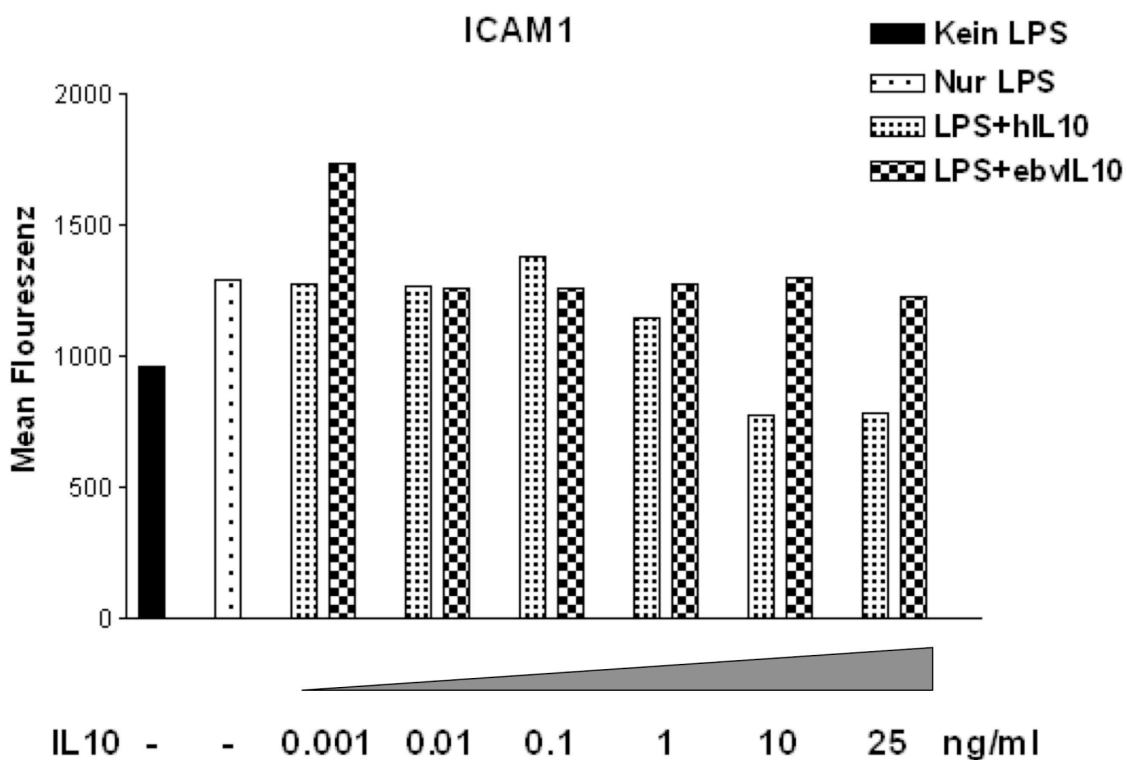


Abb. 14: Dosis-abhängiger Einfluss von ebvIL10 und hIL10 auf die Expression von ICAM1 während der LPS-induzierten Reifung dendritischer Zellen. iDC wurden für zwei Tage zeitgleich mit 1 µg/ml LPS und verschiedenen Mengen IL10 (hIL10 oder ebvIL10), wie angegeben, behandelt. Die Expression von ICAM1 wurde nach zwei Tagen mittels FACS-Analyse bestimmt. Die MFI ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Ergebnisse ergeben sich aus drei Experimenten mit DC unterschiedlicher Spender.

