

Aus der Medizinischen Universitätsklinik
Abteilung für Pneumologie
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

**CCL18 und Allergie:
Die Stimulation dendritischer Zellen mit CCL18
fördert die Th2-Immunantwort**

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades
der Medizinischen Fakultät
der Albert-Ludwigs-Universität
Freiburg i. Br.

Vorgelegt 2005

von Barbara Everding
geboren in Münster

Dekan:	Prof. Dr. Christoph Peters
Erster Gutachter:	PD Dr. Gernot Zissel
Zweiter Gutachter:	PD Dr. Stefan Martin
Jahr der Promotion:	2007

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	6
1.1	ALLERGIE	6
1.2	DENDRITISCHE ZELLEN	7
1.3	DAS TH1/TH2-MODELL	9
1.4	DENDRITISCHE ZELLEN UND IHRE ROLLE BEI DER TH1/TH2-POLARISATION	11
1.5	IL-10	13
1.6	CHEMOKINE	14
1.7	CCL18.....	18
1.8	FRAGESTELLUNG	20
2	MATERIAL UND METHODEN.....	21
2.1	MATERIAL	21
2.1.1	Geräte.....	21
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	21
2.1.3	Reagenzien	22
2.1.4	Antikörper	22
2.1.5	Stimulanzen	24
2.1.6	Medien und Lösungen	24
2.2	METHODEN	25
2.2.1	Zellisolation.....	25
2.2.2	Proliferationsmessung.....	29
2.2.3	Durchflusszytometrie.....	28
2.2.4	Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) -Technik.....	30
2.2.5	Statistische Auswertung:	32
3	ERGEBNISSE.....	33
3.1	BESTIMMUNG DER CCL18-KONZENTRATION IN DC-ÜBERSTÄNDEN VON ATOPIKERN UND NORMALPERSONEN	33
3.2	ERGEBNISSE DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	34
3.2.1	Oberflächenexpression von HLA-DR:.....	34
3.2.2	Oberflächenexpression weiterer Marker.....	36
3.3	ERGEBNISSE DER PROLIFERATIONSMESSUNG	39
3.3.1	Proliferationsinduktion durch mature Dendritische Zellen im autologen Ansatz.....	39
3.3.2	Proliferationsinduktion durch mature dendritische Zellen im allogenen Ansatz	40
3.3.3	Proliferationsinduktion durch immature dendritische Zellen	41
3.4	ERGEBNISSE DER ZYTOKIN-ELISA-MESSUNG	42
3.4.1	Bestimmung der IFN- γ -Produktion durch unterschiedlich geprimte naive T-Zellen	42
3.4.2	Bestimmung der IL-13-Produktion durch unterschiedlich geprimte naive T-Zellen.....	45
3.4.3	Bestimmung der IL-4-Produktion durch unterschiedlich geprimte naive T-Zellen.....	48
3.4.4	Bestimmung der IL-10-Produktion durch unterschiedlich geprimte naive T-Zellen.....	49
4	DISKUSSION	50
4.1	UNTERSUCHUNG DER CCL18-PRODUKTION DURCH DENDRITISCHE ZELLEN VON ATOPIKERN UND NORMALPERSONEN.....	50
4.2	ERGEBNISSE DER DURCHFLUSSZYTOMETRIE	52
4.3	T-ZELL-PROLIFERATION	54
4.4	TH2-INDUKTION	57
4.5	AUSBLICK.....	60
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	61
6	LITERATUR	62
7	LEBENS LAUF	75
8	DANKSAGUNG	76

Abkürzungen:

APC	Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosin-Triphosphat
BSA	bovines Serumalbumin
Bq	Bequerel
cAMP	cyclisches Adenosin-Monophosphat
CD	Cluster of differentiation
DC	dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzym-Linked Immunosorbent Assay
FACS	Fluorescence-activated Cell Sorting System
FCS	fetal calf serum
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
GM-CSF	Granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor
HLA	Human leukocyte antigen
iDC	immature dendritische Zelle
IFN	Interferon
IL	Interleukin
Ig	Immunglobulin
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic Cell Sorting System
mDC	mature dendritische Zelle
MDC	Macrophage-derived Chemokine (CCL22)
MHC	Major histocompatibility complex
MNC	Mononukleäre Zellen
mRNA	messenger-RNA
MW	Mittelwert
NK-Zellen	natural killer Zellen
PARC	pulmonary and activation-regulated chemokine
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
PBS	phosphate buffered saline
PGE ₂	Prostaglandin E 2

PE	Phycoerythrin
PMA	Phorbolmyristataacetat
RA	naive T-Zellen
RNA	Ribonukleinsäure
SEB	Staphylokokkenenterotoxin B
SI	Stimulationsindex
SD	Standardabweichung
TARC	thymus and activation regulated chemokine (CCL17)
TGF	Transforming growth factor
Th	T-Helfer-Zelle
TLR	Toll like receptor
TMB	Tetramethylbenzidin
TNF	Tumor-Nekrosefaktor
Treg	T-regulatorische Zellen

1 EINLEITUNG

Der menschliche Körper ist täglich einer Vielzahl von Pathogenen ausgesetzt, die das Immunsystem zu immer neuen Abwehrleistungen herausfordern. Eine Entzündungsreaktion wird in Gang gesetzt, das Pathogen vernichtet, ein immunologisches Gedächtnis für bestimmte Antigene entwickelt sich. Dies geschieht in einem komplizierten Zusammenspiel von spezialisierten Zellen wie Phagozyten, Killerzellen, Helferzellen, Memoryzellen, Antikörpern, dem Komplementsystem und Botenstoffen wie Entzündungsmediatoren, Interleukinen und Chemokinen. Manche Immunsysteme reagieren jedoch fehlerhaft; wenn beispielsweise auch harmlose Antigene bekämpft werden, kann sich dies in einer allergischen Erkrankung äußern.

Die komplexen Mechanismen der Immunabwehr sind ein ständiger Gegenstand klinischer Forschung. Diese Arbeit beschäftigt sich nur mit einem kleinen Ausschnitt daraus. Wir untersuchten einen Botenstoff, das Chemokin CCL18, und seine Wirkung auf eine bemerkenswerte Zellart in der vordersten Reihe des Abwehrsystems, die dendritischen Zellen. Zudem prüften wir besonders die Rolle dieses Chemokins bei allergischen Erkrankungen.

1.1 Allergie

Unter einer Allergie wird eine Immunreaktion gegenüber ansonsten „harmlosen“ Antigenen, wie beispielsweise Pollen, Milbenkot, Tierhaaren oder bestimmten Nahrungsmitteln, verstanden. Die Allergie gehört zu einer Klasse von Immunreaktionen, die man als Hypersensibilität oder Überempfindlichkeit bezeichnet. Diese Überempfindlichkeit kann sich als Ekzem, Rhinitis, Konjunktivitis oder allergisches Asthma bronchiale manifestieren. Als Atopie bezeichnet man die Veranlagung, auf Umweltantigene mit einer übertrieben starken IgE-Antwort zu reagieren. Die IgE-vermittelte allergische Reaktion, die auch als Soforttyp-Reaktion bezeichnet wird, ist nach der Einteilung von Gell und Coombs eine Überempfindlichkeitsreaktion vom Typ I.

Nach dem ersten Allergenkontakt kommt es zur Aktivierung allergenspezifischer T-Helfer Lymphozyten und zur Bildung von spezifischen IgE-Antikörpern, die an Rezeptoren auf der Oberfläche von Immunzellen binden. Diese Sensibilisierung ist Voraussetzung für eine

allergische Reaktion. Bei erneuter Zufuhr des Allergens werden die IgE-Moleküle auf der Zellmembran der Immunzelle, z.B. der Mastzelle, vernetzt. Dadurch wird die Entleerung von Granula mit bereits präformierten Entzündungsmediatoren ausgelöst und die Neusynthese weiterer Faktoren induziert. In der Frühphase der allergischen Reaktion bewirken diese Entzündungsmediatoren, wie z.B. Histamin, eine Veränderung von Permeabilität und Tonus der Blutgefäße mit konsekutivem Ödem und Zelleinwanderung. Lokale Symptome sind Urtika, Ekzeme, Schleimhautschwellungen oder ein Asthmaanfall; eine schwere systemische Manifestation stellt der anaphylaktische Schock dar.

Durch chemotaktisch wirkende Zytokine angelockt, infiltrieren bald zusätzliche Immunzellen das Gebiet der allergischen Entzündung, darunter vor allem Lymphozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten. Sie verursachen in der Spätphase der allergischen Entzündung weitere Gewebeschäden.

Da bei atopischen Krankheiten zuviel IgE produziert wird, ist der Serum IgE Spiegel ein guter Laborparameter zum Nachweis einer atopischen Diathese. So korreliert beispielsweise die Prävalenz von allergischem Asthma bronchiale mit der Höhe des IgE Spiegels. Eine IgE Konzentration im Serum von mehr als 100 U/ml gilt als erhöht. Zusätzlich besteht häufig eine Eosinophilie.

1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DC) spielen im Immunsystem als antigenpräsentierende Zellen (APC) eine wichtige Rolle. Insbesondere bei der allergischen Entzündung sind DC bedeutend, da sie durch die Präsentation der Allergene auf ihrer Oberfläche die allergische Reaktion einleiten und zur Formierung allergen-spezifischer T-Zellen führen.

Dendritische Zellen sind unterhalb der meisten Oberflächenepithelien in der Submukosa zu finden (58). Viele Allergene gelangen über die Atemwege in den menschlichen Körper und kommen zunächst mit den Schleimhäuten in Kontakt. Die vorherrschenden antigenpräsentierenden Zellen im Atmungsepithel sind myeloide dendritische Zellen. Sie können dort als unreife oder immature dendritische Zellen Krankheitserreger phagozytieren (8) oder extrazelluläre Antigene durch Makropinozytose aufnehmen (118). Viele Allergene können aufgrund ihrer enzymatischen Aktivität Epithelbarrieren durchbrechen. Beispielsweise enthalten Kotpartikel der Hausstaubmilbe das Enzym Der p1, das die Proteine

der tight junctions in Oberflächenepithelien spaltet. Bei der Antigenaufnahme durch die DC spielt der Rezeptor DEC 205 eine Rolle (8). Nach Aufnahme der Pathogene unterliegen die immaturen DC einer Reifung (Maturierung). Sie kann auch durch eine Vielzahl weiterer Faktoren ausgelöst werden, beispielsweise führen LPS (Lipopolysaccharid, ein Bestandteil der Zellwand gramnegativer Bakterien) (25), SEB (Staphylokokkenenterotoxin B) (97) und eine Kombination aus TNF- α , IL-1 und PGE₂ (120), sowie virale Produkte und Doppelstrang-RNA (135) zur Maturierung von dendritischen Zellen. Die maturen DC besitzen im Gegensatz zu immaturen DC eine verminderte Fähigkeit zur Antigenaufnahme, da die Rezeptoren, die die Phagozytose vermitteln, auf maturen Zellen herunterreguliert werden (135). Obwohl auch immature DC in der Lage sind, Antigene mittels MHC-II zu präsentieren (140), nimmt der Transport von MHC-II-Molekülen an die Plasmamembran der DC bei der Reifung deutlich zu (90). Eine Untereinheit des MHC-II-Moleküls, HLA-DR, wurde in dieser Arbeit untersucht. Im Rahmen der Reifung der dendritischen Zellen werden auch kostimulatorische Moleküle wie CD80/B7.1 und CD86/B7.2, sowie das Glykoprotein CD83 hochreguliert (17;73;85). Außerdem exprimieren mature DC den Chemokinrezeptor CCR7, an den CCL19 (MIP-3beta) und CCL21 binden (146), und der dendritische Zellen vom Infektionsherd zu den lymphatischen Organen, etwa zu einem benachbarten Lymphknoten lockt. Viele verschiedene Stimuli regen DC zur Migration an, zum Beispiel Entzündungsschemokine, Bakterienbestandteile, TNF und IL-1 (94).

Im Lymphgewebe sind sie als reife / mature dendritische Zellen in der Lage, mittels MHC-Molekülen die fremden Peptide an der Oberfläche zu präsentieren. Studien haben gezeigt, dass eine spezifische IgE-Produktion als Reaktion auf einzelne Allergene mit bestimmten Allelen der HLA-Klasse assoziiert ist. Diese genetische Strukturvariante des MHC-Komplexes kann zu einer verstärkten Präsentation einzelner allergenabgeleiteter Peptide führen (58). Adema et al beschrieben, dass dendritische Zellen im lymphatischen Gewebe (beispielsweise Tonsillen) DC-CK1 (CCL18) produzieren, welches chemotaktisch auf naive T-Zellen wirke (1). Da neben maturen DC auch naive T-Zellen den Chemokinrezeptor CCR7 exprimieren, wirken außerdem CCL19 und CCL21 chemotaktisch auf naive T-Zellen (85). Das MHC-II-Molekül der reifen DC bindet an den CD4-Rezeptor der naiven T-Zelle. Zur Aktivierung der T-Zelle ist es notwendig, dass weitere kostimulatorische Moleküle wie CD80/B7.1 oder CD86/B7.2 an den CD28-Rezeptor der T-Zelle binden (18). Die aktivierte T-Zelle vermehrt sich daraufhin klonal unter der Produktion von IL-2, was zu einer autokrinen Stimulation und einer weiteren Vermehrung führt. Die Dauer der Stimulation durch die DC hat einen Einfluss auf die weitere Entwicklung der T-Zelle. Während nur kurz stimulierte T-

Zellen Merkmale von naiven T-Zellen behalten, differenzieren sich lang stimulierte (bis ca. 30 Stunden) in Anwesenheit von IL-12 oder IL-4 in Th1- oder Th2-Effektorzellen. Als Teil ihrer Differenzierung verlieren diese T-Zellen ihre Lymphknoten-homing-Rezeptoren und weisen statt dessen Rezeptoren auf, die ihnen eine Wanderung in entzündete, nicht lymphatische Gewebe ermöglichen, wo sie ihre Effektorfunktionen ausführen können (120). Menschliche DC werden in zwei verschiedene Gruppen unterteilt, je nachdem von welchen Vorläuferzellen sie sich ableiten. Zum Einen lassen sich immature DC in vitro aus Monozyten aus dem peripherem Blut durch Gabe von GM-CSF und IL-4 kultivieren (117;119), zum anderen entwickeln sich aus plasmacytoiden Vorläuferzellen aus Blut und Tonsillen lymphoide DC (41). Diese plasmacytoiden DC sind, im Gegensatz zu myeloiden DC unempfindlich gegen GM-CSF, reagieren aber auf IL-3 (7). An den Stellen im Körper, die prädestiniert sind für das Eindringen von Allergenen, also in der Haut, in den Oberflächenepithelien der Atemwege und im Submukosabereich des Darms, weisen die dendritischen Zellen eher einen myeloiden Phänotyp auf.

1.3 Das Th1/Th2-Modell

Die T-Helfer-Lymphozyten, deren gemeinsames Merkmal die Expression des CD4-Oberflächenmoleküls ist, können sich im Verlauf ihrer Reifung zu verschiedenen Phänotypen entwickeln, die sich durch die Bildung charakteristischer Zytokine unterscheiden. Beide Subtypen der T-Helfer Zellen hemmen durch Freisetzung bestimmter Zytokine die Entwicklung von undifferenzierten Th0-Zellen zum jeweils anderen Phänotyp. Diese Dichotomie wurde erstmals 1986 von Mosmann et al. bei Mäusezellen beobachtet (95) und konnte in Folge auch für den Menschen beschrieben werden.

Th1-Zellen produzieren vermehrt IFN- γ , TNF- α , TNF- β , GM-CSF und IL-2, während IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 typische Th2-Zytokine sind (58;116). Zudem wurden auch immunsupprimierende sogenannte regulatorische T-Zellen (Treg) beschrieben.

Th1-Zellen aktivieren Makrophagen durch IFN- γ und TNF- α und ermöglichen ihnen dadurch, intrazelluläre Mikroorganismen effektiver zu zerstören. Sie können außerdem B-Zellen dazu anregen, stark opsonierende Antikörper zu bilden, die zu bestimmten IgG-Unterklassen gehören. Th1-Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Abwehr gegen intrazelluläre Pathogene und typischerweise der Typ-IV-Immunreaktion nach Coombs (29;58;116). Eine

pathologische Th1-Antwort findet beispielsweise bei Autoimmun- und Abstoßungsreaktionen statt.

Eine Th2-Zell-Antwort ist charakteristisch für eine allergische Reaktion vom Typ I. Th2-Zellen regen B-Zellen zur Differenzierung und Produktion von Immunglobulinen der Gruppe E an. Das Signal dafür besteht aus den Th2-Zytokinen IL-4 und IL-13 (80), die mit Rezeptoren an der Oberfläche der B-Zellen in Wechselwirkung treten. Die allergische Reaktion wird ausgelöst durch die Bindung von Antigenen an IgE, welches an den IgE-Rezeptor FcεRI auf Mastzellen, die sich unterhalb der Schleimhäute des Körpers und im Bindegewebe befinden, gebunden ist. Die Vernetzung von IgE durch das Antigen an der Oberfläche von Mastzellen bewirkt bei diesen die Freisetzung von Entzündungsmediatoren. Eine Sofortreaktion wird durch kurzlebige Mediatoren wie Histamin und Prostaglandine hervorgerufen, eine Spätreaktion wird durch Leukotriene, Zytokine (IL-4, IL-13, IL-5, TNF- α) ausgelöst. Die Spätreaktion kann sich zu einer chronischen Entzündung entwickeln, wie es zum Beispiel beim chronischen allergischen Asthma zu beobachten ist, welches durch eine ständig erhöhte Konzentration von Th2-Zellen, Eosinophilen und Neutrophilen Granulozyten gekennzeichnet ist. Th2-Zellen aktivieren auch selbst Eosinophile, welche ebenfalls Zytokine wie z. B. das Chemokin IL-8 und Leukotriene ausschütten, die die allergische Reaktion unterhalten. Th2-Zellen und ihre Zytokine spielen auch eine wichtige Rolle bei der Abwehr von Parasiten, insbesondere von Würmern (58;111;116).

Eine dritte Untergruppe stellen sogenannte regulatorische T-Zellen dar. Unter diesem Namen werden wiederum verschiedene Zelltypen zusammengefasst. CD4⁺CD25⁺ regulatorische T-Zellen (Treg), die auch Suppressorzellen genannt werden, inhibieren Immunantworten auf körpereigene und auch auf eine Vielzahl an Fremdan antigenen; dadurch spielen sie eine wichtige Rolle in der Selbsttoleranz und der Verhinderung von Autoimmunität und Transplantatabstoßung (6). Sie exprimieren auch den Transkriptionsfaktor forkhead box P3 (FOXP3), der die Induktion von Th1- und Th2-Antworten blockieren soll (104). Tr1-Zellen sezernieren TGF- β in einer von IL-10 abhängigen Weise und hemmen so die Entwicklung von Th1-Reaktionen (43;58). Th3-Zellen spielen eine Rolle bei der oralen Toleranz und entfalten ihre immunsupprimierenden Eigenschaften hauptsächlich über die Produktion von TGF- β , daneben produzieren sie auch IL-4 und IL-10 (21;22).

Welche Untergruppe der T-Helferzelle (Th1, Th2 oder Treg) letztlich aus der aktivierten naiven T-Zelle entsteht, ist von zahlreichen Faktoren abhängig. Einen großen Einfluss darauf besitzen die dendritischen Zellen, die bei der Antigenpräsentation die Differenzierung der naiven T-Zelle wesentlich beeinflussen.

1.4 Dendritische Zellen und ihre Rolle bei der Th1/Th2-Polarisation

Die Interaktion zwischen dendritischer Zelle und naiver T-Zelle wird auch als Dialog bezeichnet; die Kontaktstelle nennt man auch immunologische Synapse. Je nachdem, ob sie eine Th1- oder Th2-Antwort induzieren, werden Dendritische Zellen auch als DC1 oder DC2 bezeichnet.

Obwohl in früheren Publikationen ein Zusammenhang zwischen der Einteilung der menschlichen DC in plasmazytoide und myeloide und der jeweiligen Th1/Th2-Polarisation dargestellt wurde (mit IL-3 kultiviert, aktivieren plasmacytoide DC Th2-Zellen, während myeloide DC Th1-Zellen aktivieren (115)), ist dies heute aufgrund verschiedener Arbeiten revidiert worden. Vielmehr gilt heute das Paradigma, dass dendritische Zellen abhängig von Priming-Faktoren, jeweils sowohl Th1- als auch Th2- Antworten induzieren können (62) und dementsprechend als DC1 oder DC2 bezeichnet werden.

Eine wichtige Rolle bei der Induktion einer Th1- oder Th2-Antwort durch DC spielen die Pathogen-assoziierten Faktoren, die vor der T-Zell-Aktivierung auf die DC einwirken, auch bezeichnet als pathogen-associated molecular patterns (PAMPs). Sie werden durch pattern-recognition receptors (PRRs) auf den DC erkannt. Eine wichtige Gruppe unter den PRRs stellen die Toll-like receptors (TLRs) dar, die zur IL-1R Rezeptor-Superfamilie gehören. Kapsenberg schlägt vor, die PAMPs, je nachdem, welche Th-Antwort sie nach DC-Stimulation hervorrufen, in Typ-1-PAMPs, Typ-2-PAMPs und regulatory-type-PAMPs einzuteilen (62). Demnach würde LPS, ein Bestandteil der Zellwand grampositiver Bakterien, zu den Typ-1-PAMPs gehören. Es bindet an CD14/TLR4 auf der dendritischen Zelle und induziert dort die Bildung von IL-12, ein Schlüsselzytokin bei der Entwicklung einer Th1-Antwort (126). Dabei kommt es aber darauf an, wie lange die DC mit LPS stimuliert wurden: Acht bis zehn Stunden nach LPS-Stimulation produzieren DC vermehrt IL-12 und induzieren eine Th1-Antwort, während dieselben DC danach unempfindlich für jede weitere Stimulation werden und eher eine Th2-Antwort hervorrufen (71). Weitere Typ-1- PAMPs sind CpG Nucleotide (50) und Doppelstrang-RNA (Virus-assoziiert) (19), letztere bindet an TLR3 und ist eher potenter in der Th1-Induktion als LPS.

Zu den PAMPs, die eine Th2-Antwort hervorrufen, zählen insbesondere Parasitenbestandteile wie Extrakte aus Eiern von *Schistosoma mansoni* (106) oder Nematodenbestandteile (142). Auch Choleratoxin induziert eine Th2-Antwort (37). Außerdem lassen sich einige Allergene zu den Typ-2-PAMPs zählen: Das oben schon beschriebene Enzym Der p1 führt bei

dendritischen Zellen zu einer verminderten IL-12 Produktion und zu einer Induktion von T-Zellen, die vermehrt IL-4 und weniger IFN- γ sezernieren (38). Auch Extrakte von Birkenpollen verursachen die Bildung von DC2 (136).

Jedoch werden die dendritischen Zellen bei der Immunreaktion nicht nur direkt durch die Pathogene, sondern auch durch Entzündungsmediatoren, Gewebefaktoren und Zytokine in der Umgebung stimuliert, und auch hier lassen sich die Faktoren in Th1- oder Th2-Antwort-induzierend einteilen. Wenn IFN- γ zur Reifung der DC eingesetzt wird, führt das zu einer Th1-Antwort (126). Die IL-12-Sekretion durch dendritische Zellen spielt eine wichtige Rolle bei der Th1-Polarisation; fehlt sie, so wird eine Th2-Antwort induziert. Von vielen Autoren wird IL-12 daher auch als Schlüsselzytokin für eine Th1-Antwort bezeichnet (94). Auch durch die Bindung an CD40, welches auf murenen DCs exprimiert wird, an seinen Liganden CD40L, das auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird, kommt es zu einer verstärkten IL-12-Ausschüttung. Außerdem wird IL-8 (CXCL8) und MIP-1 α (CCL3) sezerniert (17;20;119), CCL3 wirkt unter anderem chemotaktisch auf Th1-Zellen. (85). Andere Chemokine, die Th1-Zellen anlocken, sind Mig, IP-10 und I-TAC, MIP-1 β und RANTES (siehe unten).

Dagegen führen vor allem Stimuli wie der Entzündungsmediator PGE₂ und, mit Einschränkungen, IL-10 bei reifen, aus Monozyten generierten DC dazu, dass sie naive T-Zellen zu Th2-Zellen polarisieren (61). PGE₂ und β_2 -Agonisten hemmen die IL-12 Sezernierung (61;77;127), dabei korreliert die Hemmung der IL-12-Produktion durch β_2 -Agonisten mit einem erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel (105). Auch IL-10 hemmt bei dendritischen Zellen die IL-12-Produktion (24) Wenn immature DC vor einem T-Zell-Kontakt mit dem Entzündungsmediator PGE₂ stimuliert werden, verlieren sie die Fähigkeit, IL-12 zu produzieren und induzieren eine Th2-Antwort (60). Caron et al. zeigten, dass Histamin dendritische Zellen so polarisiert, dass sie eine Th2-Antwort induzieren (15). Ein dem IL-12 vergleichbares Schlüsselzytokin für das Th2-Comittment auf APC-Seite ist nicht bekannt.

Entscheidend für das Th1/Th2-Comittment scheint außerdem zu sein, ob die dendritischen Zellen von Atopikern oder Gesunden stammen und ob die DC dem Antigen ausgesetzt sind, gegen das der Allergiker sensibilisiert ist. Hammad et al. zeigten, dass DC von Hausstaubmilben-empfindlichen Personen, die dem Hausstaubmilbenallergen Der p1 ausgesetzt waren, im Gegensatz zu DC von Gesunden oder Pollenallergikern eine entscheidende Rolle bei der Steigerung einer Th2-Immunantwort bei allergischen Reaktionen

auf Hausstaubmilben spielen (46). Zudem produzieren dendritische Zellen von Asthmatikern selbst mehr PGE₂ und IL-10 als DC von Gesunden (78).

Die Th1- oder Th2-Differenzierung ist auch abhängig vom Verhältnis der APC zu T-Zellen. Bei einem niedrigen Verhältnis (1:300) wird die Bildung von Th2-Zellen induziert, bei höherem Verhältnis (1:4) entstehen gleichermaßen Th1- und Th2-Zellen (133).

Schließlich haben gewebespezifische Faktoren einen Einfluss auf die Differenzierung von DC: Bei Mäusen produzieren CD11c⁺ DC aus Peyerschen Plaques und aus der Lunge IL-4 und IL-10 und provozieren so eine Th2-Antwort, nicht aber die DC aus der Milz (57;132).

1.5 IL-10

IL-10 wurde erstmals 1989 von Fiorentino und Mitarbeitern als Zytokin-Synthese-inhibierender Faktor (CSIF) beschrieben, der von aktivierten Th2-Zellen synthetisiert wird und die Produktion von Zytokinen wie IL-2, TNF- α , IFN- γ und GM-CSF durch Th1-Zellen inhibiert (36). Neben Th2-Zellen wurden als Produzenten B-Zellen, Monozyten (28) und Makrophagen beobachtet. Ein Pendant zu IL-10, BCRF1, wurde im Genom von Epstein-Barr-Viren gefunden (92).

Zur Wirkung von IL-10 auf dendritische Zellen:

IL-10 inhibiert die Produktion von IL-12 und die Expression von kostimulatorischen Molekülen auf verschiedene Arten von DC. Es wurde beschrieben, dass die wiederholte IL-10-Stimulation von naiven T-Zellen zu einer Anergie bei T-Zellen bzw. zur Generierung der oben beschriebenen T-regulatorischen Zellen führt (42;129;130). IL-10 hemmt die Generierung und Maturierung von DC. So beobachteten Allavena et al. eine Herunterregulation des MHC-II-Komplexes bei dendritischen Zellen, die mit IL-10 stimuliert wurden; es entwickelten sich stattdessen Zellen mit makrophagenähnlichen Eigenschaften (5). Bei Mäusen zeigte sich, dass DC nach IL-10-Gabe weniger IL-12 produzieren und naive T-Zellen so primen, dass sie vermehrt IL-4 (76) oder weniger IFN- γ (26) sezernieren und so eine Th2-Antwort zeigen. In Peyerschen Plaques, Leber und Lunge von Mäusen wurden DC gefunden, die IL-10 produzieren und eine Th2-Antwort induzieren (57;64;132). Auf CD4⁺-T-Zellen wirkt IL-10 nicht nur indirekt durch die Beeinflussung von antigenpräsentierenden Zellen, sondern auch direkt, indem es die Produktion von IL-2, TNF und IL-5 unterdrückt.

Zur Wirkung von IL-10 auf Monozyten und Makrophagen:

IL-10 wirkt auf aktivierte Monozyten und Makrophagen vor allem dadurch inhibitorisch, dass es bei ihnen die Produktion von IL-1, IL-6, IL-10 selbst, IL-12, IL-18, GM-CSF, G-CSF, M-CSF, und TNF unterdrückt. (28;48;101;145). Die Suppression von IL-1 und TNF ist

bedeutend für die antiinflammatorische Wirkung von IL-10. Neben genannten Zytokinen inhibiert IL-10 bei aktivierten Monozyten und Makrophagen auch die Produktion von Chemokinen, die Monozyten, dendritische Zellen, Neutrophile und T-Zellen bei einer Entzündung rekrutieren können, wie zum Beispiel MIP-1 α (CCL3), RANTES (CCL5), IL-8 (CXCL8), IP-10 (CXCL10) und MDC (CCL22) (10;68;86). IL-10 vermindert außerdem die Expression von MHC-II, ICAM-1, CD80 und CD86 auf Monozyten und dendritischen Zellen, was die Zellen weniger fähig macht, T-Zellen zu aktivieren (91).

Bei Allergien werden IL-10 gegensätzliche Funktionen zugeschrieben. Einerseits soll es immunsuppressiv wirken und beispielsweise Entzündung und Hyperreagibilität der Luftwege vermindern (110), andererseits stellten Mäkelä et al. fest, dass IL-10 nötig ist, um eine Überempfindlichkeit der Luftwege zu entwickeln (84). Monozyten, dendritische Zellen und auch T-Zellen von Asthmatikern produzieren vermehrt IL-10 (78;88). Bei atopischer Dermatitis ist sowohl in Hautbiopsien IL-10 selbst erhöht als auch die mRNA für IL-10 in Monozyten der Haut (100).

1.6 Chemokine

Chemokine sind eine Gruppe von kleinen strukturverwandten Proteinen, die besonders die Wanderung und Aktivierung von Phagozyten und Lymphozyten stimulieren (58). Sie interagieren mit 7-transmembran-G-Protein-gekoppelten Rezeptoren. Beim Menschen sind ungefähr 40 Chemokine identifiziert. Chemokine sind in zwei Hauptfamilien eingeteilt, je nachdem, ob die N-terminalen Cysteinreste benachbart sind (CC-Chemokine) oder ob die beiden Cysteinreste durch eine jeweils andere Aminosäure getrennt sind (CXC-Chemokine). CC-Chemokine binden an CC-Rezeptoren (CCR), während CXC-Chemokine an CXC-Rezeptoren binden (CXCR). In der neueren Nomenklatur werden die Chemokine und deren Rezeptoren nach CC und CXC getrennt und durchnummeriert, wobei ein L für Ligand und ein R für Rezeptor hinzugefügt wurde (z. B. CCL22).

Außerdem lassen sich Chemokine in homöostatisch und inflammatorisch einteilen. Homöostatische Chemokine werden konstitutiv von bestimmten Geweben oder Organen gebildet, um Zellmigration auszulösen. Inflammatorische Chemokine werden dagegen vermehrt in verschiedenen Zelltypen (Makrophagen, Fibroblasten, T-Zellen) bei Entzündungsreaktionen gebildet (146).

Zur besseren Übersicht dienen folgende Tabellen:

Systematischer Name	Name	Rezeptor	Rezeptorzellen
CCL1	I-309	CCR8	Mo, iDC, Th2, Treg
CCL2	MCP-1	CCR2	Mo, iDC, Tact, NK, Ba
CCL3	MIP-1 α	CCR1	Mo, iDC, Ma, NK
		CCR5	Mo, Th1, Ma, NK
CCL4	MIP-1 β	CCR5	Mo, Th1, Ma, NK
CCL5	RANTES	CCR1	Mo, iDC, Ma, NK
		CCR3	Eo, Ba, Th2, iDC
		CCR5	Mo, Th1, Ma, NK
CCL7	MCP-3	CCR1	Mo, iDC, Ma, NK
		CCR2	Mo, iDC, Tact, NK, Ba
		CCR3	Eo, Ba, Th2, iDC
CCL8	MCP-2	CCR2	Mo, iDC, Tact, NK, Ba
		CCR5	Mo, Th1, Ma, NK
CCL11	Eotaxin	CCR3	Eo, Ba, Th2, iDC
CCL13	MCP-4	CCR1	Mo, iDC, Ma, NK
		CCR2	Mo, iDC, Tact, NK, Ba
CCL14	HCC-1		
CCL15	HCC-2	CCR1	Mo, iDC, Ma, NK
		CCR3	Eo, Ba, Th2, iDC
CCL16	HCC-4	CCR1	Mo, iDC, Ma, NK
		CCR3	Eo, Ba, Th2, iDC
CCL17	TARC	CCR4	Th2
CCL18	PARC	unbekannt	mDC, naiveT, Eo
CCL19	MIP-3 β	CCR7	mDC, naiveT, Mo, Tact
CCL20	MIP-3 α	CCR6	iDC, Tact, B
CCL21	SLC	CCR8	Mo, iDC, Th2, Treg
CCL22	MDC	CCR4	Th2
CCL23	MPIF-1	CCR1	Mo, iDC, Ma, NK
CCL24	Eotaxin-2	CCR3	Eo, Ba, Th2, iDC
CCL25	TECK	CCR9	T
CCL26	Eotaxin-3	CCR3	Eo, Ba, Th2, iDC
CCL27	CTACK	CCR10	T

Systematischer Name	Name	Rezeptor	Rezeptorzellen
CXCL1	GRO α	CXCR2	Neu
CXCL2	GRO β	CXCR2	Neu
CXCL3	GRO γ	CXCR2	Neu
CXCL5	ENA-78	CXCR2	Neu
CXCL6	GCP-2	CXCR1	Neu
		CXCR2	Neu
CXCL7	NAP-2	CXCR1	Neu
		CXCR2	Neu
CXCL8	IL-8	CXCR1	Neu
		CXCR2	Neu
CXCL9	Mig	CXCR3	Th1, NK
CXCL10	IP-10	CXCR3	Th1, NK
CXCL11	I-TAC	CXCR3	Th1, NK
CXCL12	SDF-1 α/β	CXCR4	Weitverbreitet
CXCL13	BCA-1	CXCR5	B
CXCL14	BRAK	unbekannt	Mo

Tabelle 1: Überblick über die menschlichen Chemokine und ihre Rezeptoren; im Text genannte Chemokine sind fett markiert; Abkürzungen: Eo: Eosinophile, Ba: Basophile; Mo: Monozyten; Ma: Makrophagen; Neu: Neutrophile; iDC: immature Dendritische Zellen; mDC: mature Dendritische Zellen; naiveT: naive T-Zellen, Tact: aktivierte T-Zellen; Th1: Th1-Zellen; Th2: Th2-Zellen; Treg: T-regulatorische Zellen; NK: natürliche Killerzellen; B: B-Zellen, Quelle: (85)

Dendritische Zellen produzieren selbst einige Chemokine, besonders CCL17, das zusammen mit CCL22 an CCR4 bindet (56). Man geht davon aus, dass DC verschiedene T-Zell-Typen durch ihre spezifische Chemokinproduktion anlocken können (146). Auch die Chemokinrezeptoren auf den DC sind spezifisch für ihre Stadien und Subtypen: Immature DC exprimieren CCR6 und reagieren in vitro auf CCL20 (31), nach der Antigenaufnahme und Reifung tragen sie CCR7 (121). Damit antworten sie auf CCL19 und CCL21, was wichtig ist für die Antigenpräsentation für naive T-Zellen (63), da CCL21 für die Migration der T-Zellen in die Lymphknoten nötig ist. CCR7 wird nicht nur von reifen DC, sondern auch von naiven T-Zellen exprimiert (143) und stellt den Rezeptor für CCL21 und CCL19 dar.

Zusätzlich haben Chemokine und ihre Rezeptoren eine große Bedeutung bei der T-Zell-Entwicklung in Th1- und Th2-Effektorzellen: Typischerweise werden die Rezeptoren CXCR3 und CCR5 besonders auf Th1-Zellen exprimiert. An CXCR3 binden die Chemokine CXCL9,

10 und 11 (Mig, IP-10 und I-TAC), für CCR5 sind CCL3, 4, 5 und 8 (MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES und MCP-2) als Liganden bekannt.

Dagegen werden die Rezeptoren CCR3, CCR4 und CCR8 unter anderem mit Th2-Zellen assoziiert. An CCR3 binden CCL11, 15, 16, 24 und 26 (Eotaxin, HCC-2, HCC-3, Eotaxin-2 und Eotaxin-3), die auch chemotaktisch auf Eosinophile und Basophile Granulozyten wirken, welche wie oben beschrieben eine wichtige Rolle bei der Th2-assoziierten Immunantwort wie der allergischen Reaktion spielen. Als Liganden für CCR4 gelten CCL17 (TARC) und CCL22 (MDC, macrophage derived chemokine). Diese beiden Chemokine können bereits als Marker in der Bronchiallavage verwendet werden, um Asthma bronchiale vom chronischem Husten abzugrenzen (49). CCL21 schließlich bindet an CCR8 (85). Kim et al. zeigten, dass T-Zellen in Kokultur mit dendritischen Zellen einen Chemokinrezeptor-Switch durchmachen. Dabei bewirkte die Gabe von Zytokinen eine Änderung der Chemokinrezeptoren auf den T-Zellen: IL-4 führte zur Generierung von CCR4-positiven T-Zellen und unterdrückte die Generierung von CXCR3-positiven und CCR7-negativen T-Zellen. Dagegen inhibierte IL-12 die Generierung von CCR4-positiven T-Zellen (66). In der Lunge werden bei einer allergischen Reaktion als erstes Mastzellen und Basophile rekrutiert; dies kann durch CCL2 (MCP-1), CCL8 (MCP-2), CCL7 (MCP-3), CCL5 (RANTES), CCL3 (MIP-1 α) und CCL11 (Eotaxin) geschehen, die alle während der frühen Phase einer Entzündung von verschiedenen Zellen in der Lunge exprimiert werden. Außerdem können sowohl MCP-1 als auch RANTES Basophile aktivieren, so dass sie Histamin und andere Entzündungsmediatoren ausschütten (102). Die Ansammlung von Eosinophilen in der Lunge führt zur direkten allergischen Entzündung, da diese Zellen verschiedene toxische Proteine und Mediatoren die Bronchialepithelzellen direkt schädigen. Am Ende führt die Schädigung zur Bronchokonstriktion, zur Hyperreaktivität der Atemwege, muköser Hypersekretion und erhöhter Gefäßpermeabilität. Die Rekrutierung der Eosinophilen geschieht hauptsächlich durch die oben beschriebenen CCR3-Liganden.

1.7 CCL18

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem Chemokin CCL18 und seiner Funktion. Im Folgenden soll auf den Stand der Literatur zu diesem Thema eingegangen werden:

Das Chemokin CCL18 = PARC (pulmonary and activation-regulated chemokine), ist auch bekannt als DC-CK1, AMAC-1, monocyte inflammatory protein (MIP-4) und SCY A 18.

Die Genomsequenz stimmt zu 61% mit der von CCL3 (MIP-1 α) überein, mit dem es am nächsten verwandt ist (1;52). Ein Rezeptor, den CCL18 aktiviert, ist noch nicht gefunden worden (146), jedoch reagieren 3-4 Tage kultivierte Blutmonozyten im Gegensatz zu frisch isolierten Monozyten, unter anderem chemotaktisch, auf CCL18 (122). Expression von CCL18-mRNA wurde in Alveolarmakrophagen, in dendritischen Zellen, in Blutmonozyten nach Stimulation und in niedrigen Konzentrationen im Knochenmark entdeckt (52). CCL18 ist ein Marker für alternativ aktivierte Makrophagen, in dem Zusammenhang wurde es auch als AMAC-1 bezeichnet (67). Alternativ aktivierte Makrophagen unterscheiden sich von klassisch aktivierten Makrophagen dadurch, dass ihre Aktivierung durch IL-4, IL-10, IL-13, Glukokortikoide und TGF- β induziert wird statt durch IFN- γ oder LPS (klassisch). Sie zeigen eine erhöhte Phagozytosefähigkeit, jedoch eine geringere NO und O₂ - Produktion und antigenpräsentierende Eigenschaften als klassisch aktivierte Makrophagen. Bei Gesunden kommen alternativ aktivierte Makrophagen in Plazenta, Lunge und im Wundgewebe während der Heilung vor, wo sie Entzündungsreaktionen herunterregulieren (39;128;137).

Schraufstatter und Mitarbeiter konnten zeigen, dass CCL18 auch von Eosinophilen, jedoch in geringerer Mengen als von Monozyten sezerniert wird (122). Bisher wurde CCL18 nur in Primaten gefunden, was die Vermutung nahe legt, dass es erst spät in der Evolution entstanden ist.

Zur Funktion von CCL18 ist noch nicht viel bekannt. Ein Rezeptor für CCL18 ist noch nicht identifiziert worden. Jedoch wirkt CCL18 chemotaktisch auf naive und aktivierte T-Lymphozyten (1;44). Außerdem wirkt es chemotaktisch auf immature dendritische Zellen, jedoch anscheinend nicht auf mature (141). CCL18 gehört nach Vulcano et al. zu der begrenzten Anzahl an Chemokinen, die auch von immaturren DC ausgeschüttet werden, dabei wird CCL18 in den höchsten Mengen sezerniert. Stimuli, die zur Reifung der dendritischen Zelle führen, wie LPS, TNF, CD40L, bakterielle und virale Partikel (wie von *Staphylokokkus aureus* und Influenzavirus), führen bei dendritischen Zellen zu einer Herunterregulation der CCL18-Produktion, wobei CD40L am stärksten inhibiert, gefolgt von LPS und TNF (141). Auch in Gegenwart von Th1-Zytokin IFN- γ und Entzündungsmediator PGE₂ zeigen immature dendritische Zellen eine verminderte CCL18-Produktion. Dagegen bewirken IL-10 und

Vitamin D₃ eine Hochregulation der CCL18-Produktion bei immaturren dendritischen Zellen. Dabei kann IL-10 eine Inhibierung der CCL18-Produktion durch LPS nicht mehr rückgängig machen (141). Im Gegensatz hierzu kamen de Vries et al. zu dem Ergebnis, dass mature DC deutlich mehr IL-8-, TARC- (CCL17), MDC- (CCL22) und CCL18-mRNA exprimieren als immature DC (27).

Es gibt Hinweise, dass CCL18 eine Rolle bei allergischen Reaktionen spielt:

Bei atopischer Dermatitis ist CCL18 das Chemokin, das am meisten exprimiert wird, und zwar von antigenpräsentierenden Zellen (107). Neben atopischer Dermatitis bringen Arbeiten allergische Konjunktivitis und Asthma bronchiale (im Affen-Modell) mit CCL18 in Verbindung (33;147). CCL18 scheint außer bei allergischen bei verschiedenen, voneinander unabhängigen Krankheiten von Bedeutung zu sein. So wurden erhöhte CCL18-Werte gemessen in: Makrophagen bei M. Gaucher (11), im Serum bei Kindern mit Akuter Lymphatischer Leukämie (131), in Zellen aus der bronchioalveolären Lavage von Sarkoidosepatienten (96), in der Aszites-Flüssigkeit von an Ovarialcarcinom erkrankten Patientinnen, nicht jedoch in den Carcinomzellen selbst (123), in der Synovialflüssigkeit von Patienten mit rheumatoider oder septischer Arthritis (124) und in atherosklerotischen Plaques (112). Die Messung von CCL18 in Makrophagen aus Magencarcinomgewebe ergab sogar, dass eine erhöhte CCL18-Expression an eine höhere Überlebenschance der Tumorpatienten gekoppelt ist und als prognostischer Faktor genutzt werden kann (74). Generell gilt CCL18 als ein Marker für Tumor-assoziierte Makrophagen, die eine Untergruppe der alternativ aktivierten Makrophagen darstellen (40;85).

1.8 Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss von CCL18 auf dendritische Zellen zu untersuchen. Hierbei gilt es zu berücksichtigen, dass CCL18 autokrin von dendritischen Zellen produziert wird. Im Detail ergaben sich folgende Fragen:

1. Gibt es einen Unterschied in der CCL18-Produktion dendritischer Zellen bei Allergikern versus Normalpersonen?
2. Inwieweit verändert sich die Expression verschiedener Oberflächenmarker auf dendritischen Zellen nach Stimulaton mit CCL18? Hat die CCL18-Stimulation einen Einfluss auf die Maturierung der dendritischen Zellen ?
3. Welchen Einfluss hat die CCL18-Stimulation auf die T-Zell-DC-Interaktion, insbesondere auf die T-Zell-Proliferationsinduktion durch dendritische Zellen?
4. Verändert die CCL18 Stimulation die Polarisierungsfähigkeit der dendritischen Zellen und welchen Einfluß hat dies auf das Th1/Th2-Committment ?