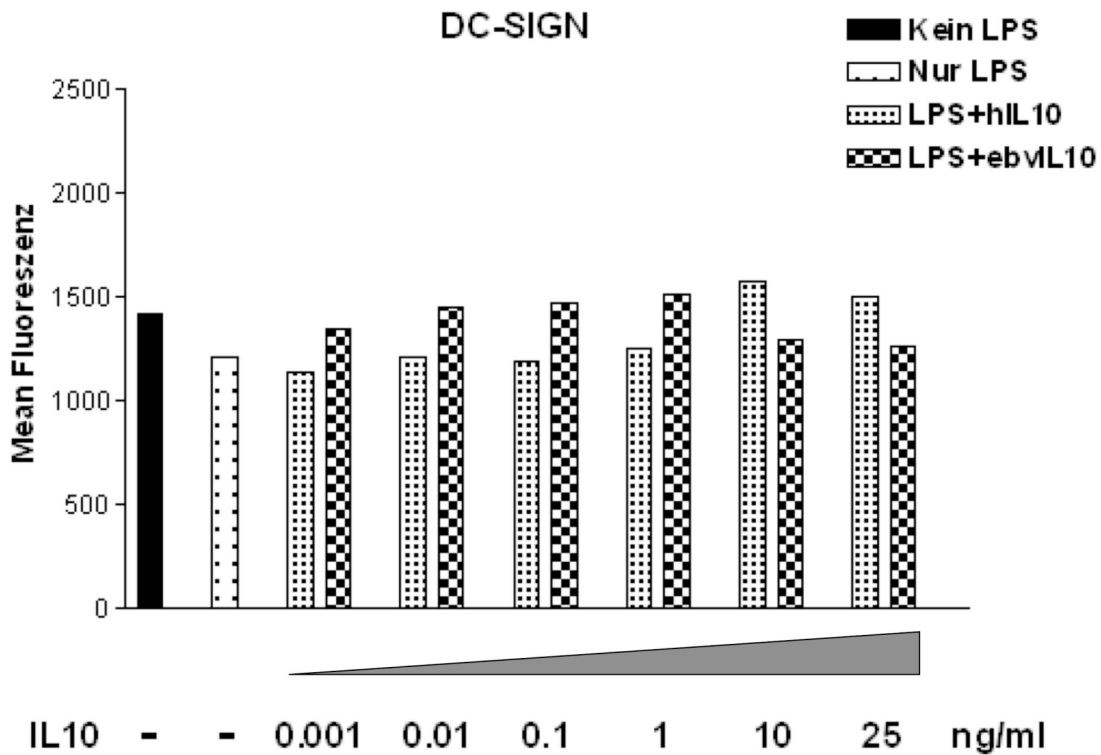


Abb. 15: Dosis-abhängiger Einfluss von ebvIL10 und hIL10 auf die Expression von DC-SIGN während der LPS-induzierten Reifung dendritischer Zellen.

iDC wurden für zwei Tage zeitgleich mit 1 μ g/ml LPS und verschiedenen Mengen IL10 (hIL10 oder ebvIL10), wie angegeben, behandelt. Die Expression von DC-SIGN wurde nach zwei Tagen mittels FACS-Analyse bestimmt. Die MFI ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Ergebnisse ergeben sich aus drei Experimenten mit DC unterschiedlicher Spender.