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Begasungsbrutschrank	Heraeus Stuttgart, D
Computer Power Macintosh G3	Apple, Cork, IRL
Counter AC-12	KarlHecht,Sondheim,D
Durchflußzytometer FACScan/FACSCalibur	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
ELISA-Reader	Bio-Tek Instruments, Inc., Göttingen, D
Magnetic Cell Separation	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Mikroskop Axiolab	Carl Zeiss, Oberkochen, D
Multichannel Pipette 12-Kanal (200µl)	Brand.Wertheim/Main, D
Neubauer-Zählkammer, verbessert	Brand.Wertheim/Main, D
Pipetten (10, 50, 200, 1000 µl)	Ratiolab, Dreieich, D
Pipetten (20, 100, 1000 µl)	Labsystems, Helsinki, FIN
Pipettus pipetus-akku	Hirschmann, Eberstadt, D
Software CellQuest 3.2.1	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
Software SigmaStat Version 2.03	SPSS, Erkrath, D
Stepper	Eppendorf, Hamburg, D
Whirler REAX 2000	Heidolph, Kelheim, D
Werkbank Hera Safe Typ HS18	Heraeus, Stuttgart, D
Zentrifuge Centrifuge 5415 C	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge LaboFuge 400R	Heraeus, Stuttgart, D
Zentrifuge Rotixa/RP	Hettich, Tuttlingen, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Dreiwegehahn Diskofix	Braun, Melsungen, D
FACSFlow™	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
FACSRinse™	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
FACSClean™	Becton Dickinson, San Jose, CA, USA
FACS-Röhrchen (0,6ml)	Greiner Labortechnik, Frickenhausen, D

Kulturplatten costar 24 Well Culture Cluster	Corning Inc., Corning NY, USA
Kulturplatten costar 48 Well Culture Cluster	Corning Inc., Corning NY, USA
Kulturplatten costar 96Well CultureCluster	Corning Inc., Corning NY, USA
MACS LS-Säulen	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Monovetten (EDTA-Röhrchen)	Sarstedt, Nümbrecht, D
Pipettenspitzen	Ratiolab, Dreieich, D
Polystyrol Rundbodenröhrchen 14 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA
Polystyrol Pipette Stripette (5, 10, 20 ml)	Corning Inc., Corning NY, USA
PP-Röhrchen 50 ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, D
Reaktionsgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg, D
Rundbodenplatten 96 Well NUNC	Brand Products, DK

2.1.3 Reagenzien

Avidin-Peroxidase Labeled	Sigma, Deisenhofen, D
Bovine serum albumin (BSA)	Sigma, Dreisenhofen, D
Fetal Calf Serum (FCS)	Sigma, Deisenhofen, D
Ficoll Separating Solution	PAA Laboratories, Pasching, AUT
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, D
PBS Dulbecco`s	Gibco Life Technologies, Paisley, GB
Penicillin/Streptomycin	Biochrom, Berlin, D
RPMI 1640 Medium mit L-Glutamin	Gibco Life Technologies, Paisley, GB
Schwefelsäure	Merck, Darmstadt, D
Tween (Polyoxyethylensorbitanmonolaurat)	MERCK-Schuchard, Hohenbrunn, D

2.1.4 Antikörper

2.1.4.1 Markierte Antikörper

Anti-CD1a (FITC)	Becton & Dickinson
Anti-CD11c (PE)	Dako, Gostrup, DK
Anti-CD16 (PE)	Dako, Gostrup, DK

Anti-CD40 (FITC)	Dako, Gostrup, DK
Anti-CD80 (FITC)	PharMingen, San Diego, CA
Anti-CD83 (PE)	PharMingen, San Diego, CA
Anti-CD86 (FITC)	PharMingen, San Diego, CA
Anti-HLA- DR (FITC)	Dako, Glostrup, DK
Anti-IgG1 (Negativkontrolle) (FITC) (DAK-GO1)	Dako, Gostrup, DK
Anti-IgG1 (Negativkontrolle) (PE) (DAK-GO1)	Dako, Gostrup, DK

2.1.4.2 Unmarkierte Antikörper

MACS CD4+ TCell Isolation Kit II	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS CD14 MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
MACS CD45RO MicroBeads	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D

2.1.4.3 ELISA-Antikörper

Fänger-Antikörper:

Maus Anti-Human-IL-4	PharMingen, San Diego, CA, USA
Maus Anti-Human-IFN- γ	Endogen, Woburn, USA
Ratten-Anti-Human-IL-10	PharMingen, San Diego, CA, USA
Ratten- Anti-Human-IL-13	PharMingen, San Diego, CA, USA
Ziegen-Anti-Human-CCL18	R & D, Minneapolis, USA

Detektor Antikörper:

Biotinyliertes Ratten-Anti-Human-IL-4	PharMingen, San Diego, CA, USA
Biotinyliertes Ratten-Anti-Human-IL-10	PharMingen, San Diego, CA, USA
Biotinyliertes Ratten- Anti-Human-IL-13	PharMingen, San Diego, CA, USA
Biotinyliertes monoklonales Anti-Human IFN- γ	Endogen, Woburn, USA
Biotinyliertes Ziegen-Anti-Human-CCL18	R & D, Minneapolis, USA

2.1.5 Stimulanzen

Calcium-Ionophor	
(10^{-4} M, Endkonzentration 10^{-6} M/ml)	Sigma, Steinheim, D
CCL18 (100-1000 ng/ml)	R & D, Minneapolis, USA
GM-CSF (1000 U/ml)	CELL CONCEPTS GmbH, Umkirch, D
IL-4 (800 U/ml)	BioConcept GmbH, Umkirch, D
IL-2 (50 U/ml)	Cetus Corporation, Emeryville, CA, USA
IL-10 (100 ng/ml)	ICC, Ismaning, D
Lipopolysaccharid (LPS) 1 μ g/ml von E.coli	Sigma, Steinheim, D
Phorbol-12 Myristat-13 Acetat (PMA)	
(10^{-6} M, Endkonzentration 10^{-8} M/ml)	Sigma, Deisenhofen, D
SEB (Streptokokkenenterotoxin B) 100pg/ml	Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D

2.1.6 Medien und Lösungen

2.1.6.1 Kulturmedium

RPMI 1640 Medium (mit 2 mM Glutamin) wurde mit 5% FCS Gold, 100 μ g/ml Streptomycin und 100 U/ml (1%) Penicillin(1%) versetzt.

Türk-Lösung Merck, Darmstadt, D

2.1.6.2 Antikörperverdünnungslösung

Die Antikörperverdünnungslösung bestand aus PBS, 2 % FCS und 0,1 % NaN_3 . Die markierten Antikörper wurden in einer 1: 50 oder 1: 25 Verdünnung verwendet.

2.1.6.3 Puffer

MACS-Puffer: enthält 25 ml BSA (0,5 %), 2 ml 0,5 M EDTA (2mM EDTA) und 500 ml PBS

Blocking Puffer: PBS und 1 % BSA (beim CCL18-ELISA zusätzlich NaN_3 0,5% + Succrose 5%)

Substratpuffer: 6,3 g Kaliumcitrat (Citronensäure) + 800 ml H_2O auf pH 4,1 einstellen und bis 1000 ml mit Aqua bidest auffüllen.

TMB-Puffer: 4,8 g/l Tetramethylbenzidin, 100 ml/l Aceton, 900 ml/l Ethanol und 50 mmol/l H_2O_2 (30 %).

ELISA-Waschpuffer: 1 x PBS + 0,5 % Tween-20.

ELISA-Coatingpuffer: 0,1 M NaHCO_3 , pH 8,2.

2.2 Methoden

2.2.1 Zellisolation

2.2.1.1 Isolation mononukleärer Zellen (MNC) aus peripherem Blut

Im Vollblut sind unterschiedliche Zelltypen wie Erythrozyten, Thrombozyten, Granulozyten, Monozyten und Lymphozyten vorhanden. Unter dem Begriff „mononukleäre Zellen“ (MNC) fasst man die Monozyten und Lymphozyten zusammen. Die Abtrennung der MNC-Fraktion von den restlichen Blutzellen erreicht man durch Dichtezentrifugation mittels Ficoll (Dichte $1,077 \text{ g/cm}^3$). Man nutzt dabei den Umstand, dass die Thrombozyten, Monozyten und Lymphozyten eine geringere Dichte als Ficoll besitzen, die Granulozyten und Erythrozyten dagegen eine höhere. Die MNC sammeln sich während der Zentrifugation in der Phase zwischen Plasma (oben) und Ficoll an, die Erythrozyten und Granulozyten sinken durch das Ficoll auf den Boden des Röhrchens und sedimentieren dort (s. Abbildung.1).

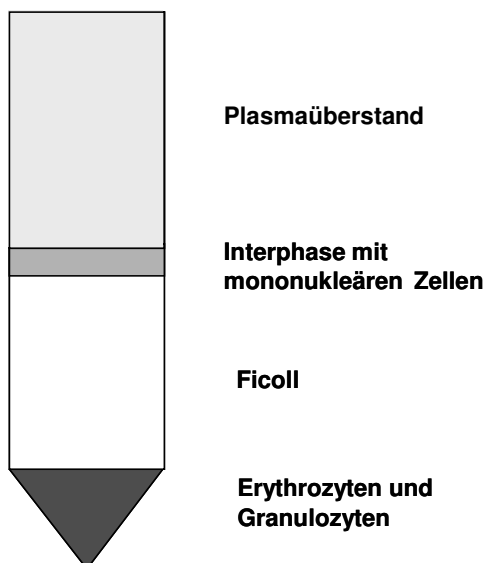


Abb.1: Die MNC-Fraktion wurden mit Hilfe von Ficoll-Dichtezentrifugation von den restlichen Blutbestandteilen getrennt und aus der Interphase abpipettiert.

Peripher venöses Blut gesunder Spender aus einer 9 ml EDTA-Monovette wurde 1: 2 mit PBS verdünnt und in 50ml-Falcon-Tubes auf 15 ml Ficoll geschichtet. Nach Zentrifugation bei 1700 x g und 20° C für 20 Minuten wurden die sich an der Phasengrenze befindenden mononukleären Zellen entnommen. Anschließend wurden die Zellen mit PBS gewaschen (300 x g, 5 Minuten, 20° C). Die restlichen, noch in der MNC-Fraktion verbliebenen Erythrozyten wurden mit 10 ml 0,2% NaCl-Lösung für 30 Sekunden lysiert, nachfolgend wurde mit 10 ml 1,6% NaCl-Lösung eine isotone Lösung hergestellt und wiederum mit PBS gewaschen.

2.2.1.2 Zellzählung

Die aus der MNC-Isolation gewonnenen Zellen wurden zur Zählung in 10 ml PBS aufgenommen.

Die Gesamtzahl der isolierten Zellen errechnet man aus der durch die Zellfärbung bestimmten Zelldichte. Dazu wurden 10 µl Zellsuspension mit 90 µl Türkscher Lösung vermischt. Anschließend wurde die Zellzahl mit Hilfe einer Zählkammer im Lichtmikroskop bestimmt, wobei 4 Großquadranten mit je 0,01 µl Volumen ausgezählt wurden. Die durchschnittliche Zahl der Zellen je Großquadrant mit 10^5 multipliziert ergab die Anzahl der Zellen in einem Milliliter.

2.2.1.3 Gewinnung von naiven T-Zellen

Zur Gewinnung naiver T-Zellen wurde das Magnetic Cell Sorting (MACS)-System genutzt. Hierbei handelt es sich um einen U-förmigen Magneten mit dazu passenden Säulen, die zum Teil mit beschichteter Stahlwolle gefüllt sind. Paramagnetisch markierte Zellen bleiben in dieser magnetisierten Matrix hängen, während die restlichen Zellen die Säule passieren können.

Zunächst mussten $CD4^+$ -T-Zellen (T-Helfer-Zellen) aus dem MNC-Gemisch isoliert werden; dazu wurden die MNC in 40 µl MACS-Puffer / 10^7 Zellen und 10 µl Biotin-Antikörper-Cocktail / 10^7 Zellen aufgenommen. Dieser Antikörper-Cocktail markiert nicht- $CD4^+$ -MNCs, z. B. $CD8^+$ -T-Zellen, NK-Zellen, dendritische Zellen, Monozyten und Granulozyten. Nach zehnmütiger Inkubation auf Eis wurden noch 30 µl MACS-Puffer/ 10^7 Zellen und 20 µl Anti-Biotin-MicroBeads/ 10^7 Zellen dazugegeben, 15 Minuten auf Eis inkubiert und anschließend in MACS-Puffer gewaschen. Auf diese Weise waren die $CD4^+$ MNC

paramagnetisch markiert und verblieben in der MACS-Säule, während die CD4⁺-T-Zellen unter der Säule aufgefangen werden konnten.

Zur Untersuchung der Th1-/Th2-Differenzierung benötigt man naive CD4⁺T-Lymphozyten. Naive T-Zellen exprimieren den Oberflächenmarker CD45RA, während die übrigen CD4⁺-Zellen positiv für den Marker CD45RO sind. Nun wurden die zuvor gewonnenen CD4⁺-Zellen mit 20µl Anti-CD45RO-MicroBeads/10⁷ Zellen markiert, zusätzlich wurden 80µl MACS-Puffer/10⁷ Zellen zugegeben. Die Zellen wurden wiederum für 15 min auf Eis inkubiert und in MACS-Puffer gewaschen.

So konnten die CD45RA⁺T-Zellen die Säule passieren, während die markierten CD45-RO⁺T-Zellen in der Säule verblieben. Die Reinheit der CD4⁺CD45RA⁺ Zellen betrug nach FACS-Messung generell > 95%.

2.2.1.4 Gewinnung von Monozyten

Blutmonozyten exprimieren den Oberflächenmarker CD14. Mit dem MACS-System ist es möglich, Monozyten, die sich in dem aus peripherem Blut gewonnenen MNC-Gemisch befinden, zu isolieren. Dazu wurden die MNC mit 20µl Anti-CD14-MicroBeads / 10⁷ Zellen in 80µl MACS-Puffer / 10⁷ Zellen markiert. Nach 15-minütiger Inkubation auf Eis und einem Waschschrift konnten die MNC auf die MACS-Säule aufgetragen und separiert werden. Die in der Säule verbliebene Positivfraktion bestand aus CD14⁺Monozyten. Die Reinheit der isolierten Monozyten war aufgrund der Reanalysen im FACS stets > 95%.

2.2.1.5 Generierung von dendritischen Zellen (DC) aus Monozyten und Stimulierung

Die mit dem MACS-System isolierten Monozyten wurden in Kulturmedium aufgenommen und für 6 Tage auf eine 24-Well-Platte mit 1 Mio. Monozyten/ml/Well gegeben. Am ersten Tag wurden pro Well (1ml) 10µl GM-CSF (1000 U/Well à 1ml) und 10 µl IL-4 (800 U/Well à 1ml) hinzugefügt. 24 oder 12 Stunden vor Ende der Inkubationszeit wurden einige Wells zusätzlich mit 5 µl LPS (1µg/ml) stimuliert, um das Ausreifen der Zellen zu erreichen. Daneben wurden einigen Wells noch IL-10 (100 ng/ml) oder CCL18 (100 -1000 ng/ml) hinzugefügt, so dass folgende Ansätze entstanden:

immature DC (= iDC)

immature DC + IL-10

immature DC + CCL18

mature DC (DC + LPS; = mDC)

mature DC + IL-10

mature DC + CCL18

6 Tage nach Isolation der Monozyten wurden die verschieden stimulierten dendritischen Zellen geerntet, indem die Kulturplatte für 30 min auf Eis gestellt wurde und die Wells mit kaltem PBS nachgespült wurden. Daraufhin wurden die dendritischen Zellen gezählt. Die Ausbeute an dendritischen Zellen betrug ca. 30% der Zahl an eingesetzten Monozyten, d. h. pro Well à 1 Million Monozyten konnten nach Stimulation mit GM-CSF und IL-4 durchschnittlich 300.000 dendritische Zellen geerntet werden.

2.2.2 Durchflusszytometrie

2.2.2.1 Hintergrund

Im Durchflusszytometer (FACS) werden die in Suspension befindlichen Zellen anhand ihrer relativen Größe (Vorwärtsstreulicht -Lichtbeugung) und ihrer relativen Granularität (Seitwärtsstreulicht -Lichtbrechung und Reflexion) sortiert. Darüber hinaus ist es möglich, bestimmte Oberflächenmoleküle mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern anzufärben. In unseren Experimenten wurden dafür zwei verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe benutzt, Fluoreszeinisothioyanat (FITC; grün) und Phycoerythrin (PE; rot).

Die Zellen passieren in einem laminaren Strom einzeln einen Laserstrahl, wobei es zur Streuung des Lichtes kommt, sowie zur Anregung der gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht einer bestimmten Wellenlänge emittieren. Dieses Licht kann durch ein komplexes System aus Spiegeln und Filtern im Durchflusszytometer gebündelt und zerlegt werden. Für jeden unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoff erhält man somit ein spezifisches Signal, welches in einem Diagramm grafisch dargestellt werden kann (109).

2.2.2.2 Praktische Durchführung

Es wurden jeweils 10µl der zu messenden Probe (verschieden stimulierte dendritische Zellen) mit 10µl der Antikörperlösung bei Raumtemperatur für 20 Minuten im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurde zweimal mit 200µl PBS/ 1% FCS gewaschen, zum Schluss in 100µl PBS resuspendiert und schließlich im Durchflusszytometer gemessen.

2.2.3 Proliferationsmessung

Die verschieden stimulierten DC sollten bezüglich ihrer Proliferationsinduktion von naiven T-Zellen (CD4⁺CD45RA⁺-Zellen) untersucht werden. Dazu wurden verschiedene Ansätze naiver T-Zellen (50000 Zellen) mit den unterschiedlich stimulierten dendritischen Zellen nach folgendem Schema auf 96 Well Rundbodenplatten von NUNC angelegt:

1. 50.000 CD4⁺CD45RA⁺Zellen + 10 µl SEB
2. 50.000 CD4⁺CD45RA⁺Zellen + 10.000 iDC +SEB
3. 50.000 CD4⁺CD45RA⁺Zellen + 10.000 iDC (IL-10) +SEB
4. 50.000 CD4⁺CD45RA⁺Zellen + 10.000 iDC (CCL18) +SEB
5. 50.000 CD4⁺CD45RA⁺Zellen + 10.000 mDC +SEB
6. 50.000 CD4⁺CD45RA⁺Zellen + 10.000 mDC (IL-10) +SEB
7. 50.000 CD4⁺CD45RA⁺Zellen + 10.000 mDC (CCL18) +SEB
8. Medium

Außerdem wurden die gleichen Ansätze (1.-8.) auch mit allogenen Kulturen, dann ohne SEB, hergestellt.

Aufgefüllt wurde mit Medium auf je 200 µl Gesamtvolumen / Well.

Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit ³[H]-Thymidin (1,85 x 10⁴ Bq/Kultur) versetzt und für 18 Stunden im Brutschrank bei 37° C und 5 % CO₂ inkubiert. Anschließend wurden die Platten eingefroren und zur weiteren Verarbeitung gebündelt aufgetaut. Danach wurde die Inkorporation von ³[H]-Thymidin in die DNA der sich teilenden Zellen mit einem Betaplate-Zähler gemessen. Dabei wurde die radioaktive Zerfallszahl pro Kulturschale und pro Minute gemessen. Der Versuch wurde in Kooperation mit dem Labor von Frau Melchers durchgeführt, anlehnend an den von ihr beschriebenen Proliferationsassay (89)

2.2.4 Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) -Technik

Der Enzym-Linked Immunosorbent Assay beruht auf einer Antigen-Antikörper-Reaktion zur Quantifizierung z.B. von Zytokinen. Beim ELISA-Sandwich-System ist der monoklonale spezifische Erstantikörper an eine feste Phase, die Mikrotiterplatte, gebunden und bildet mit dem gesuchten Zytokin einen Immunkomplex, der sich auch durch mehrmaliges Waschen nicht lösen lässt. Es wird nun ein biotinylierter Zweitantikörper hinzugegeben, an den das Enzym Avidinperoxidase gekoppelt ist, das unter Substratzugabe eine Farbreaktion induziert (s. Abbildung 2). Die Farbreaktion lässt sich photometrisch auswerten. Anhand einer Standardkurve kann man die gesuchte Zytokinkonzentration berechnen.

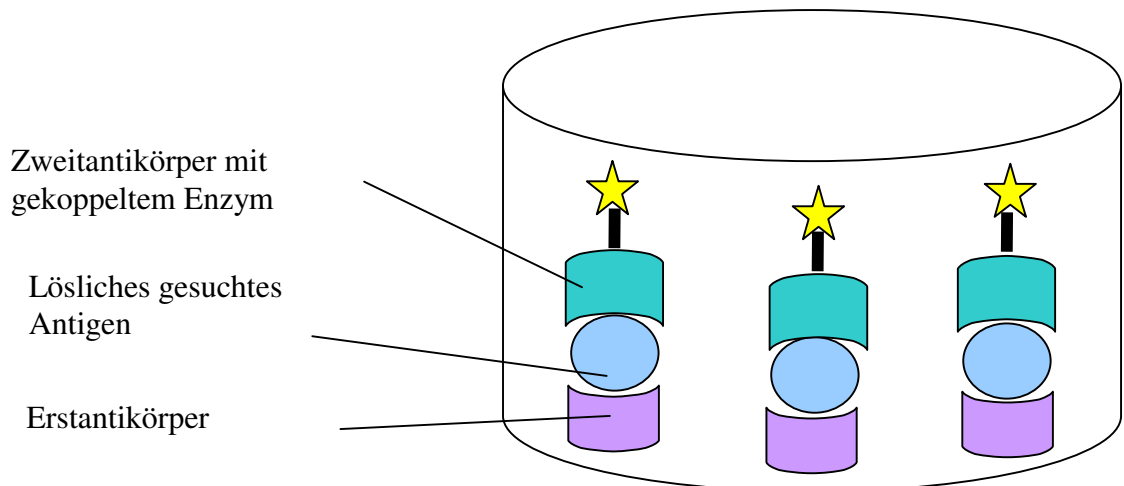


Abb.2: Darstellung der Funktionsweise der Enzym-Linked Immunosorbent Assay (ELISA) –Technik.

2.2.4.1 IL-4, IL-10, IL-13, IFN- γ und CCL18 ELISA

Um das Zytokinmuster der durch die dendritischen Zellen geprägten naiven T-Zellen ($CD4^+CD45RA^+$) im Sinne einer Th1- (IFN- γ) oder Th2- (IL-4, IL-10 und IL-13) Antwort zu bestimmen, wurden 500.000 $CD4^+CD45RA^+$ -Zellen mit SEB (100 pg/ml) und mit 100.000 dendritischen Zellen für 5 Tage in einer 48 Well Flachbodenplatte zusammen inkubiert, anschließend abzentrifugiert und mit IL-2 (50 U/ml) für weitere 5 Tage inkubiert. Eine konstante Zellzahl wurde daraufhin für 48 Stunden mit 10^{-8} M PMA und 10^{-6} M Calcium-Ionophor stimuliert, die Überstände abgenommen und im ELISA gemessen.

Es gab im Einzelnen folgende Ansätze:

500.000 CD4⁺CD45RA⁺-Zellen + 20µl SEB
 500.000 CD4⁺CD45RA⁺-Zellen + 100.000 iDC + SEB
 500.000 CD4⁺CD45RA⁺-Zellen + 100.000 iDC (IL-10) + SEB
 500.000 CD4⁺CD45RA⁺-Zellen + 100.000 iDC (CCL18)+ SEB
 500.000 CD4⁺CD45RA⁺-Zellen + 100.000 mDC + SEB
 500.000 CD4⁺CD45RA⁺-Zellen + 100.000 mDC (IL-10) + SEB
 500.000 CD4⁺CD45RA⁺-Zellen + 100.000 mDC (CCL18) + SEB

Die Zellen wurden in Medium mit einer Konzentration von 1 Mio. Zellen / ml kultiviert.

Zusätzlich wurden die gleichen Ansätze auch wieder in einer allogenen Kultur hergestellt, wiederum ohne die Zugabe von SEB, dafür wurde jedoch IL-3 hinzugegeben.

Die allogenen Ansätze wurden bereits nach 7 Tagen für 48 Stunden mit 10^{-8} M PMA / 10^{-6} M Calcium-Ionophor stimuliert, die Überstände abgenommen und im ELISA gemessen.

2.2.4.2 ELISA-Protokoll

Coating mittels Antikörper gegen das zu bestimmende Zytokin:

Je 50 µl einer Lösung des ersten Antikörpers (Fängerantikörper) in einer Konzentration von 2 µg/ml wurden in Coatingpuffer in die Wells einer Mikrotiterplatte pipettiert. Dies wurde bei 4° C über Nacht inkubiert und anschließend 2 x mit 200µl PBS/Tween (0,05 %) gewaschen.

Blocking:

Um unspezifische Bindungen zu vermeiden, wurden in jedes Well 100 µl PBS + 1 % BSA (beim CCL18-ELISA zusätzlich NaN₃ 0,5% + Succrose 5%) gegeben und nach zweistündiger Inkubation 4 x mit PBS/Tween (0,05 %) gewaschen.

Auftragen der Standards und Proben:

50 µl jeder Probe und der verschiedenen Verdünnungen der Standardlösung (in PBS + 1 % BSA) wurden als Doppelbestimmungen in die Wells pipettiert und über Nacht bei 4° C inkubiert. Für die Standardkurve wurde eine Verdünnungsreihe mit bekannter Zytokinkonzentrationen und einer Leerkontrolle mitgeführt. Nicht gebundene Moleküle wurden am nächsten Tag mit PBS/Tween (0,05 %) in vier Durchgängen ausgewaschen.

Bindung des zweiten Antikörpers:

Pro Well wurden 50 µl einer biotinylierten Antikörper-Lösung (2 µl/ml in PBS + 1 % BSA) hinzugegeben und nach 45-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur 4 x mit PBS/Tween (0,05 %) gewaschen.

Beschichtung mit Avidinperoxidase:

Nach Zugabe von 100 µl einer 1: 400 verdünnten Avidinperoxidase-Lösung (1mg/ml) (in PBS + 1 % BSA) pro Well wurde die Platte für 30 Minuten inkubiert und anschließend 4 x mit PBS/Tween (0,05 %) gewaschen.

Farbreaktion:

500 µl TMB wurde in 10 ml Substratpuffer gelöst und zu je 100 µl in jedes Well pipettiert. Die Farbreaktion wurde mit je 50 µl 4 N Schwefelsäure gestoppt.

Messung der Farbreaktion:

Die quantitative Messung der Färbung erfolgte mit dem ELISA-Reader LP 400 mit einem Messfilter von 405 nm und einem Referenzfilter von 620 nm. Die Intensität der Farbreaktion stellt ein Maß für die Zytokinkonzentration im Überstand dar.

2.2.5 Statistische Auswertung:

Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardabweichung einer Stichprobe angegeben. Verwendet wurde der gepaarte t-Test bei normalverteilten Daten. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3 ERGEBNISSE

3.1 Bestimmung der CCL18-Konzentration in DC-Überständen von Atopikern und Normalpersonen

Zunächst wurden aus Monozyten von $n = 11$ Probanden durch Gabe von GM-CSF und IL-4 dendritische Zellen generiert. An Tag 7 wurden die Überstände entnommen und anschließend darin die CCL18-Konzentration mittels ELISA gemessen.

In den Seren der Probanden wurde die Konzentration des Gesamt-IgE bestimmt und so das Probandenkollektiv in Allergiker ($n = 7$) und Normalpersonen ($n = 4$) eingeteilt.

In den Überständen von dendritischen Zellen von Allergikern ließ sich eine deutlich höhere Konzentration von CCL18 ($285,7 \pm 110,8$ ng/ml) feststellen als in den Überständen der Kontroll-DCs ($121,7 \pm 78,2$ ng/ml) (s. Abbildung 3). Mit $p < 0,03$ war diese Differenz statistisch signifikant.

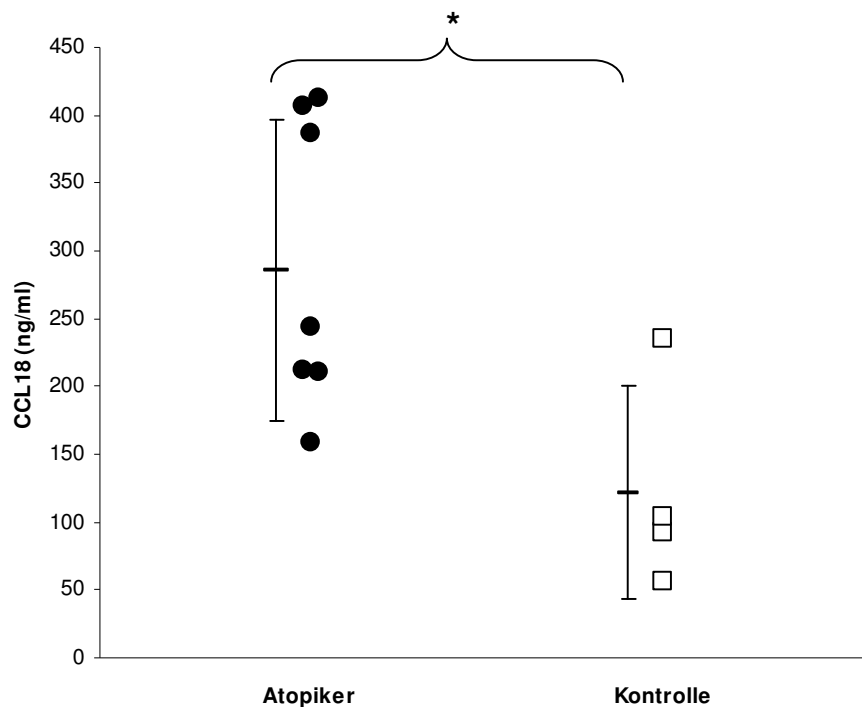


Abb.3: CCL18-Produktion in Überständen von DC von Atopikern ($n=7$) und Normalpersonen ($n=4$) in ng/ml; Daten sind mit \pm SD angegeben

3.2 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Um die Expression von Oberflächenmolekülen auf den verschiedenen stimulierten frisch generierten Dendritischen Zellen zu bestimmen, wurden sie mit den entsprechenden Antikörpern gefärbt und anschließend die Expression im Durchflusszytometer gemessen. Es wurden sowohl immature (iDC) als auch mature (mDC) dendritische Zellen analysiert. Zudem wurde die Expression der Oberflächenmarker nach Stimulation mit CCL18 bzw. IL-10 verglichen. Dabei wurden sowohl der prozentuale Anteil der Zellen, die den jeweiligen Oberflächenmarker trugen, als auch die Dichte der Marker auf der Zelloberfläche in RFI (relative Fluoreszenz-Intensität) gemessen. Untersucht wurde auf den Zellen die Expression von folgenden Oberflächenmarkern:

HLA-DR, CD86, CD80, CD83, CD16, CD11c, CD40, und CD1a.

3.2.1 Oberflächenexpression von HLA-DR:

HLA-DR ist ein MHC-II-Molekül, welches von antigenpräsentierenden Zellen getragen wird und über das die APC das Antigen präsentiert. Der prozentuale Anteil von Zellen, die HLA-DR exprimierten, war in unserer Messung bei jeder Zellart sehr hoch (s. Tabelle 2). Jedoch ließen sich bei der Ermittlung der Dichte der HLA-DR-Moleküle auf den Oberflächen der dendritischen Zellen einige z.T. statistisch signifikante Unterschiede feststellen.

Im Vergleich von immaturren und maturaen dendritischen Zellen beobachteten wir einen signifikanten Anstieg der HLA-DR-Dichte auf den maturaen Zellen (von $160,1 \pm 51,7$ bei immaturren dendritischen Zellen auf $317,5 \pm 160,3$ bei maturaen dendritischen Zellen, $p < 0,05$; $n=6$).

Die Zugabe von CCL18 hatte eine signifikante Zunahme der HLA-DR-Dichte sowohl auf den immaturren als auch auf den maturaen dendritischen Zellen zur Folge:

Nach CCL18-Stimulation stieg die Dichte der HLA-DR-Moleküle auf den immaturren dendritischen Zellen von $160,1 \pm 51,7$ auf $215,5 \pm 94,7$, dabei war $p < 0,03$; $n=6$ (s. Abbildung 4). Matura dendritische Zellen zeigten nach CCL18-Stimulation im Mittel eine HLA-DR-Dichte von $421,6 \pm 241,8$ im Gegensatz zu den maturaen dendritischen Zellen, die nicht mit CCL18 inkubiert wurden ($317,5 \pm 160,3$), auch diese Zunahme war mit $p < 0,05$; $n=6$ statistisch signifikant (s. Abbildung 5).

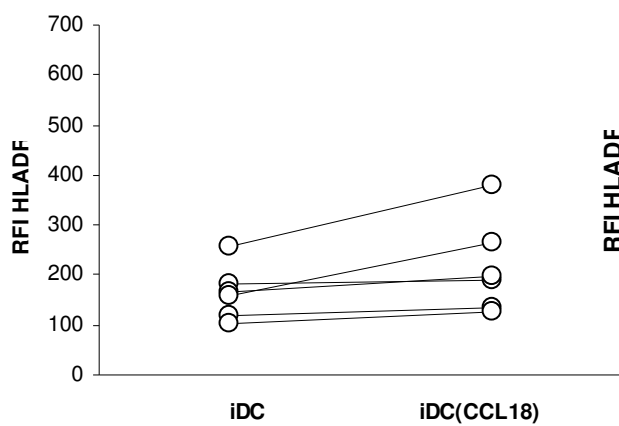


Abb.4: Dichte des Oberflächenmarkers HLA-DR auf unreifen dendritischen Zellen im Vergleich zu unreifen dendritischen Zellen, die mit CCL18 stimuliert wurden in RFI

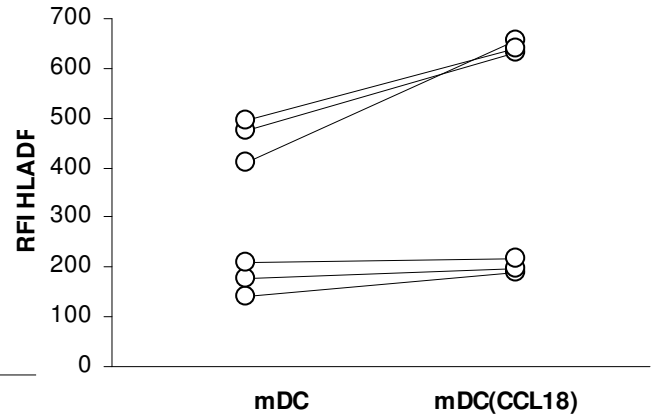


Abb.5: Dichte des Oberflächenmarkers HLA-DR auf reifen dendritischen Zellen im Vergleich zu reifen dendritischen Zellen, die mit CCL18 stimuliert wurden in RFI

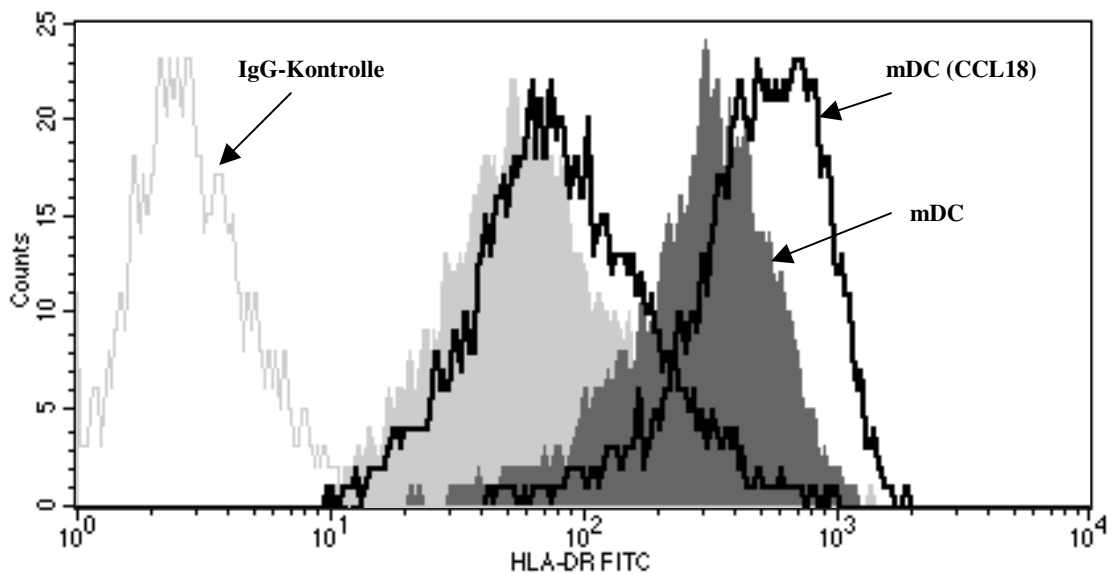


Abb.6: Darstellung der Dichte des Oberflächenmarkers HLA-DR in RFI. Links: Kontrolle; Mitte (hellgrau): iDC; rechts (dunkelgrau): mDC; schwarz: nach CCL18-Stimulation; exemplarische Einzeldarstellung

Bei den mit IL-10 stimulierten dendritischen Zellen zeigte sich keine signifikante Veränderung in der HLA-DR-Dichte im Vergleich zu den dendritischen Zellen ohne IL-10-Zugabe. Beinahe gleich blieb der Wert bei den immaturen dendritischen Zellen (von $160,1 \pm 51,7$ bei iDC auf $163,0 \pm 68,0$ bei iDC mit IL-10). Auf maturen dendritischen Zellen zeigte sich eine leicht verminderte HLA-DR-Dichte, wenn sie mit IL-10 stimuliert worden waren, der Unterschied war jedoch nicht signifikant (von $317,5 \pm 160,3$ bei mDC auf $290,8 \pm 143,7$ bei mDC mit IL-10; n=6) (Werte s. Tabellen 2 u. 3).

3.2.2 Oberflächenexpression weiterer Marker

Oberflächenexpression von CD86

Der Marker CD86 ist ein wichtiges Molekül bei der T-Zell-Kostimulation durch antigenpräsentierende Zellen.

Die Dichte der CD86- Expression war bei den maturen dendritischen Zellen zwar höher ($60,4 \pm 41,8$) als bei den immaturen ($49,0 \pm 40,7$), jedoch war diese Differenz mit $p= 0,09$; n=6 nicht statistisch signifikant. Signifikante Unterschiede zeigten sich dagegen bei den immaturen und maturen dendritischen Zellen, die mit IL-10 stimuliert waren: Bei beiden Gruppen verminderte sich die Dichte an CD86 auf der Oberfläche (iDC versus iDC mit IL-10: von $49,0 \pm 40,7$ auf $28,6 \pm 27,3$, mit $p<0,04$; n=6 und analog mDC versus mDC mit IL-10: von $60,4 \pm 41,8$ auf $46,1 \pm 36,9$, mit $p<0,02$; n=6) statistisch signifikant. Für die CCL18 – Stimulation konnte kein statistisch signifikanter Effekt auf die CD86 Expression auf dendritischen Zellen festgestellt werden (Werte s. Tabellen 2 u. 3).

Oberflächenexpression von CD80

Ebenso wie CD86 spielt dieser Marker eine wichtige Rolle bei der T-Zell-Kostimulation. Vergleichbar zu CD86 war der Anteil der maturen dendritischen Zellen, die CD80 trugen ($35,6 \% \pm 34,9 \%$), höher als der der immaturen DC ($17,0 \% \pm 20,8 \%$), jedoch war auch dieser Unterschied mit $p = 0,052$; n=6 nicht statistisch signifikant. Auch gab es weder bei der Stimulation der dendritischen Zellen mit CCL18 noch mit IL-10 signifikante Veränderungen (Werte s. Tabelle 2).

Oberflächenexpression von CD83

CD83 gilt als Marker für mature dendritische Zellen. In unseren Messungen war der Wert schon bei den immaturen dendritischen Zellen mit $42,2 \% \pm 27,7 \%$ recht hoch, jedoch nahm der prozentuale Anteil an CD83⁺Zellen bei maturen ($72,7 \% \pm 21,9 \%$) gegenüber immaturen dendritischen Zellen signifikant zu ($p<0,02$; n=6). Die Stimulation der dendritischen Zellen mit CCL18 ließ keine deutliche Veränderung erkennen, Bei einem p-Wert von $0,42$; n=6, ließ sich kein signifikanter Unterschied bezüglich des Anteils der CD83⁺ Zellen zwischen den

maturen, mit IL-10 stimulierten dendritischen Zellen ($64,3 \% \pm 26,3 \%$) und dem der unstimulierten, CD83⁺-mDC ($72,7 \% \pm 21,9 \%$), feststellen (Werte s. Tabelle 2).

Oberflächenexpression von CD16

CD16 ist ein niedrigaffiner IgG-Rezeptor, auch Fc γ RIII genannt, er vermittelt Phagozytose und wird von Makrophagen, neutrophilen Zellen und NK-Zellen exprimiert. Exprimiert wurde er auch in unseren Messungen von $18,6 \% \pm 14,8 \%$ der immaturen und von $30,4 \% \pm 25,3 \%$ der maturen dendritischen Zellen. Die Stimulation mit IL-10 führte zu einem Anstieg des prozentualen Anteils an CD16⁺ Zellen; dies sowohl bei den immaturen (von $18,6 \% \pm 14,8 \%$ auf $41,9 \% \pm 21,0 \%$) als auch bei den maturen dendritischen Zellen (von $30,4 \% \pm 25,3 \%$ auf $32,8 \% \pm 16,7 \%$). Die Zunahme war aber nur bei den immaturen DC signifikant ($p < 0,02$; $n=6$). In Bezug auf die Zugabe von CCL18 ließen sich keinerlei signifikante Veränderungen feststellen (Werte s. Tabelle 2).

Oberflächenexpression von CD11c

CD11c ist eine Untereinheit des Integrins CR4, es bindet unter anderem Fibrinogen und wird von myeloiden Zellen exprimiert. Im peripheren Blut gilt es als ein Marker für dendritische Zellen. Offensichtlich übernimmt es bei der Kostimulation ebenfalls wichtige Funktionen. Generell wiesen in unseren Versuchen fast 100 % der Zellen diesen Marker auf. Bezüglich der Dichte der CD11c-Expression auf den dendritischen Zellen konnte in keiner Messung ein signifikanter Unterschied zwischen den Zellgruppen festgestellt werden. Bei den maturen DC lag sie etwas höher als bei den immaturen dendritischen Zellen.

Der höchste Wert wurde für die maturen dendritischen Zellen festgestellt, die mit CCL18 stimuliert waren ($518,0 \pm 248,5$). Obwohl die Unterschiede teilweise recht deutlich ausfielen (s. Tabelle 3), ergaben sich vermutlich aufgrund der geringen Anzahl ($n=6$) keine statistischen Signifikanzen (Werte s. Tabellen 2 u. 3).

Oberflächenexpression von CD40

CD40 bindet CD40L, das auf aktivierten T-Helferzellen vorhanden ist und ebenfalls zu den kostimulatorischen Signalen gehört. Der Prozentsatz der dendritischen Zellen, die CD40 exprimierten, änderte sich in den verschiedenen Ansätzen nicht signifikant; der der immaturen DC lag beispielsweise bei $54,9 \% \pm 28,0 \%$, während der der maturen DC bei $69,7 \% \pm 17,9 \%$ lag. Die Dichte des Oberflächenmarkers CD40 erhöhte sich bei den maturen DC, verglichen mit den immaturen von $13,8 \pm 8,9$ auf $18,8 \pm 14,5$; mit $p=0,08$; $n=6$ war die Differenz jedoch nicht statistisch signifikant (Werte s. Tabellen 2 u. 3).

Oberflächenexpression von CD1a

CD1a ist ein Marker für dendritische Zellen. Auch hier änderte sich der Prozentsatz der dendritischen Zellen, die CD1a exprimierten, in den verschiedenen Ansätzen nicht signifikant.

Zusammenfassung der Ergebnisse der Durchflusszytometrie als Tabelle

	iDC	iDC(CCL18)	iDC(IL-10)	mDC	mDC(CCL18)	mDC(IL-10)
HLA-DR	97,75 % ± 3,6 %	99,1 % ± 1,6 %	99,3 % ± 0,5 %	98,7 % ± 1,8 %	98,7 % ± 1,1 %	98,4 % ± 2,4 %
CD86	76,5 % ± 22,0 %	63,7 % ± 29,3 %	61,5 % ± 29,9 %	92,7 % ± 9,3 %	94,9 % ± 7,0 %	82,3 % ± 23,6 %
CD80	17,0 % ± 20,8 %	27,2 % ± 34,6 %	25,7 % ± 32,2 %	35,6 % ± 34,9 %	39,2 % ± 41,8 %	33,9 % ± 34,3 %
CD83	42,2 % ± 27,7 %	56,1 % ± 28,6 %	55,7 % ± 25,7 %	72,7 % ± 21,9 % ^a	71,6 % ± 22,4 %	64,3 % ± 26,3 %
CD16	18,6 % ± 14,8 %	32,2 % ± 17,8 %	41,9 % ± 21,0 % ^d	30,4 % ± 25,3 %	28,4 % ± 19,9 %	32,8 % ± 16,7 %
CD11c	97,7 % ± 2,0 %	97,4 % ± 4,7 %	99,2 % ± 1,1 %	99,4 % ± 0,8 %	99,5 % ± 0,5 %	99,3 % ± 0,6 %
CD40	54,8 % ± 28,0 %	57,2 % ± 34,6 %	61,1 % ± 28,8 %	69,7 % ± 17,9 %	73,3 % ± 13,8 %	68,5 % ± 23,7 %
CD1a	93,9 % ± 71,2 %	82,9 % ± 59,9 %	79,6 % ± 56,1 %	96,0 % ± 85,0 %	94,6 % ± 75,7 %	74,9 % ± 32,3 %

Tabelle 2: Anteil der immaturen und maturen dendritischen Zellen, die die Oberflächenmarker HLA-DR, CD86, CD80, CD83, CD16, CD11c, CD40 und CD1a tragen in Prozent; Daten sind mit ± SD angegeben. Signifikanzen: a: p<0,05 zwischen mDC und iDC; d: p<0,05 zwischen iDC und iDC(IL-10)

RFI	iDC	iDC(CCL18)	iDC(IL-10)	mDC	mDC(CCL18)	mDC(IL-10)
HLA-DR	160,1 ± 51,7	215,5 ± 94,7 ^b	163,0 ± 68,0	317,5 ± 160,3 ^a	421,6 ± 241,8 ^c	290,8 ± 143,7
CD86	49,0 ± 40,7	30,8 ± 12,7	28,6 ± 27,3 ^d	60,4 ± 41,8	65,3 ± 40,9	46,1 ± 36,9 ^e
CD11c	367,8 ± 102,7	382,4 ± 213,9	452,9 ± 230,1	476,9 ± 213,1	518,0 ± 248,5	464,9 ± 227,6
CD40	13,8 ± 8,9	12,1 ± 7,6	13,5 ± 8,8	18,8 ± 14,5	20,0 ± 17,5	19,4 ± 14,5

Tab.3: Relative Fluoreszenzintensität für die Oberflächenmarker HLA-DR, CD86, CD11c und CD40 auf den verschieden stimulierten immaturen und maturen dendritischen Zellen; Daten sind mit ± SD angegeben. Signifikanzen: a: p<0,05 zwischen mDC und iDC; b: p<0,05 zwischen iDC und iDC(CCL18); c: p<0,05 zwischen mDC und mDC(CCL18); d: p<0,05 zwischen iDC und iDC(IL-10); e: p<0,05 zwischen mDC und mDC(IL-10)

3.3 Ergebnisse der Proliferationsmessung

Die Proliferation der T-Zellen, die durch die kokultivierten APC induziert wird, wurde durch die Messung der [³H]-Thymidininkorporation in counts per minute (cpm) ermittelt. Berechnet wurde der Stimulationsindex, der sich aus dem Quotienten

$\text{cpmAPC} + \text{CD4}^+\text{CD45RA}^+ / \text{cpmCD4}^+\text{CD45RA}^+$ zusammensetzt, er wird im Folgenden mit der Standardabweichung (\pm SD) angegeben.