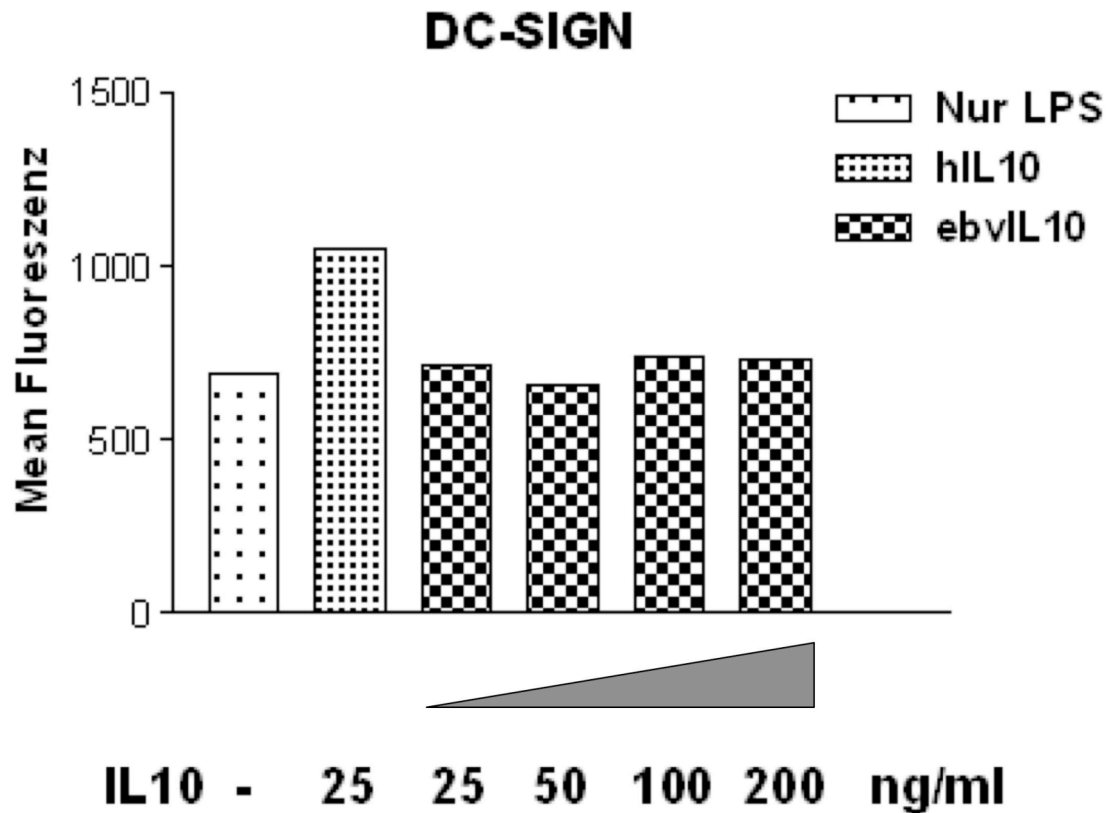


Abb. 16: Dosis-abhängiger Einfluss von ebvIL10 (25, 50, 100, 200 ng/ml) und hIL10 (25 ng/ml) auf die Expression von DC-SIGN während der LPS-induzierten Reifung dendritischer Zellen.

iDC wurden für zwei Tage zeitgleich mit 1 μ g/ml LPS und verschiedenen Mengen IL10 (hIL10 oder ebvIL10), wie angegeben, behandelt. Die Expression von DC-SIGN wurde nach zwei Tagen mittels FACS-Analyse bestimmt. Die MFI ist auf der y-Achse aufgetragen. Die Ergebnisse ergeben sich aus zwei Experimenten mit DC unterschiedlicher Spender.

III.1.1.6 Zwei verschiedene Gruppen IL10-sensitiver Moleküle auf dendritischen Zellen

Auf DC lassen sich, ausgehend von ihrer Reaktion gegenüber IL10, welches zusammen mit dem Reifungsstimulus LPS verabreicht wurde, zwei verschiedene Gruppen von Molekülen definieren (Tabelle 7). Die Expression der meisten Moleküle (Gruppe 1) wurde durch LPS verstärkt. Dieser Effekt konnte durch Gabe von hIL10 blockiert werden, für ebvIL10 zeigte sich ein deutlich geringerer Effekt. Eine kleinere Gruppe von Molekülen (Gruppe 2) zeigte eine entgegengesetzte Reaktion. Die Zugabe von hIL10 bewirkte eine verstärkte Expression dieser Moleküle. Die Zugabe von ebvIL10 bewirkte dies nicht. In der alleinigen Gegenwart von LPS lies sich keine einheitliche Reaktion der Gruppe 2 Moleküle finden, sie wurden entweder hochreguliert (CD44, HLA-DM), nach unten reguliert (DC-SIGN) oder zeigten keine Veränderung (IDO).

Tabelle 7: Klassifikation IL10-sensitiver Oberflächenmoleküle auf dendritischen Zellen

Funktion	Gruppe 1 ^a	Gruppe 2 ^b
Antigen Präsentation	MHC-Klasse-I, MHC-Klasse-II	HLA-DM
Kostimulation	CD40, CD80, CD86, B7-H1, B7-DC	<i>KD</i> ^c
Adhäsion	CD11c, CD18, ICAM1	CD44, DC-SIGN
Toleranz	<i>KD</i> ^c	IDO

^a hIL10 und in einem deutlich geringeren Maße ebvIL10 blockierten die LPS-vermittelte Hochregulation der Moleküle der Gruppe 1.

^b Moleküle in Gruppe 2 zeigten auf LPS-behandelten DC bei gleichzeitiger Zugabe von hIL10 ein entgegengesetztes Verhalten (Verstärkung der Hochregulation). Dies zeigte sich nicht für ebvIL10.

^c *KD*, Keine Daten

III.1.2 Wirkung von ebvIL10 auf reife dendritische Zellen

Wir untersuchten, ob ein Effekt von ebvIL10 und hIL10 auf reife DC besteht. Dafür wurden die Oberflächenmoleküle MHC I und DC-SIGN auf reifen DC untersucht. Die Versuche zeigten, dass weder ebvIL10 noch hIL10 einen Einfluss auf diese Moleküle hatte (Abb. 17).

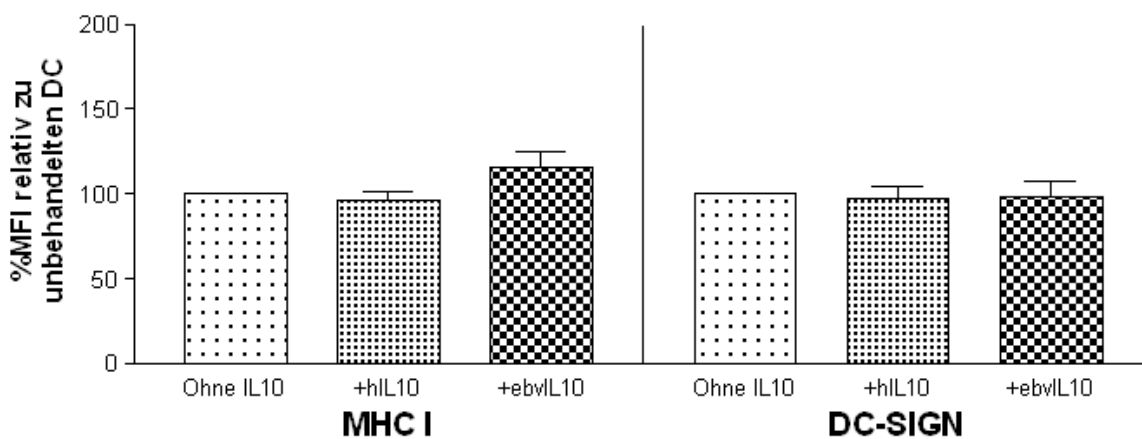


Abb. 17: Einfluss von ebvIL10 und hIL10 auf die Expression von MHC I und DC-SIGN auf reifen dendritischen Zellen.

mDC wurden für zwei Tage mit 25 ng/ml IL10 (hIL10 oder ebvIL10) behandelt oder ohne Zytokin belassen. Die Expression der Moleküle wurde nach zwei Tagen mittels FACS-Analyse bestimmt. Die MFI unbehandelter mDC wurde als 100% gesetzt. Der relative Prozentsatz der MFI ist auf der y-Achse als Mean +/- SEM aufgetragen. Die dargestellten Ergebnisse repräsentieren drei Experimenten mit DC unterschiedlicher Spender.