Es wurden sowohl allogene als auch autologe Kokulturen (dann mit SEB-Zugabe) getestet. Hier wurde die Proliferationsinduktion von immaturren (iDC) und maturen (mDC) dendritischen Zellen, jeweils nach Stimulation mit CCL18 oder IL-10, auf naive T-Zellen ($\text{CD4}^+\text{CD45RA}^+$) untersucht. Die Ergebnisse werden als Stimulationsindex (SI) angegeben, Beim Vergleich der Proliferationsinduktion durch immature und mature DC konnte bei den maturen DC ein leichter Anstieg des SI festgestellt werden, der jedoch nicht statistisch signifikant war: bei der allogenen Kultur betrug der SI von iDC $41,1 \pm 15,9$ und der SI von mDC $48,0 \pm 12,8$; bei der autologen Kultur stieg der SI von $45,1 \pm 11,0$ bei iDC auf den SI von $50,2 \pm 5,5$ bei mDC; n=6.

3.3.1 Proliferationsinduktion durch mature Dendritische Zellen im autologen Ansatz

Sowohl durch die Zugabe von CCL18 als auch durch die Zugabe von IL-10 wurde die Proliferationsinduktion durch mature dendritische Zellen signifikant gemindert:

Der Stimulationsindex betrug bei den maturen dendritischen Zellen $50,2 \pm 5,5$. Er sank bei den mit CCL18 stimulierten dendritischen Zellen auf $38,4 \pm 17,3$ SI ($p < 0,03$; n=6) und analog bei den IL-10-stimulierten dendritischen Zellen auf $41,1 \pm 14,2$ SI ($p < 0,05$; n=6).

Im Folgenden ist ein Experiment aus n=6 vergleichbaren Ansätzen dargestellt:

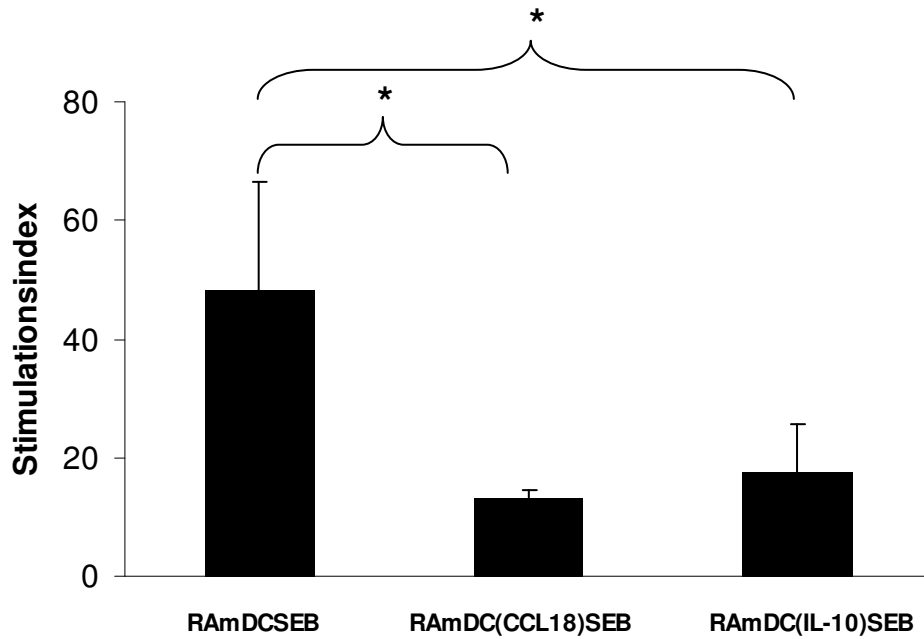
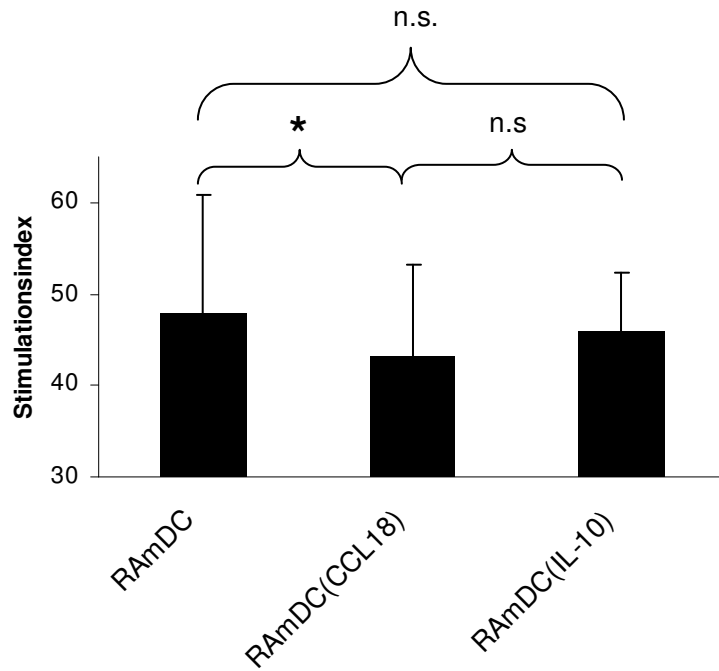


Abb.7: Proliferationsinduktion von murenen dendritischen Zellen mit SEB, die mit CCL18 bzw. mit IL-10 stimuliert wurden bei naiven T-Zellen im autologen Ansatz; Darstellung eines exemplarischen Experiments

3.3.2 Proliferationsinduktion durch mature dendritische Zellen im allogenen Ansatz

Ähnlich wie im autologen Ansatz induzierten auch im allogenen Ansatz die dendritischen Zellen, die einer CCL18-Stimulation ausgesetzt waren, eine signifikant geringere Proliferation (s. Abbildung 8) (SI: $43,2 \pm 10,0$) bei den naiven T-Zellen ohne CCL18 (SI: $48,0 \pm 12,8$), $p < 0,05$; $n=6$. Im Gegensatz zum autologen Ansatz zeigte der Stimmulationsindex der IL-10-behandelten dendritischen Zellen keine signifikanten Veränderungen (SI: $48,0 \pm 12,8$ vs $46,0 \pm 16,2$ $p=0,81$; $n=6$).



*Abb.8: Proliferationsinduktion von muren dendritischen Zellen, die mit CCL18 bzw. mit IL-10 stimuliert wurden bei naiven T-Zellen im allogenen Ansatz; * $p < 0.05$*

3.3.3 Proliferationsinduktion durch immature dendritische Zellen

Im autologen Ansatz konnten kaum Veränderungen in der Proliferationsinduktion gemessen werden. Während der Stimmulationsindex bei den immaturren dendritischen Zellen ohne Zusatz von CCL18 oder IL-10 bei $45,1 \pm 11,0$ lag, wurde er bei den mit CCL18 behandelten Zellen ein SI von $45,4 \pm 16,0$ und bei den mit IL-10 stimulierten Zellen von $43,9 \pm 15,1$ gemessen.

Die Messung im allogenen Ansatz zeigt eine signifikante Steigerung der Proliferationsinduktion durch immature dendritische Zellen bei naiven T-Zellen, wenn sie IL-10-stimuliert waren (von $41,1 \pm 15,9$ auf $45,0 \pm 11,0$; $p < 0,05$; $n=6$). Auch die mit CCL18 stimulierten Zellen induzierten eine leicht erhöhte Proliferation, wenn auch nicht signifikant (SI: von $41,1 \pm 15,9$ auf $46,1 \pm 15,2$; $p=0,073$; $n=6$).

3.4 Ergebnisse der Zytokin-ELISA-Messung

Um den Einfluss von CCL18 auf die antigenpräsentierenden Eigenschaften von dendritischen Zellen zu untersuchen, wurde die Produktion von verschiedenen Zytokinen durch unterschiedlich geprimte naive T-Zellen gemessen. Dazu wurden Kulturen von naiven T-Zellen mit maturen und immaturen dendritischen Zellen (mDC und iDC) angesetzt, welche mit verschiedenen CCL18-Konzentrationen bzw. mit IL-10 stimuliert wurden. Es wurden sowohl autologe Ansätze als auch allogene im Sinne einer mixed lymphocyte reaction hergestellt. Bei den autologen Ansätzen wurde den naiven T-Zellen noch SEB zugefügt. Im allogenen Ansatz betrug die Inkubationszeit 7 Tage, im autologen Ansatz wurden die T-Zellen nach 5 Tagen Kokultur mit den dendritischen Zellen noch für weitere 5 Tage mit IL-2 expandiert. Anschließend wurde nach zwei Tagen Inkubation mit Calcium-Ionophor und PMA die Überstände entnommen und mittels ELISA in ihnen die Konzentration der Zytokine IFN- γ , IL-13, IL-4 und IL-10 gemessen. Im Folgenden werden die Ergebnisse für die einzelnen Zytokine aufgeführt.

3.4.1 Bestimmung der IFN- γ -Produktion durch unterschiedlich geprimte naive T-Zellen

Wir konnten einen deutlich supprimierenden Effekt der CCL18-Stimulation von dendritischen Zellen auf die IFN- γ -Produktion der T-Zellen feststellen. Sowohl in den autologen als auch in den allogenen Ansätzen war die IFN- γ Produktion statistisch signifikant niedriger bei den Ansätzen, in denen mit CCL18 stimulierte dendritische Zellen verwendet wurden (s. Tabelle 4). Im autologen Ansatz sank die IFN- γ -Produktion von $37,3 \pm 20,4$ ng/ml bei Kokultur mit maturen dendritischen Zellen auf $28,8 \pm 23$ ng/ml bei Kokultur mit maturen dendritischen Zellen, die zusätzlich mit CCL18 stimuliert wurden; dieser Unterschied war mit $p < 0,02$; $n = 10$ statistisch signifikant.

Im allogenen Ansatz verringerte sich die IFN- γ -Produktion von $83,7 \pm 111,9$ ng/ml bei maturen dendritischen Zellen auf $64,4 \pm 109,7$ ng/ml bei maturierten und mit CCL18 stimulierten dendritischen Zellen. Für diese statistisch signifikante Differenz ergab sich ein $p < 0,03$; $n = 8$.

Zudem ließ sich, wie die folgenden Einzeldarstellungen zeigen, ein Konzentrationsabhängiger Effekt auf die IFN- γ -Produktion der mit den DC geprimten T-Zellen belegen (s. Abbildung 9 u. 10). DC, die mit 1000ng/ml CCL18 stimuliert wurden, führten zu einer stärkeren IFN- γ

Inhibition der IFN- γ -Produktion der T-Zellen als DC, die mit 500 ng/ml oder 100 ng/ml CCL18 geprimt wurden.

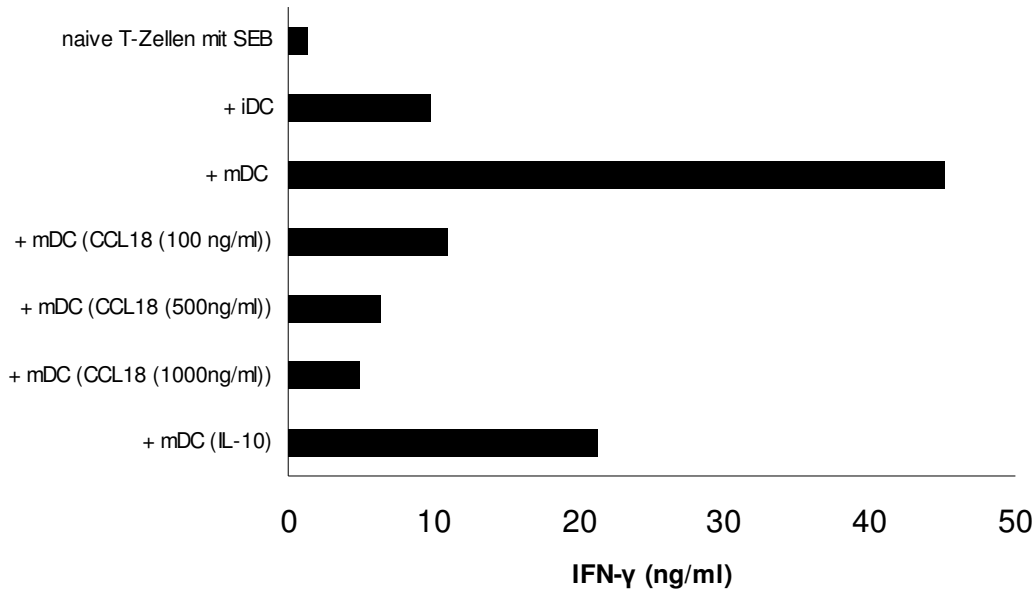


Abb.9: Einzeldarstellung eines charakteristischen Experiments bzgl. der IFN- γ -Produktion von naiven T-Zellen + SEB, die im autologen Ansatz mit dendritischen Zellen kokultiviert wurden. Die DC waren wie angegeben stimuliert worden bevor sie im Experiment eingesetzt wurden.

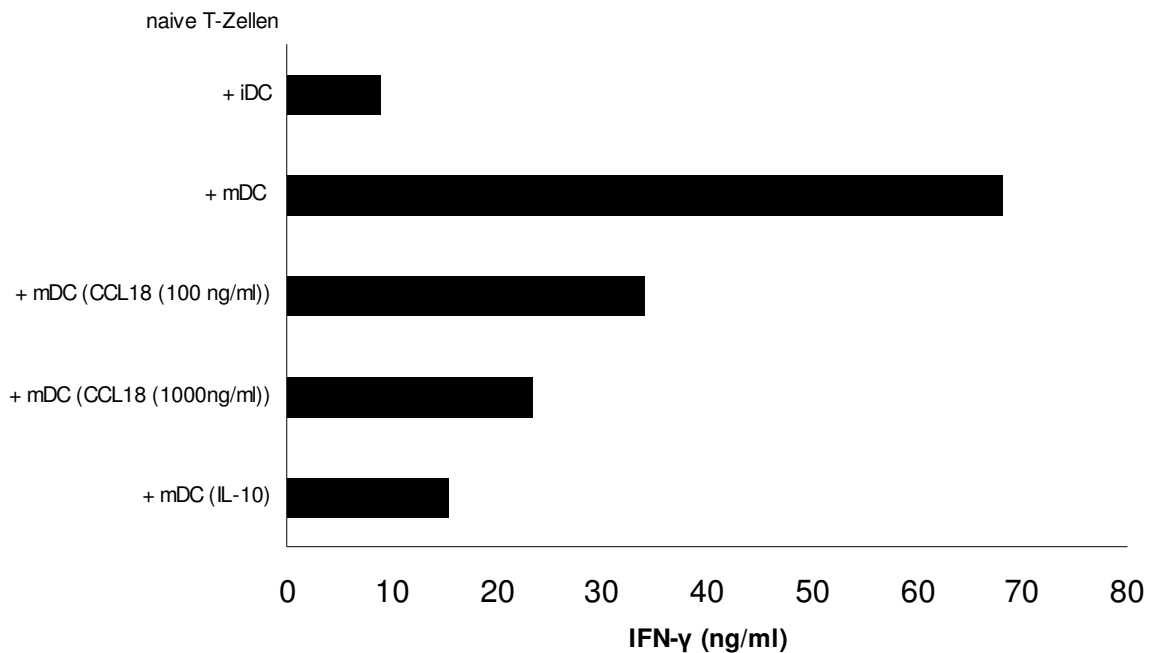


Abb.10: Einzeldarstellung eines charakteristischen Experiments bzgl. der IFN- γ -Produktion von naiven T-Zellen, die im allogenen Ansatz mit dendritischen Zellen kokultiviert wurden. Die DC waren wie angegeben stimuliert worden bevor sie im Experiment eingesetzt wurden.

Anders als bei den muren DC konnte bei den immaturren dendritischen Zellen, die mit CCL18 stimuliert waren, weder im autologen noch im allogenen Ansatz eine statistisch signifikante Abnahme der konsekutiven IFN- γ -Produktion durch die unterschiedlich geprimten T-Zellen gemessen werden: Die IFN- γ -Produktion sank im autologen Ansatz von $34,1 \pm 19,8$ ng/ml auf $20,1 \pm 18,2$ ng/ml nach CCL18-Stimulation; $p=0,39$; $n=10$; im allogenen Ansatz von $56,5 \pm 95,9$ ng/ml auf $41,7 \pm 65,5$ ng/ml; $p=0,92$; $n=8$.

In \ddot{U} bereinstimmung mit der Literatur produzierten T-Zellen, die durch mature DC aktiviert wurden, mehr IFN- γ als solche, die mit immaturren DC kultiviert wurden:

Dies zeigen die Messergebnisse der autologen (von $34,1 \pm 19,8$ ng/ml (naive T-Zellen mit iDC) auf $37,3 \pm 20,4$ ng/ml (naive T-Zellen mit mDC)) und auch der allogenen (von $41,7 \pm 65,5$ ng/ml (naive T-Zellen mit iDC) auf $83,7 \pm 111,9$ ng/ml (naive T-Zellen mit mDC)) Ansätze, wobei bei letzteren die Zunahme mit $p<0,02$; $n=8$ auch statistisch signifikant war.

Wenn die dendritischen Zellen mit IL-10 stimuliert wurden, nahm die IFN- γ -Produktion durch die T-Zellen in unseren Ansätzen ab (außer bei den immaturren DC im allogenen Ansatz), diese Abnahme war jedoch in keinem Fall statistisch signifikant (Werte s. Tabelle 4).

autolog	n=10	IFN-γ
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +SEB		5,9 \pm 5 ng/ml
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +iDC+SEB		34,1 \pm 19,8 ng/ml
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +iDC (CCL18)+SEB		20,1 \pm 18,2 ng/ml
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +mDC+SEB		37,3 \pm 20,4 ng/ml
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +mDC (CCL18)+SEB		28,8 \pm 23 ng/ml ^b
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +mDC (IL-10)+SEB		33,8 \pm 21,5 ng/ml
allogen	n=8	
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +iDC		56,5 \pm 95,9 ng/ml
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +iDC (CCL18)		41,7 \pm 65,5 ng/ml
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +mDC		83,7 \pm 111,9 ng/ml ^a
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +mDC (CCL18)		64,4 \pm 109,7 ng/ml ^b
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +mDC (IL-10)+SEB		60,6 \pm 100,1 ng/ml

Tab.4: IFN- γ -Produktion der naiven T-Zellen (CD4⁺CD45RA⁺), die durch verschieden stimulierte DC im autologen und allogenen Ansatz geprimt wurden; Konzentration CCL18 = 100ng/ml. Signifikanzen:

a: $p<0,05$ zwischen CD4⁺CD45RA⁺+iDC (+SEB) und CD4⁺CD45RA⁺+mDC (+SEB);

b: $p<0,05$ zwischen CD4⁺CD45RA⁺+mDC (+SEB) und CD4⁺CD45RA⁺+mDC (CCL18) (+SEB)

3.4.2 Bestimmung der IL-13-Produktion durch unterschiedlich geprimte naive T-Zellen

Bei der Messung der IL-13-Konzentration zeigte sich, dass die T-Zellen, gegenteilig zum IFN- γ , signifikant mehr des Th2-Zytokins IL-13 produzierten, wenn die muren dendritischen Zellen in der Kokultur mit CCL18 stimuliert worden waren (s. Abbildung 11 u. 12)

Im autologen Ansatz stieg die IL-13-Produktion von $334,3 \pm 290,9$ pg/ml im Überstand der Ko-Kultur von naiven T-Zellen mit muren DC auf $424,1 \pm 315,1$ pg/ml nach Priming mit muren DC, die mit CCL18 stimuliert waren (s. Tabelle 5). Diese Differenz war mit $p=0,002$; $n=10$ statistisch signifikant. In gleicher Weise war der Unterschied im selben Vergleich in der allogenen Kultur mit $p=0,02$; $n=8$ statistisch signifikant; hier stieg die IL-13 Produktion von $527 \pm 296,8$ pg/ml (naive T-Zellen plus mDC) auf $677,3 \pm 269,7$ pg/ml (naive T-Zellen plus mDC mit CCL18) (s. Tabelle 5). Einen guten Überblick über die Entwicklung der IL-13-Produktion bei steigenden CCL18-Konzentrationen geben diese beiden Einzeldarstellungen:

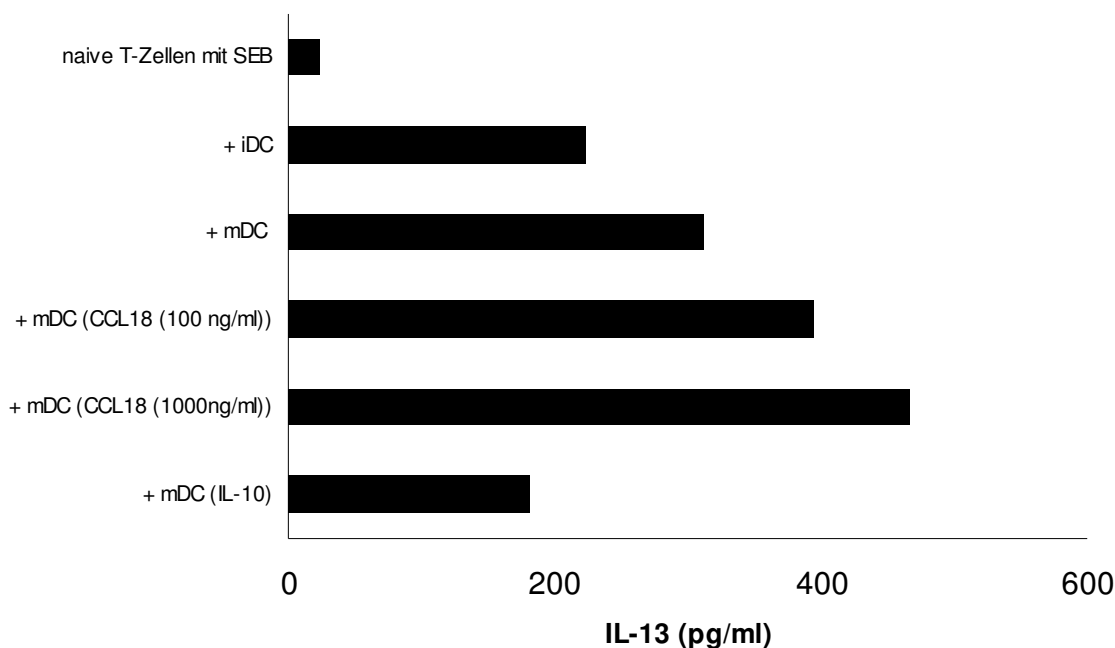


Abb.11: Einzeldarstellung eines charakteristischen Experiments bzgl. der IL-13-Produktion von naiven T-Zellen + SEB, die im autologen Ansatz mit dendritischen Zellen kokultiviert wurden. Die DC waren wie angegeben stimuliert worden bevor sie im Experiment eingesetzt wurden.

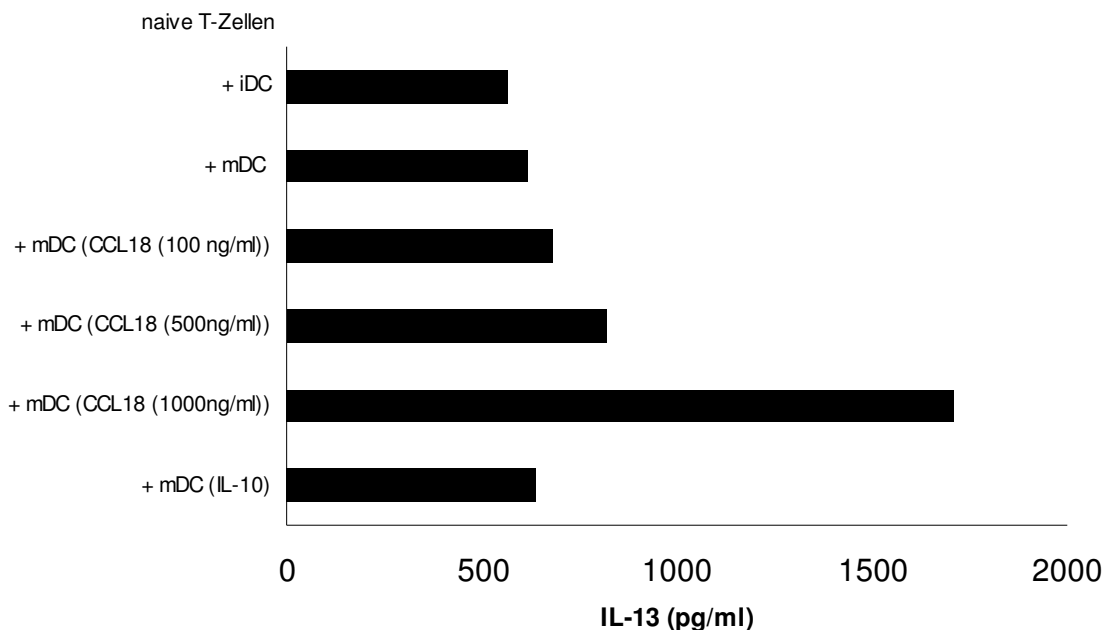


Abb.12: Einzeldarstellung eines charakteristischen Experiments bzgl. der IL-13-Produktion von naiven T-Zellen, die im allogenen Ansatz mit dendritischen Zellen kokultiviert wurden. Die DC waren wie angegeben stimuliert worden bevor sie im Experiment eingesetzt wurden.

Im Vergleich der Wirkung von immaturren dendritischen Zellen auf naive T-Zellen im Gegensatz zu immaturren dendritischen Zellen, die mit CCL18 stimuliert worden waren, wurde bezüglich der IL-13-Produktion kein signifikanter Unterschied deutlich (s. Tabelle 5):

Im autologen Ansatz veränderte sich die IL-13-Konzentration unter CCL18-Einfluss kaum (von $223,3 \pm 258,1$ pg/ml auf $237,4 \pm 333,1$ pg/ml; $p > 0,7$; $n=10$).

Ebenso zeigte die IL-13-Produktion der T-Zellen unter Einfluss der CCL18-stimulierten DC im allogenen Ansatz keine signifikanten Veränderungen (von $541,3 \pm 384,6$ pg/ml auf $495,8 \pm 339,8$ pg/ml, $p > 0,75$; $n=8$).

Einen statistisch signifikanten Unterschied konnten wir zwischen der IL-13-Produktion derjenigen T-Zellen, die durch immature DC und denen, die durch mature dendritische Zellen geprimt wurden im autologen Ansatz messen. Dort stieg die IL-13-Konzentration von $223,3 \pm 258,1$ pg/ml (iDC) signifikant auf $334,3 \pm 290,9$ (mDC); $p < 0,005$; $n=10$ (s. Tabelle 5).

Diese Tendenz ließ sich jedoch im allogenen Ansatz nicht nachvollziehen; hier zeigte sich keine signifikante Veränderung der IL-13-Konzentration (von $541,3 \pm 384,6$ pg/ml (iDC) auf $527 \pm 296,8$ pg/ml; $p > 0,8$; $n=8$ (s. Tabelle 5).

Ähnlich verschiedene Entwicklungen in der IL-13-Produktion im autologen und allogenen Ansatz ließen sich in Messungen mit IL-10-stimulierten maturen dendritischen Zellen feststellen. Während mature dendritische Zellen, die mit IL-10 stimuliert worden waren, im autologen Ansatz bei den naiven T-Zellen im Vergleich zu unstimulierten mDC eine signifikant verminderte IL-13-Produktion (von $334,3 \pm 290,9$ pg/ml (naive T-Zellen mit mDC) auf $248,6 \pm 199,1$ (naive T-Zellen mit mDC (IL-10)) bewirkten ($p < 0,02$; $n=10$), zeigte im allogenen Ansatz die IL-13-Konzentration im selben Vergleich keine signifikante Veränderung (von $527 \pm 296,8$ pg/ml (mDC) auf $611,8 \pm 440,2$ pg/ml (mDC (IL-10)), wobei $p > 0,9$; $n=8$ (s. Tabelle 5).

autolog	n=10	IL-13
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +SEB		$24 \pm 1,4$ pg/ml
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +iDC+SEB		$223,3 \pm 258,1$ pg/ml
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +iDC (CCL18)+SEB		$237,4 \pm 333,1$ pg/ml
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +mDC+SEB		$334,3 \pm 290,9$ pg/ml ^a
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +mDC (CCL18)+SEB		$424,1 \pm 315,1$ pg/ml ^b
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +mDC (IL-10)+SEB		$248,6 \pm 199,1$ pg/ml ^c
allogen	n=8	
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +iDC		$541,3 \pm 384,6$ pg/ml
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +iDC (CCL18)		$495,8 \pm 339,8$ pg/ml
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +mDC		$527 \pm 296,8$ pg/ml
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +mDC (CCL18)		$677,3 \pm 269,7$ pg/ml ^b
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ +mDC (IL-10)		$611,8 \pm 440,2$ pg/ml

Tab.5: IL-13-Produktion der naiven T-Zellen (CD4⁺CD45RA⁺), die durch verschieden stimulierte DC im autologen und allogenen Ansatz geprint wurden in pg/ml; Konzentration CCL18 = 100ng/ml. Signifikanzen: a: $p < 0,05$ zwischen CD4⁺CD45RA⁺+iDC (+SEB) und CD4⁺CD45RA⁺+mDC (+SEB); b: $p < 0,05$ zwischen CD4⁺CD45RA⁺+mDC (+SEB) und CD4⁺CD45RA⁺+mDC (CCL18) (+SEB); c: $p < 0,05$ zwischen CD4⁺CD45RA⁺+mDC (+SEB) und CD4⁺CD45RA⁺+mDC (IL-10) (+SEB)

3.4.3 Bestimmung der IL-4-Produktion durch unterschiedlich geprimte naive T-Zellen

Ein ähnlicher steigernder Effekt wie bei der IL-13-Produktion zeigte sich auch bei der Bestimmung der IL-4-Produktion von T-Zellen die mit CCL18-stimulierten mDC (mDC(CCL18)) stimuliert wurden. Hier bewirkte die Stimulation der DCs mit CCL18 einen deutlichen Anstieg der Produktion des Th2-Zytokins durch die T-Zellen, die mit diesen DC kokultiviert wurden (s. Abbildung 13).

Die Konzentration von IL-4 stieg von $143,4 \pm 149,7$ pg/ml (naive T-Zellen mit mDC) auf $229,4 \pm 134$ pg/ml (naive T-Zellen mit CCL18 stimulierten mDC (mDC(CCL18))), dabei war jedoch $p=0,065$; $n=8$ und somit gerade eben nicht kleiner als 0,05, womit keine Signifikanz vorliegt (s. Tabelle 6).

Dennoch wird in der folgenden charakteristischen Einzeldarstellung klar der steigernde Einfluss von CCL18 auf die IL-4-Produktion durch die T-Zellen sichtbar.

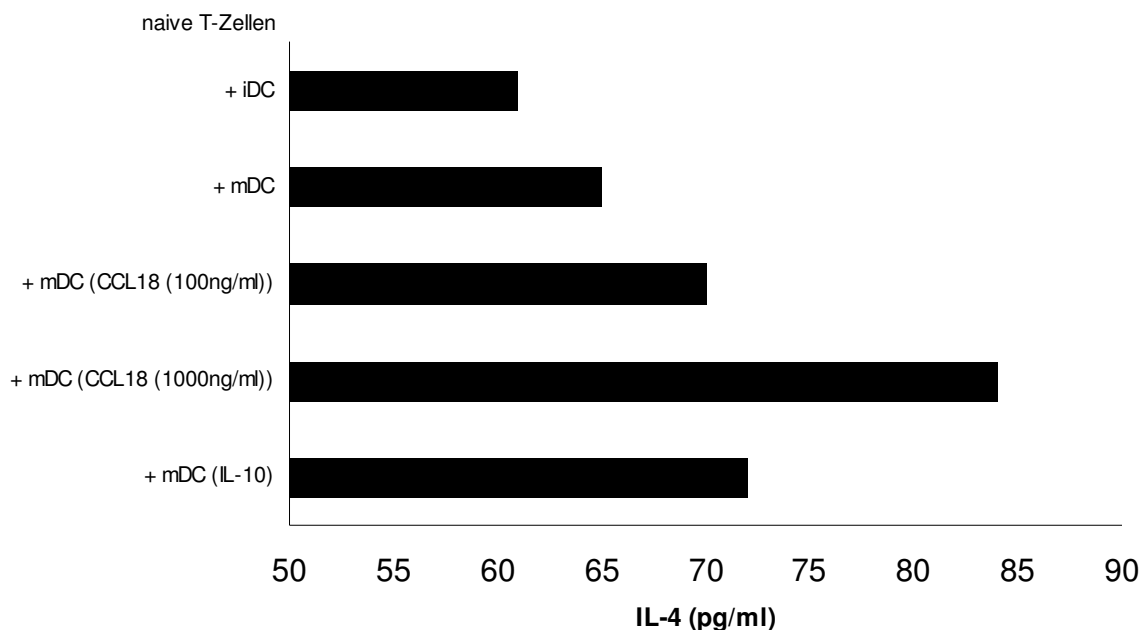


Abb.12: Einzeldarstellung eines charakteristischen Experiments bzgl. der IL-4-Produktion von naiven T-Zellen, die im allogenen Ansatz mit dendritischen Zellen kokultiviert wurden. Die DC waren wie angegeben stimuliert worden bevor sie im Experiment eingesetzt wurden.

Weiterhin konnten wir eine Zunahme der IL-4-Produktion der T-Zellen messen, wenn sie statt durch mature durch immature dendritische Zellen geprimt wurden. Dabei stieg der IL-4-Wert von $133,6 \pm 218,9$ pg/ml (naive T-Zellen mit iDC) auf $143,4 \pm 149,7$ pg/ml (naive T-Zellen mit mDC); mit $p=0,2$; $n=8$ war der Zuwachs jedoch nicht signifikant.

Die Stimulation der maturen dendritischen Zellen mit IL-10 brachte keine messbare Veränderung in der IL-4-Produktion der T-Zellen, mit $143,4 \pm 149,7$ pg/ml (naive T-Zellen mit mDC) und 144 ± 192 pg/ml (naive T-Zellen mit mDC (IL-10)) waren die Werte nahezu gleich (s. Tabelle 6).

allogen	n=8	IL-4
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ + iDC		$133,6 \pm 218,9$ pg/ml
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ + mDC		$143,4 \pm 149,7$ pg/ml
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ + mDC (CCL18)		$229,4 \pm 134$ pg/ml ^b
CD4 ⁺ CD45RA ⁺ + mDC (IL-10)		144 ± 192 pg/ml

Tab.6: IL-4-Produktion der naiven T-Zellen (CD4⁺CD45RA⁺), die durch verschieden stimulierte DC im allogenen Ansatz geprimt wurden in pg/ml; Konzentration CCL18 = 100ng/ml. b: $p=0,065$ zwischen CD4⁺CD45RA⁺ + mDC und CD4⁺CD45RA⁺ + mDC (CCL18)

3.4.4 Bestimmung der IL-10-Produktion durch unterschiedlich geprimte naive T-Zellen

Wegen der sehr geringen Mengen an produziertem IL-10, die zudem teilweise unterhalb der Detektionsgrenze des ELISA-Systems lagen, wurde die IL-10-Produktion nicht weiter untersucht. Zudem war der Versuchsaufbau ungeeignet, um die Generierung regulatorischer T-Zellen zu erfassen. Hierzu wäre die Restimulierung der geprimten T-Zellen mit CCL18-stimulierten DC notwendig gewesen.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass statistisch signifikante Unterschiede in der Produktion aller gemessener Zytokine auftraten, wenn die maturen dendritischen Zellen vor der Kokultur mit naiven T-Zellen mit CCL18 stimuliert wurden. Dabei hatte CCL18 eine sichtbar hemmende Wirkung auf die IFN- γ Produktion durch die naiven T-Zellen, dagegen einen eindeutig fördernden Effekt auf die Produktion von IL-13 und IL-4.

4 DISKUSSION

In dieser Arbeit wurden die antigenpräsentierenden Eigenschaften von dendritischen Zellen, die mit dem Chemokin CCL18 oder mit IL-10 stimuliert worden waren, untersucht. Dabei wurden zunächst die Oberflächenmarker der Dendritischen Zellen gemessen, dann die Proliferationsinduktion bei naiven T-Zellen bestimmt und schließlich eine eventuelle Polarisation im Th1/Th2-Modell durch die dendritischen Zellen mittels Zytokinmessung im ELISA untersucht. Außerdem wurde die Konzentration von CCL18 in Überständen von dendritischen Zellen von Atopikern und Normalpersonen mittels ELISA gemessen.

4.1 Untersuchung der CCL18-Produktion durch dendritische Zellen von Atopikern und Normalpersonen

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen aus Blutmonozyten von Atopikern signifikant mehr CCL18 produzieren als DC von Normalpersonen.

Unsere Resultate untermauern die bereits zahlreichen Hinweise, dass CCL18 eine wichtige Rolle bei allergischen Reaktionen spielen könnte: Vor kurzem erschienen zwei Arbeiten, die eindrucksvoll belegen, dass CCL18 bei dem allergischen Krankheitsbild der atopischen Dermatitis möglicherweise eine pathogenetische Bedeutung zukommt. So konnte nur in der Haut von Patienten mit atopischer Dermatitis CCL18 produzierende Zellen nachgewiesen werden, jedoch nicht in der gesunden Haut von Normalpersonen (107). Auch zeigte eine weitere kürzlich erschienene Arbeit, dass die Serumspiegel für CCL18 bei diesen Patienten im Vergleich zu Normalpersonen deutlich erhöht sind. Dagegen zeigte sich keine CCL18-Erhöhung in Proben der Haut von Psoriasispatienten, einer durch eine Th1-Immunantwort gekennzeichnete Erkrankung (45). Im direkten Vergleich zeigen DNA-Mikroarray-Daten ein doppelt so hohes CCL18-Level in Hautläsionen von Patienten mit atopischer Dermatitis wie bei Psoriasis-Patienten (99). Bei Affen mit allergischem Asthma wurde nach Allergenstimulation im Lungengewebe neben Genen für Eotaxin, MCP-1 und -3 auch Gene für CCL18 induziert (147). In der Bindehaut von Patienten mit allergischer Konjunktivitis war die Zahl CCL18-positiver Zellen höher als in der Bindehaut von Normalpersonen und sogar auch höher als die Zahl derjenigen Zellen, die das Th2-assoziierte Chemokin CCL22 exprimierten (33). Gegen eine pro-allergische Rolle von CCL18 spricht, wie Nibbs et al.

berichten, dass Met-Ck β 7, eine modifizierte Form von CCL18, den Rezeptor CCR3, der sich auf Eosinophilen befindet, antagonisiert (98). Allerdings spricht die Tatsache, dass CCL18 von Eosinophilen produziert wird und der dadurch erreichte chemotaktische Effekt auf Monozyten und Lymphozyten (122) wiederum für eine Beteiligung an einem allergischen Geschehen. Dabei wird CCL18 jedoch von Eosinophilen in geringeren Mengen sezerniert als von dendritischen Zellen und Makrophagen (123).

Insgesamt weisen dendritische Zellen von Atopikern Unterschiede zu DC von Normalpersonen auf. Beispielsweise produzieren sie auf die Stimulation mit LPS und CD40L vermehrt IL-10 und weniger IL-12 als DC von Normalpersonen (2;113). Eine vermehrte IL-10-Produktion wurde außerdem auch bereits für Monozyten (2) und für T-Helfer-Zellen (3) von Atopikern festgestellt. Alveolarmakrophagen aus Bronchiallavagen von Patienten mit allergischem Asthma bronchiale produzieren mehr IL-10 als Alveolarmakrophagen von Gesunden (83). Ähnlich verhalten sich aus Blutmonozyten von Patienten mit allergischem Asthma bronchiale generierte dendritische Zellen: Im Vergleich zur Kontrollgruppe produzieren sie vermehrt IL-10 und daneben auch PGE₂ (78). Da die CCL18 Produktion von DC durch IL-10 induziert wird (138;141), könnte die erhöhte IL-10-Produktion bei Atopikern mit für die vermehrte CCL18-Produktion durch dendritische Zellen verantwortlich sein.

Monozyten von Atopikern weisen auch eine vermehrte Expression des Oberflächenmarkers CD23 auf (139), ein IgE-Rezeptor, dessen Aktivierung bei Makrophagen zu einer erhöhten IL-10-Produktion führt (32). So ist es denkbar, dass der bei Atopikern erhöhte IgE-Spiegel einen Einfluss auf die unterschiedliche Zytokinexpression von dendritischen Zellen von Atopikern und Normalpersonen besitzt. Bei allergischen Erkrankungen spielt neben dem IgE-Spiegel auch wahrscheinlich die im Gegensatz zu Normalpersonen veränderte Konzentration von Histamin und spezifischen Zytokinen und Chemokinen in der Umgebung eine Rolle beim Priming der dendritischen Zellen. Beispielsweise führt Histamin bei DC zu einer verminderten IL-12-Produktion (15). Das veränderte Microenvironment könnte auch einen Einfluss auf die veränderte CCL18-Produktion durch Atopiker-DC besitzen. Bei Monozyten kann eine vermehrte CCL18 Produktion durch IL-4, jedoch nicht durch IFN- γ verursacht werden (124). Bei Makrophagen wurde gezeigt, dass eine vermehrte CCL18-Produktion durch Stimulation mit den Th2-Zytokinen IL-4, IL-10 und IL-13 ausgelöst werden kann. Dies wurde in der selben Arbeit auch für dendritische Zellen gezeigt (67).

Schließlich zeigt sich ein Unterschied zwischen DC von Allergikern und Normalpersonen auch darin, dass dendritische Zellen von Allergikern spezifisch auf das betreffende Allergen reagieren: Am Beispiel vom Hausstaubmilbenallergen Der p1 zeigten Hammad et al. (46), dass

das Allergen auf DC von Allergikern so wirkt, dass diese CD86 hochregulieren und eine Th2-Immunantwort induzieren, im Gegensatz zu Normalpersonen bei denen die Stimulation von DC mittels Der p1 eher die Th1-Immunantwort förderte.

4.2 Ergebnisse der Durchflusszytometrie

Unsere Messungen zeigen, dass mit CCL18 stimulierte dendritische Zellen eine signifikant höhere Dichte des MHC-II-Moleküls HLA-DR auf ihrer Oberfläche aufweisen als unstimulierte dendritische Zellen. Dies konnten wir sowohl bei immaturen als auch bei maturen dendritischen Zellen beobachten, allerdings war die HLA-DR-Dichte nur bei den gleichzeitig mit LPS stimulierten dendritischen Zellen statistisch signifikant höher. Neben diesen genannten Effekt ergab sich jedoch kein Hinweis auf eine weitere Modulation der getesteten Oberflächenmarker. Weder die Expression der als kostimulatorische Moleküle bekannten CD86, CD80, CD40 oder CD11c veränderte sich, noch ergab sich eine Modulation des Makrophagenmarkers CD16 bzw. des Markers für dendritische Zellen CD1a. HLA-DR dient dendritischen Zellen dazu, T-Helferzellen aufgenommene Antigene an der Zelloberfläche zu präsentieren. MHC-II-Moleküle sind auch auf immaturen dendritischen Zellen zu finden, jedoch nimmt bei der Reifung (nach Aufnahme des Antigens) der Transport von MHC-II-Molekülen an die Zelloberfläche deutlich zu, so dass eine höhere MHC-II-Dichte an der Oberfläche ein Kennzeichen der maturierten dendritischen Zelle darstellt (90). Jedoch ließen sich bei Messung der anderen Oberflächenmarker auf den dendritischen Zellen keine signifikanten Veränderungen nach CCL18-Stimulation feststellen. CD83 gilt als Marker für mature dendritische Zellen (144). Wenn nun die Stimulation dendritischer Zellen mit CCL18 zu einer Maturierung führt, hätte sich der Anteil an CD83⁺Zellen erwartungsgemäß nach Stimulation mit CCL18 erhöhen müssen.

Die gleichzeitige Stimulation/ Maturierung der iDC mit LPS unter Zugabe von IL-10 führte hingegen zu einer verminderten Expression von CD83, HLA-DR, CD86 und CD11c, bei gleichzeitig vermehrter Expression des Makrophagenmarkers CD16. In Übereinstimmung mit der Literatur führte IL-10 somit zu einer Hemmung der Maturierung von DCs durch LPS-Stimulation. Dort wird beschrieben, dass IL-10-stimulierte dendritische Zellen insgesamt weniger Maturierungszeichen aufweisen und eher die Phagozytosefähigkeit des immaturen Stadiums beibehalten (5;13;24;92). CCL18 hat diese Wirkung einer Hemmung der Maturierung eindeutig nicht.

Ein Problem des Versuchsaufbaues zeigte sich erst bei der genaueren Analyse der Daten. So betrug der Anteil an CD83⁺ Zellen bei den immaturen dendritischen Zellen bereits $42,2 \pm$

27,7%, so dass wir davon ausgehen müssen, dass ein Teil der iDC bereits zu mDC ausgereift war. Jedoch stieg dieser Wert bei den mit LPS stimulierten dendritischen Zellen (mDC) noch signifikant auf $72,7 \pm 21,9\%$, so dass man zumindest davon ausgehen kann, dass sich die von uns verwendeten dendritischen Zellen weiter maturieren ließen und die mDC in der Tat matur waren. Dafür spricht auch, dass alle von uns gemessenen Oberflächenmarker, die bei maturierten dendritischen Zellen vermehrt exprimiert werden -CD86, CD80, CD40 und CD11c- bei unseren maturen dendritischen Zellen im Gegensatz zu den immaturen erhöht waren, wenn auch nicht signifikant. Hauptauschlaggebend für das spontane Einsetzen eines Reifungsprozesses auch bei den nicht mit LPS stimulierten Zellen dürfte die fortgesetzte Stimulation mit GM-CSF/IL-4 während des Maturierungsprozesses ab Tag 5 sein (119).

Zusammenfassend lässt sich zeigen, dass CCL18 im Gegensatz zu IL-10 keine hemmende Wirkung auf die Maturierung von dendritischen Zellen verursacht. Inwieweit es die Maturierung sogar eher fördert konnte in dieser Arbeit nicht abschließend beurteilt werden. Weitere vorläufige Ergebnisse legten zudem dem Schluß nah, dass eventuell auch die Menge des verwendeten CCL18 (100ng/ml/Mio Zellen) nicht ausreichend war, um bei den ohnehin bereits teilweise maturierten immaturen dendritischen Zellen eine signifikante Erhöhung der Oberflächenmarker CD83, CD86, CD80 und CD40 zu bewirken. Einige Versuchsreihen unserer Arbeitsgruppe mit verschiedenen CCL18-Konzentrationen weisen in diese Richtung. Alternativ wäre auch zu überlegen, ob CCL18 eine Substanz wäre, die ähnlich wie PGE₂ nur im Zusammenspiel mit TNF- α und IL-1 die Maturierung induzieren kann (59). Eine andere Möglichkeit bestünde darin, dass CCL18 tatsächlich eine isolierte HLA-DR-Hochregulation bei dendritischen Zellen verursacht und damit nur teilweise eine Maturierung auslöst. Muraille et al. untersuchten den Einfluss von T-Zell-Mitogenen auf die Maturierung von dendritischen Zellen. Dabei wurden MHC-II, und CD40 hochreguliert, CD86, CD80 und CD28 wurden dagegen wenig exprimiert (97). In der Arbeit von Traidl-Hoffman et al. zeigte sich, dass mit Pollenextrakten stimulierte dendritische Zellen vermehrt HLA-DR exprimieren, die anderen Maturierungsmarker dagegen unverändert bleiben. Die so stimulierten DCs induzieren eine Th2-Antwort (136). Auch Histamin, das ebenfalls eine Th2-Antwort induziert, führt zu einer isolierten Hochregulation des Maturierungsmarkers, hier CD86 (16). In der Arbeit von Hsu et al. bewirkte die Stimulation dendritischer Zellen mit dem Antikörper DcR3.Fc, ein löslicher Rezeptor, der zur Familie der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren gehört, neben einer Th2-Antwort und verminderten Proliferation eine Hochregulation von CD86 und einer Herunterregulation von CD40, CD80, und HLA-DR (53). Lösliches ATP verursacht bei dendritischen Zellen eine inkomplette Maturierung; die DC exprimieren dann vermehrt CD83

und CD86, MHC-II-Moleküle bleiben jedoch unverändert. Die IL-12-Produktion durch diese DC wird gehemmt (70). Die Interpretation dieser Daten wird jedoch dadurch erschwert, dass eigene Ergebnisse zeigen, dass die Marker CD83, HLA-DR, CD86 zu unterschiedlichen Zeitpunkten des Maturierungsprozesses hochreguliert werden. So lässt sich eine Steigerung von HLA-DR schon sehr früh beobachten, während CD86 und CD83 erst später exprimiert werden. Wie bereits diskutiert, hat zudem der Versuchsaufbau einen entscheidenden Einfluss auf die Expression dieser Marker und ist bei den zitierten Arbeiten sehr unterschiedlich gewählt.

In diesem Zusammenhang sind auch die widersprüchlichen Ergebnisse zur autokrinen CCL18 Produktion von immaturren bzw. maturated DCs interessant. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen dass die LPS-Stimulation von Makrophagen zu einer deutlichen Inhibition der CCL18 Produktion führt. Ein vergleichbares Ergebnis berichten Vulcano et al., die zeigen konnten dass LPS stimulierte DC vermindert CCL18 produzieren (141). Die Autoren schlussfolgern, dass mature DC weniger CCL18 produzieren als immature DC. Dagegen kommen de Vries et al. zu dem Ergebnis, dass mature dendritische Zellen deutlich mehr CCL18-mRNA exprimieren als immature DC (27). Hier wurde jedoch statt mit LPS mit TNF- α und PGE₂ eine Maturierung induziert. Somit scheinen auch die zur Maturierung gewählten Stimuli einen Einfluß auf die autokrine CCL18 Produktion auszuüben.

4.3 T-Zell-Proliferation

Bei unseren Messungen stellte sich heraus, dass dendritische Zellen, die mit CCL18 stimuliert worden waren, sowohl im allogenen Ansatz als auch im autologen Ansatz mit SEB eine verminderte T-Zell-Proliferationsantwort bewirken. Zusätzlich ergaben die Messungen einen vergleichbaren Einfluss durch das Zytokin IL-10, der aber insgesamt nicht so eindeutig war wie bei CCL18. Insgesamt wurde der hemmende Effekt in den Ansätzen mit maturated dendritischen Zellen klarer ersichtlich als in den Versuchen mit immaturren dendritischen Zellen. Auch zeigten die Messungen in den autologen Ansätzen eine deutlichere Reaktion als in der mixed lymphocyte reaction (allogen).

Die Aktivierung von naiven T-Zellen durch dendritische Zellen und die konsekutive T-Zell-Proliferation kann nicht isoliert von der Maturierung der dendritischen Zellen diskutiert werden. Voraussetzung für eine Aktivierung ist, dass zum einen das MHC-II-Molekül der DC an den CD4-Rezeptor der T-Zelle bindet, zusätzlich muss aber auch ein kostimulatorisches Molekül, also CD86 oder CD80 an CD28 auf der T-Zelle binden, damit die T-Zelle sich

klonal vermehrt (18). In unseren Experimenten bewirkte die Stimulation der dendritischen Zellen mit CCL18 eine vermehrte HLA-DR-Expression, während sich die anderen Maturierungsmarker nicht veränderten. Eventuell steht - abgesehen von den oben diskutierten technischen Schwierigkeiten in der Generierung von immaturren dendritischen Zellen - eine unvollständige Maturierung der DC unter Einfluss von CCL18 mit der verminderten Proliferationsinduktion in einem Zusammenhang. Auch führt eine Maturierung von dendritischen Zellen nicht unbedingt zu einer Proliferationsinduktion: DC, die mit Überständen von Tumorzellen stimuliert wurden, zeigen eine rasche Hochregulation der Marker CD80, CD86 und HLA-DR. Dieser Maturierungsprozess ist jedoch gestört, was sich darin äußert, dass diese dendritischen Zellen keine IL-12-Produktion nach Stimulation mit CD40L zeigen, die Fähigkeit verlieren, T-Zellen zu aktivieren und bald nach der Stimulation in Apoptose gehen. Diejenigen DC, die an Tag 7 der Stimulation noch lebensfähig sind, zeigen eine verminderte Proliferationsinduktion und produzieren kein IL-12, dagegen vermehrt PGE₂, das für seine Th2-Induktion bekannt ist (65). Arbeiten, die sich mit der Rolle von dendritischen Zellen bei Immuntoleranzmechanismen beschäftigen, zeigen, dass sich naive T-Zellen, wenn sie allein durch ein MHC-II-Molekül ohne Kostimulation durch CD86 oder CD80 aktiviert werden, in Apoptose gehen oder sich in regulatorische T-Zellen umwandeln (93).

Die dargestellten Ergebnisse von CCL18 als Proliferationshemmendes Agens gliedern sich gut in die unten noch diskutierten Beobachtungen der Th2-Induktion durch CCL18-stimulierte dendritische Zellen ein. Charakteristisch für Th1-Immunreaktionen sind gesteigerte T-Zell-Proliferationen: Stimuli wie LPS, TNF- α oder IFN- γ sorgen bei DC für eine Reifung und IL-12-Sekretion; bei Kokultur-Experimenten führen diese DC zu einer deutlichen T-Zell-Vermehrung (82;126). Renkl und Mitarbeiter untersuchten die Wirkung von Osteopontin auf dendritische Zellen und konnten eine deutliche Th1-Induktion und gesteigerte Proliferationsinduktion feststellen (114) Beispielhaft für Chemokine ist die Arbeit von Marsland et al. zu nennen: Sie zeigten, dass die Chemokine CCL19 und CCL21 auf dendritische Zellen so wirken, dass sie sowohl eine Th1-Antwort induzieren als auch eine deutlich vermehrte T-Zell-Proliferation verursachen(87). Hsu et al. fanden in der oben bereits erwähnten Arbeit heraus, dass die Stimulation von DC mit dem Antikörper DcR3.Fc bei der mixed lymphocyte reaction die T-Zell-Proliferation unterdrückt und die IL-4-Sekretion hochreguliert. Die Autoren konnten somit eine Th2-Induktion zeigen (53). Bei der Stimulation von dendritischen Zellen mit Choleratoxin, das für seine Th2-fördernden Eigenschaften bekannt ist, stellten Lavelle et al. auch proliferationshemmende Effekte fest

(72). In vor kurzem publizierten Experimenten mit dem Humanen Herpesvirus 6 (HHV-6) stellten Smith et al. fest, dass es bei dendritischen Zellen eine starke Herunterregulation von Maturierungsmarkern verursachte, welche mit einer Th2-Induktion und verminderten allostimulatorischen Fähigkeiten bei naiven T-Zellen einherging (125). Ähnliche Beobachtungen wurden mit Poxviren gemacht (34). Zu der Wirkung der Th2-assoziierten Chemokine CCL17 und CCL22 auf die Proliferation von T-Zellen sind bisher keine Ergebnisse veröffentlicht worden. Einen weiteren Hinweis auf einen eventuellen Zusammenhang zwischen niedriger Proliferationsinduktion durch dendritische Zellen und einer Th2- Antwort gibt die Arbeit von Tanaka und Mitarbeitern. Dort zeigten Versuche mit verschiedenen DC/T-Zell-Verhältnissen (1:4 bzw. 1:300), dass ein niedriges Verhältnis, das heißt, weniger dendritische Zellen stehen zur T-Zell-Proliferationsinduktion zur Verfügung, eine Th2-Antwort verursacht (133).

Besonders hervorzuheben ist die suppressive Rolle von IL-10 bei der T-Zell-Proliferation, die auch in unseren Proliferationsmessungen deutlich festgestellt wurde und die zu unseren Ergebnissen der FACS-Messungen, in denen wir eine signifikante Abnahme der CD86-Expression durch DC nach IL-10-Stimulation feststellten. Bellinghausen et al. zeigten, dass mit IL-10 stimulierte dendritische Zellen sowohl eine verminderte Expression von kostimulatorischen und MHC-II-Molekülen aufweisen, als auch eine reduzierte T-Zell-Proliferation (9). Auch Faulkner et al. beobachteten eine fehlende Maturierung und herabgesetzte Proliferationsinduktion durch IL-10-stimulierte dendritische Zellen (35). Liu et al. gelang es, die Genexpression von IL-10 in dendritischen Zellen mittels small interference RNA (siRNA) zu blockieren. Die so behandelten dendritischen Zellen exprimierten vermehrt CD40 und produzierten höhere Mengen an IL-12; die T-Zell-Proliferation stieg deutlich an. Bei weiteren Untersuchungen stellte sich heraus, dass die IL-10-Blockade der DC bei den aktivierten T-Zellen in einer erhöhten IFN- γ - und verminderten IL-4-Sekretion resultierte, also einem Th1-Commitment entspricht (75). IL-10 konnte in Versuchen, in denen T-Zellen zunächst durch dendritische Zellen zur Proliferation und IFN- γ -Sekretion angeregt wurden, die DC-gesteuerte IFN- γ -Produktion und Proliferation der T-Zellen hemmen (81). Einen immunsupprimierenden Effekt von IL-6 entdeckten Hedge et al. mit der Beobachtung, dass IL-6 bei dendritischen Zellen zu einer verminderten Induktion der T-Zell-Proliferation, neben einer verminderten Sekretion von TNF- α und IP-10, welches chemotaktisch auf Th1-Zellen wirkt, führt. Zu der beschriebenen Wirkung von IL-6 schien IL-10 interessanterweise einen entscheidenden Beitrag zu leisten (51). Insgesamt scheint nach unseren Messungen das Chemokin CCL18 in Bezug auf die T-Zell-Proliferation einen ähnlichen Effekt auf

dendritische Zellen zu haben wie IL-10, dem immunsupprimierende aber auch besonders Th1-unterdrückende Eigenschaften zugeschrieben werden. Wie bereits zitiert, induziert IL-10 bei dendritischen Zellen die Produktion von CCL18 (138;141). Inwieweit der Th2-fördernde Effekt von IL-10 jedoch auf die vermehrte CCL18 Produktion zurück zu führen ist, konnte in dieser Arbeit nicht abschließend analysiert werden.

4.4 Th2-Induktion

Dendritische Zellen, die eine Th1-Antwort induzieren, werden DC1 genannt. Sie zeichnen sich durch eine vermehrte IL-12-Produktion aus. Kennzeichnend für Th1-Lymphozyten ist die vermehrte IFN- γ -Sekretion. Th1-assoziiert sind außerdem die Chemokine CXCL9, 10 und 11 (Mig, IP-10 und I-TAC), und CCL5 (RANTES), weil sie an Rezeptoren auf Th1-Zellen binden (40). Von dendritischen Zellen, die die Th2-Immunantwort fördern (DC2), berichten viele Autoren, dass diese Zellen kein oder wenig IL-12, dafür jedoch größere Mengen IL-10 bilden (94). Neben genannten Zytokinen produzieren diese dendritischen Zellen auch Chemokine, die besonders Th2-Zellen rekrutieren. Zu den hochaffinen Liganden für CCR4-Rezeptoren, die sich vermehrt auf Th2-Zellen befinden (85) und somit DC2/ Th2-assoziierten Chemokinen zählen CCL17 (TARC) (54) und CCL22 (MDC) (55). Th2-Zellen sind dadurch charakterisiert, dass sie vermehrt die Zytokine IL-4, IL-5 und IL-13 ausschütten und eine verminderte IFN- γ -Produktion aufweisen (116).

In dieser Arbeit konnten wir erstmals zeigen, dass dendritische Zellen, die mit CCL18 für 12 Stunden stimuliert und anschließend mit naiven T-Zellen ko-kultiviert wurden, T-Zellen so primen, dass sie eine vermehrte Produktion von IL-4 und IL-13 bei gleichzeitig verminderter IFN- γ -Produktion zeigen. Dieses Ergebnis ließ sich sowohl für den allogenen Versuchsansatz mit Hilfe einer mixed-lymphocyte reaction zeigen als auch im autologen Experiment, bei dem die Zellen zudem mit dem Superantigen Staphylokokkus enterotoxin B (SEB) stimuliert wurden. Daraus lässt sich folgern, dass die Stimulation von dendritischen Zellen mit CCL18 eine Th2- Immunantwort fördert und somit zur Entstehung von DC2 führt. Bisher ist die Wirkung von CCL18 auf die Th-Zell-Polarisierung durch DC noch nicht beschrieben worden. Goerdt et al. konnten jedoch zeigen, dass alternativ aktivierte Makrophagen, die CCL18 in hohem Maße produzieren, die Th2-Immunantwort fördern (39). Die Wirkung von CCL18 auf die Funktion der antigenpräsentierenden Zellen wurde jedoch erstmals in dieser Arbeit untersucht.

Eine Verschiebung der T-Zellantwort in Richtung Th2 durch dendritische Zellen wurde für verschiedene Stimuli berichtet. Hierbei handelt es sich, wie auch in unserer Arbeit beschrieben, um Stimuli, die die dendritischen Zellen selbst so beeinflussen, dass sie durch ihre Zytokinproduktion und / oder Oberflächenexpression die naiven T-Zellen so aktivieren, dass sie Th2-Zytokine produzieren. Prinzipiell wurden ganz verschiedenartige Stimuli beschrieben, die die Th2-Immunantwort fördern. Neben dem Zytokin IL-10 wurde diese Wirkung für das hauptsächlich von Basophilen und Eosinophilen Granulozyten produzierte Histamin (15), aber auch für bakterielle Produkte wie das Choleratoxin (37) beschrieben. Kalinski et al. stimulierten immature DC mit dem Entzündungsmediator PGE₂ und stellten fest, dass die so stimulierten DC die Fähigkeit verloren, IL-12 zu produzieren und vermehrt eine Th2-Antwort induzierten (60). Kuroda und Mitarbeiter fanden heraus, dass dendritische Zellen aus der Milz, die mit PGE₂ stimuliert wurden, die Produktion von MDC (CCL22), erhöhen und weniger IP-10 (CXCL10) produzieren (69).

Alles in allem belegen die Ergebnisse dieser Arbeit auch, dass bestimmten Chemokinen neben ihrer rein chemotaktischen Funktion noch weitere Zytokin-ähnliche Funktionen zukommen. Dies passt gut zu den Ergebnissen einiger Arbeiten, die ebenfalls Zytokin-ähnliche Wirkungen von Chemokinen festgestellt haben. So testeten Braun et al. die Wirkung von Chemokinen auf die IL-12-Produktion von Monozyten und dendritischen Zellen. Sie fanden heraus, dass CCL2 (MCP-1) bei Monozyten die Produktion von IL-12p70 hemmt. Jedoch zeigten diese Chemokine keinen Einfluss auf die IL-12-Produktion bei dendritischen Zellen (12). Einen fördernden Effekt auf die IL-12-Produktion durch dendritische Zellen stellten jedoch Aliberti et al. fest, die DC mit CCL4 (MIP1 β) und CCL5 (RANTES) stimuliert hatten (4). Omata et al. generierten dendritische Zellen aus Blutmonozyten in Anwesenheit von CCL2. Diese DC produzierten nach CD40L-Stimulation eindeutig weniger IL-12 als allein durch GM-CSF und IL-4 generierte DC. Naive T-Zellen, die mit diesen CCL2-DC in Kokultur gebracht wurden, sezernierten wesentlich weniger IFN- γ als in der Kontrollkultur (103). Bereits in früheren Arbeiten wurde gezeigt, dass Chemokine bei aktivierten T-Zellen die IL-4-Produktion modulieren können: So führte die Gabe von CCL2 zu einer vermehrten, die Gabe von CCL3 zu einer verminderten IL-4-Produktion durch Th-Zellen. (79). Byrnes et al. beobachteten, dass mit CCL19 (MIP3 β) stimulierte Blutmonozyten eine deutliche Steigerung der IL-10-Produktion aufwiesen, was wiederum mit einer verminderten IL-12-Produktion korrelierte (14).

Insgesamt ist zu schlussfolgern, dass neben der IL-10 und IL-12 Produktion somit auch die Chemokinproduktion der dendritischen Zellen Einfluss auf das T-Zell-Commitment hat.

Aufgrund des Versuchsaufbaus der Arbeit kann dies möglicherweise nicht nur an der chemotaktischen Wirkung der genannten Chemokine liegen, da ja ein geschlossenes System (Kulturplatte) verwendet wurde. CCL18 gilt neben CCL17 und CCL22 als ein Chemokin, welches die alternative Aktivierung von Makrophagen anzeigt, die wiederum ebenfalls die Th2-Immunantwort fördern. Unsere Ergebnisse sind somit sehr gut vereinbar mit den bereits vorhandenen Daten zu CCL17 und CCL22 und lassen vermuten, dass CCL18 neben CCL17 und CCL22 eine Rolle bei der allergischen Entzündung zukommt.

Es stellt sich die Frage, wie man sich die Stimulation der dendritischen Zellen mit CCL18 *in vivo* vorstellen könnte. Einerseits produzieren dendritische Zellen selbst CCL18, so dass eine autokrine Wirkung unterstellt werden kann. Wie beschrieben, gibt es mehrere Substanzen (IL-10, Histamin) die bekanntermaßen bei Allergikern vermehrt produziert werden und zu einer vermehrten CCL18 Produktion durch DC von Allergikern führen könnten. Auch potenzielle Allergene können durch ihre direkte Wirkung auf dendritische Zellen eine Th2-Antwort induzieren, wie die Arbeit von Traidl-Hoffmann et al. anhand von Birkenpollenextrakten demonstriert (136). Die bereits zitierte Arbeitsgruppe von Hammad et al, die dendritische Zellen von Allergikern mit Der p1 stimulierte, zeigte interessanterweise, dass die so generierten Th2-induzierenden DC vermehrt CCL17 (TARC) und CCL22 (MDC) und kaum IP-10 produzierten, im Gegensatz zu nicht-allergischen Normalpersonen, deren DC auf Der p1 vor allem das Th1-assoziierte Chemokin IP-10 produzierten (47). Es ist bekannt, dass Der p1 und andere Allergene unter anderem ihre Wirkung über den Mannose-Rezeptor entfalten (30); auf diesem Weg können sie eine vermehrte Produktion der bekannten DC2-assoziierten Chemokine CCL17 und CCL22 bewirken (23). Da der Mannoserezeptor als Marker für alternativ aktivierte Makrophagen gilt, für die eine vermehrte CCL18-Produktion kennzeichnend ist (11;67;128), führt möglicherweise die Aktivierung des Mannoserezeptors auch zur vermehrten CCL18-Produktion. Es lässt sich somit vermuten, dass Der p1 und andere Allergene über die Aktivierung des Mannoserezeptors auch zu einer vermehrten CCL18-Produktion von dendritischen Zellen beitragen könnten.

Neben einer autokrinen Produktion von CCL18 ist jedoch auch eine exokrine Wirkungsweise denkbar. So ist, nach unseren eigenen Vorarbeiten, die CCL18-Produktion durch Makrophagen deutlich höher als die von dendritischen Zellen. Da sich im Gewebe (Haut/Lunge) Makrophagen in der Umgebung von DC befinden, könnten dendritische Zellen auch durch das von Gewebemakrophagen produzierte CCL18 stimuliert werden. Die CCL18-Produktion durch Makrophagen wird ebenfalls durch die Th2-Zytokine IL-4, IL-13 und IL-10 induziert, dagegen durch IFN- γ vermindert (67). Insbesondere in der Lunge sind konstitutiv

hohe CCL18-Werte gemessen worden. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass besonders Alveolarmakrophagen sehr hohe Mengen an CCL18 produzieren und bereits bei Normalpersonen im nativen Zustand einen Richtung alternative Aktivierung verschobenen Phänotyp zeigen, im Gegensatz zu Makrophagen die aus dem Pleuraraum oder der Peritonealhöhle gewonnen werden. Vielleicht ist dies eine Erklärung für das klinische Phänomen, dass sich allergische Krankheiten häufig in Form eines Asthma bronchiale äußern. Zudem ist es denkbar, dass die bereits beschriebenen erhöhten CCL18-Serumspiegel bei Allergikern einen Einfluss auf die DC-Differenzierung nehmen. Daten unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass bei Patienten mit Lungenfibrose der Serumspiegel von CCL18 sehr gut mit der erhöhten CCL18 Produktion von Alveolarmakrophagen bzw. der CCL18 Konzentration in der bronchoalveolären Lavage korreliert (108). Speziell für das Asthma bronchiale ist gezeigt worden, dass Alveolarmakrophagen durch Induktion von Th2-Zytokinen bei T-Zellen ebenfalls die Immunantwort beeinflussen (134). So könnte man sich bei Allergikern ein Szenario vorstellen, in dem gewebständige Makrophagen einwanderende und Antigen aufnehmende DC via CCL18 und anderen Faktoren stimulieren, die dann nach Maturierung zurück in das Lymphsystem wandern. Das von gewebständigen Makrophagen vermehrt produzierte CCL18 könnte auf diese Weise die einwandernden DCs primen, auf diese Weise eine Förderung der Th2-Immunantwort zur Folge haben und somit die allergische Reaktion aufrecht erhalten bzw. verstärken.

4.5 Ausblick

Weitere Studien sind geplant, die untersuchen sollen welche Stimuli die CCL18-Produktion durch DC anregen, beispielsweise Der p1, andere Allergene und IgE. Anschließend soll geprüft werden ob die Triggerung des Mannoserezeptors durch Allergene die CCL18 Produktion hochreguliert. Auch sind weitere Versuchsreihen zur Beeinflussung der Oberflächenmarker auf dendritischen Zellen durch CCL18 geplant.

Experimente mit neutralisierenden CCL18-Antikörper könnten Aussagen geben über eine eventuelle Möglichkeit, auf diese Art eine allergische Reaktion zu unterdrücken, was wiederum auch therapeutische Relevanz haben könnte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Allergische Erkrankungen sind durch eine Abwehrreaktion des menschlichen Immunsystems auf eigentlich harmlose Umweltantigene gekennzeichnet. Das komplizierte Zusammenspiel der Vielzahl an Zellen und Botenstoffen im Immunsystem ist an einer oder mehreren Stellen gestört. In dieser Arbeit wurde der Einfluss eines dieser Botenstoffe, des Chemokins CCL18, auf eine der Zellarten, die eine elementare Rolle im Immunsystem durch Antigenaufnahme, -präsentation und Aktivierung von T-Zellen spielen - die dendritischen Zellen- untersucht. Dazu wurden aus Blutmonozyten von gesunden Probanden immature und mittels LPS gereifte mature dendritische Zellen generiert, mit CCL18 oder IL-10 stimuliert und jeweils in allogenen und autologen Ansätzen zusammen mit naiven T-Zellen ko-kultiviert. Zudem wurde die Konzentration des Chemokins CCL18 in Überständen von dendritische Zellen von Atopikern und Normalpersonen verglichen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass dendritische Zellen von Atopikern signifikant mehr CCL18 produzieren als DC von Normalpersonen. Es stellte sich heraus, dass das Chemokin CCL18 im Gegensatz zu dem Zytokin IL-10 keinen negativen Einfluss auf die Reifung von DC nimmt. Die Expression von HLA-DR auf der Zelloberfläche der DC nahm nach Stimulation mit CCL18 dagegen sogar statistisch signifikant zu. Des Weiteren zeigten wir, dass die Stimulation dendritischer Zellen mit CCL18 zu einer verminderten T-Zell-Proliferationsantwort führt. Zudem gelang der Nachweis, dass CCL18-stimulierte dendritische Zellen sowohl in autologen als auch in allogenen Versuchansätzen naive T-Zellen so aktivieren, dass sie vermehrt die Th2-Zytokine IL-13 und IL-4 und deutlich vermindert das Th1-Zytokin IFN- γ sezernieren. Dabei wurde auch ein konzentrationsabhängiger Effekt der CCL18-Stimulation auf die Th2-Zytokininduktion festgestellt.

Schlussfolgernd belegt diese Arbeit, dass CCL18, neben CCL17 und CCL22, zu den DC2-Chemokinen gerechnet werden muss und die Th2-Immunantwort fördert. Allgemein gilt die vermehrte Sekretion von Th2-Zytokinen und verminderte T-Zell-Proliferation als charakteristisch für allergische Reaktionen. Insgesamt konnten so in der vorliegenden Arbeit erstmals die bereits vielfach vorliegenden Hinweise auf einen Zusammenhang des Chemokins CCL18 mit allergischen Erkrankungen durch funktionelle Experimente untermauert werden.

6 LITERATUR

- 1 Adema, G. J., Hartgers, F., Verstraten, R., de Vries, E., Marland, G., Menon, S., Foster, J., Xu, Y., Nooyen, P., McClanahan, T., Bacon, K. B., and Figdor, C. G. (1997) A dendritic-cell-derived C-C chemokine that preferentially attracts naive T cells. *Nature* 387(6634):713-7
- 2 Aiba, S., Manome, H., Yoshino, Y., and Tagami, H. (2003) Alteration in the production of IL-10 and IL-12 and aberrant expression of CD23, CD83 and CD86 by monocytes or monocyte-derived dendritic cells from atopic dermatitis patients. *Experimental Dermatology* 12(1):86-95
- 3 Aleksza, M., Lukacs, A., Antal-Szalmas, P., Hunyadi, J., and Szegedi, A. (2002) Increased frequency of intracellular interleukin (IL)-13 and IL-10, but not IL-4, expressing CD4+ and CD8+ peripheral T cells of patients with atopic dermatitis. *British Journal of Dermatology* 147(6):1135-41
- 4 Aliberti, J., Reis e Sousa, Schito, M., Hieny, S., Wells, T., Huffnagle, G. B., and Sher, A. (2000) CCR5 provides a signal for microbial induced production of IL-12 by CD8 alpha+ dendritic cells. *Nature Immunology* 1(1):83-7
- 5 Allavena, P., Piemonti, L., Longoni, D., Bernasconi, S., Stoppacciaro, A., Ruco, L., and Mantovani, A. (1998) IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *European Journal of Immunology* 28(1):359-69
- 6 Asano, M., Toda, M., Sakaguchi, N., and Sakaguchi, S. (1996) Autoimmune disease as a consequence of developmental abnormality of a T cell subpopulation. *Journal of Experimental Medicine* 184(2):387-96
- 7 Banchereau, J., Pulendran, B., Steinman, R., and Palucka, K. (2000) Will the making of plasmacytoid dendritic cells in vitro help unravel their mysteries? *Journal of Experimental Medicine* 192(12):39-44
- 8 Banchereau, J. and Steinman, R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392, 245-252
- 9 Bellinghausen, I., Brand, U., Steinbrink, K., Enk, A. H., Knop, J., and Saloga, J. (2001) Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 108(2):242-9
- 10 Berkman, N., John, M., Roesems, G., Jose, P. J., Barnes, P. J., and Chung, K. F. (1995) Inhibition of macrophage inflammatory protein-1 alpha expression by IL-10. Differential sensitivities in human blood monocytes and alveolar macrophages. *Journal of Immunology* 155(9):4412-8
- 11 Boven, L. A., van Meurs, M., Boot, R. G., Mehta, A., Boon, L., Aerts, J. M., and Laman, J. D. (2004) Gaucher cells demonstrate a distinct macrophage phenotype and resemble alternatively activated macrophages. *American Journal of Clinical Pathology* 122(3):359-69

- 12 Braun, M. C., Lahey, E., and Kelsall, B. L. (2000) Selective suppression of IL-12 production by chemoattractants. *Journal of Immunology* 164(6):3009-17
- 13 Buelens, C., Willems, F., Delvaux, A., Pierard, G., Delville, J. P., Velu, T., and Goldman, M. (1995) Interleukin-10 differentially regulates B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) expression on human peripheral blood dendritic cells. *European Journal of Immunology* 25(9):2668-72
- 14 Byrnes, H. D., Kaminski, H., Mirza, A., Deno, G., Lundell, D., and Fine, J. S. (1999) Macrophage Inflammatory Protein-3 beta Enhances IL-10 Production by Activated Human Peripheral Blood Monocytes and T Cells. *Journal of Immunology* 163(9):4715-4720
- 15 Caron, G., Delneste, Y., Roelandts, E., Duez, C., Bonnefoy, J. Y., Pestel, J., and Jeannin, P. (2001) Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells. *Journal of Immunology* 167(7):3682-6
- 16 Caron, G., Delneste, Y., Roelandts, E., Duez, C., Herbault, N., Magistrelli, G., Bonnefoy, J. Y., Pestel, J., and Jeannin, P. (2001) Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells. *Journal of Immunology* 166(10):6000-6
- 17 Caux, C., Massacrier, C., Vanbervliet, B., Dubois, B., Van Kooten, C., Durand, I., and Banchereau, J. (1994) Activation of human dendritic cells through CD40 cross-linking. *Journal of Experimental Medicine* 180(4):1263-72
- 18 Caux, C., Vanbervliet, B., Massacrier, C., Azuma, M., Okumura, K., Lanier, L. L., and Banchereau, J. (1994) B70/B7-2 is identical to CD86 and is the major functional ligand for CD28 expressed on human dendritic cells. *Journal of Experimental Medicine* 180(5):1841-7
- 19 Cella, M., Salio, M., Sakakibara, Y., Langen, H., Julkunen, I., and Lanzavecchia, A. (1999) Maturation, activation, and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA. *Journal of Experimental Medicine* 189(5):821-9
- 20 Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A., and Alber, G. (1996) Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *Journal of Experimental Medicine* 184(2):747-52
- 21 Chehade, M. and Mayer, L. (2005) Oral tolerance and its relation to food hypersensitivities. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 115(1):3-12
- 22 Chen, Y., Kuchroo, V. K., Inobe, J., Hafler, D. A., and Weiner, H. L. (1994) Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science* 265(5176):1237-40
- 23 Chieppa, M., Bianchi, G., Doni, A., Del Prete, A., Sironi, M., Laskarin, G., Monti, P., Piemonti, L., Biondi, A., Mantovani, A., Introna, M., and Allavena, P. (2003) Cross-Linking of the Mannose Receptor on Monocyte-Derived Dendritic Cells Activates an Anti-Inflammatory Immunosuppressive Program. *Journal of Immunology* 171(9):4552-4560

- 24 Corinti, S., Albanesi, C., la Sala, A., Pastore, S., and Girolomoni, G. (2001) Regulatory Activity of Autocrine IL-10 on Dendritic Cell Functions. *Journal of Immunology* 166(7):4312-8
- 25 De Smedt, T., Pajak, B., Muraille, E., Lespagnard, L., Heinen, E., De Baetselier, P., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1996) Regulation of dendritic cell numbers and maturation by lipopolysaccharide in vivo. *Journal of Experimental Medicine* 184(4):1413-24
- 26 De Smedt, T., Van Mechelen, M., De Becker, G., Urbain, J., Leo, O., and Moser, M. (1997) Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *European Journal of Immunology* 27(5):1229-35
- 27 de Vries, I. J., Eggert, A. A., Scharenborg, N. M., Vissers, J. L., Lesterhuis, W. J., Boerman, O. C., Punt, C. J., Adema, G. J., and Figdor, C. G. (2002) Phenotypical and functional characterization of clinical grade dendritic cells. *Journal of Immunotherapy* 25(5):429-38
- 28 de Waal, M. R., Abrams, J., Bennett, B., Figdor, C. G., and de Vries, J. E. (1991) Interleukin 10 (IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *Journal of Experimental Medicine* 174(5):1209-20
- 29 Del Prete, G. F., De Carli, M., Mastromauro, C., Biagiotti, R., Macchia, D., Falagiani, P., Ricci, M., and Romagnani, S. (1991) Purified protein derivative of *Mycobacterium tuberculosis* and excretory-secretory antigen(s) of *Toxocara canis* expand in vitro human T cells with stable and opposite (type 1 T helper or type 2 T helper) profile of cytokine production. *Journal of Clinical Investigation* 88(1):346-50
- 30 Deslee, G., Charbonnier, A. S., Hammad, H., Angyalosi, G., Tillie-Leblond, I., Mantovani, A., Tonnel, A. B., and Pestel, J. (2002) Involvement of the mannose receptor in the uptake of Der p 1, a major mite allergen, by human dendritic cells. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 110(5):763-70
- 31 Dieu, M. C., Vanbervliet, B., Vicari, A., Bridon, J. M., Oldham, E., Ait-Yahia, S., Briere, F., Zlotnik, A., Lebecque, S., and Caux, C. (1998) Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *Journal of Experimental Medicine* 188(2):373-86
- 32 Dugas, N., Vouldoukis, I., Becherel, P., Arock, M., Debre, P., Tardieu, M., Mossalayi, D. M., Delfraissy, J. F., Kolb, J. P., and Dugas, B. (1996) Triggering of CD23b antigen by anti-CD23 monoclonal antibodies induces interleukin-10 production by human macrophages. *European Journal of Immunology* 26(6):1394-8
- 33 El Asrar, A. M., Struyf, S., Al Kharashi, S. A., Missotten, L., Van Damme, J., and Geboes, K. (2002) Expression of T lymphocyte chemoattractants and activation markers in vernal keratoconjunctivitis. *British Journal of Ophthalmology* 86(10):1175-80
- 34 Engelmayer, J., Larsson, M., Subklewe, M., Chahroudi, A., Cox, W. I., Steinman, R. M., and Bhardwaj, N. (1999) Vaccinia virus inhibits the maturation of human dendritic cells: a novel mechanism of immune evasion. *Journal of Immunology* 163(12):6762-8

- 35 Faulkner, L., Buchan, G., and Baird, M. (2000) Interleukin-10 does not affect phagocytosis of particulate antigen by bone marrow-derived dendritic cells but does impair antigen presentation. *Immunology* 99(4):523-31
- 36 Fiorentino, D. F., Bond, M. W., and Mosmann, T. R. (1989) Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine* 170(6):2081-95
- 37 Gagliardi, M. C., Sallusto, F., Marinaro, M., Langenkamp, A., Lanzavecchia, A., and De Magistris, M. T. (2000) Cholera toxin induces maturation of human dendritic cells and licenses them for Th2 priming. *European Journal of Immunology* 30(8):2394-403
- 38 Ghaemmaghami, A. M., Gough, L., Sewell, H. F., and Shakib, F. (2002) The proteolytic activity of the major dust mite allergen Der p 1 conditions dendritic cells to produce less interleukin-12: allergen-induced Th2 bias determined at the dendritic cell level. *Clinical & Experimental Allergy* 32(10):1468-75
- 39 Goerdt, S. and Orfanos, C. E. (1999) Other functions, other genes: alternative activation of antigen-presenting cells. *Immunity* 10(2):137-42
- 40 Gordon, S. (2003) Alternative activation of macrophages. *Nature Reviews Immunology* 3(1):23-35
- 41 Grouard, G., Risoan, M. C., Filgueira, L., Durand, I., Banchereau, J., and Liu, Y. J. (1997) The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *Journal of Experimental Medicine* 185(6):1101-11
- 42 Groux, H., Bigler, M., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1996) Interleukin-10 induces a long-term antigen-specific anergic state in human CD4+ T cells. *Journal of Experimental Medicine* 184(1):19-29
- 43 Groux, H., O'Garra, A., Bigler, M., Rouleau, M., Antonenko, S., de Vries, J. E., and Roncarolo, M. G. (1997) A CD4+ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. *Nature* 389(6652):737-42
- 44 Guan, P., Burghes, A. H., Cunningham, A., Lira, P., Brissette, W. H., Neote, K., and McColl, S. R. (1999) Genomic organization and biological characterization of the novel human CC chemokine DC-CK-1/PARC/MIP-4/SCYA18. *Genomics* 56(3):296-302
- 45 Gunther, C., Bello-Fernandez, C., Kopp, T., Kund, J., Carballido-Perrig, N., Hinteregger, S., Fassl, S., Schwarzler, C., Lametschwandtner, G., Stingl, G., Biedermann, T., and Carballido, J. M. (2005) CCL18 Is Expressed in Atopic Dermatitis and Mediates Skin Homing of Human Memory T Cells. *Journal of Immunology* 174(3):1723-8
- 46 Hammad, H., Charbonnier, A. S., Duez, C., Jacquet, A., Stewart, G. A., Tonnel, A. B., and Pestel, J. (2001) Th2 polarization by Der p 1--pulsed monocyte-derived dendritic cells is due to the allergic status of the donors. *Blood* 98(4):1135-41

- 47 Hammad, H., Smits, H. H., Ratajczak, C., Nithiananthan, A., Wierenga, E. A., Stewart, G. A., Jacquet, A., Tonnel, A. B., and Pestel, J. (2003) Monocyte-derived dendritic cells exposed to Der p 1 allergen enhance the recruitment of Th2 cells: major involvement of the chemokines TARC/CCL17 and MDC/CCL22. *European Cytokine Network* 14(4):219-28
- 48 Hart, P. H., Jones, C. A., and Finlay-Jones, J. J. (1995) Monocytes cultured in cytokine-defined environments differ from freshly isolated monocytes in their responses to IL-4 and IL-10. *Journal of Leukocyte Biology* 57(6):909-18
- 49 Hartl, D., Griese, M., Nicolai, T., Zissel, G., Prell, C., Konstantopoulos, N., Gruber, R., Reinhardt, D., Schendel, D. J., and Krauss-Etschmann, S. (2005) Pulmonary chemokines and their receptors differentiate children with asthma and chronic cough. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 115(4):728-36
- 50 Hartmann, G., Weiner, G. J., and Krieg, A. M. (1999) CpG DNA: a potent signal for growth, activation, and maturation of human dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96(16):9305-10
- 51 Hegde, S., Pahne, J., and Smola-Hess, S. (2004) Novel immunosuppressive properties of interleukin-6 in dendritic cells: inhibition of NF-kappaB binding activity and CCR7 expression. *FASEB Journal*.18(12):1439-41
- 52 Hieshima, K., Imai, T., Baba, M., Shoudai, K., Ishizuka, K., Nakagawa, T., Tsuruta, J., Takeya, M., Sakaki, Y., Takatsuki, K., Miura, R., Opdenakker, G., Van Damme, J., Yoshie, O., and Nomiyama, H. (1997) A novel human CC chemokine PARC that is most homologous to macrophage-inflammatory protein-1 alpha/LD78 alpha and chemotactic for T lymphocytes, but not for monocytes. *Journal of Immunology* 159(3):1140-9
- 53 Hsu, T. L., Chang, Y. C., Chen, S. J., Liu, Y. J., Chiu, A. W., Chio, C. C., Chen, L., and Hsieh, S. L. (2002) Modulation of dendritic cell differentiation and maturation by decoy receptor 3. *Journal of Immunology* 168(10):4846-53
- 54 Imai, T., Baba, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Takagi, S., and Yoshie, O. (1997) The T cell-directed CC chemokine TARC is a highly specific biological ligand for CC chemokine receptor 4. *Journal of Biological Chemistry* 272(23):15036-42
- 55 Imai, T., Chantry, D., Raport, C. J., Wood, C. L., Nishimura, M., Godiska, R., Yoshie, O., and Gray, P. W. (1998) Macrophage-derived chemokine is a functional ligand for the CC chemokine receptor 4. *Journal of Biological Chemistry* 273(3):1764-8
- 56 Imai, T., Nagira, M., Takagi, S., Kakizaki, M., Nishimura, M., Wang, J., Gray, P. W., Matsushima, K., and Yoshie, O. (1999) Selective recruitment of CCR4-bearing Th2 cells toward antigen-presenting cells by the CC chemokines thymus and activation-regulated chemokine and macrophage-derived chemokine. *International Immunology* 11(1):81-8
- 57 Iwasaki, A. and Kelsall, B. L. (1999) Freshly isolated Peyer's patch, but not spleen, dendritic cells produce interleukin 10 and induce the differentiation of T helper type 2 cells. *Journal of Experimental Medicine* 190(2):229-239

- 58 Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., and Shlomchik, M. (2002) in: *Immunologie; Kapitel 8*, pp. 317-455, Spektrum, ISBN 3-8274-1079-7
- 59 Jonuleit, H., Kuhn, U., Muller, G., Steinbrink, K., Paragnik, L., Schmitt, E., Knop, J., and Enk, A. H. (1997) Pro-inflammatory cytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *European Journal of Immunology* 27(12):3135-42
- 60 Kalinski, P., Hilkens, C. M., Snijders, A., Snijdewint, F. G., and Kapsenberg, M. L. (1997) IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E2, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells. *Journal of Immunology* 159(1):28-35
- 61 Kalinski, P., Hilkens, C. M., Wierenga, E. A., and Kapsenberg, M. L. (1999) T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunology Today* 20(12):561-567
- 62 Kapsenberg, M. L. (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven T-cell polarization. *Nature Reviews Immunology* 3(12):984-93
- 63 Kellermann, S. A., Hudak, S., Oldham, E. R., Liu, Y. J., and McEvoy, L. M. (1999) The CC chemokine receptor-7 ligands 6Ckine and macrophage inflammatory protein-3 beta are potent chemoattractants for in vitro- and in vivo-derived dendritic cells. *Journal of Immunology* 162(7):3859-64
- 64 Khanna, A., Morelli, A. E., Zhong, C., Takayama, T., Lu, L., and Thomson, A. W. (2000) Effects of liver-derived dendritic cell progenitors on Th1- and Th2-like cytokine responses in vitro and in vivo. *Journal of Immunology* 164(3):1346-54
- 65 Kiertscher, S. M., Luo, J., Dubinett, S. M., and Roth, M. D. (2000) Tumors Promote Altered Maturation and Early Apoptosis of Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Journal of Immunology* 164(3):1269-1276
- 66 Kim, C. H., Nagata, K., and Butcher, E. C. (2003) Dendritic Cells Support Sequential Reprogramming of Chemoattractant Receptor Profiles During Naive to Effector T Cell Differentiation. *Journal of Immunology* 171(1):152-158
- 67 Kodolja, V., Muller, C., Politz, O., Hakij, N., Orfanos, C. E., and Goerdts, S. (1998) Alternative macrophage activation-associated CC-chemokine-1, a novel structural homologue of macrophage inflammatory protein-1 alpha with a Th2-associated expression pattern. *Journal of Immunology* 160(3):1411-8
- 68 Kopydlowski, K. M., Salkowski, C. A., Cody, M. J., van Rooijen, N., Major, J., Hamilton, T. A., and Vogel, S. N. (1999) Regulation of macrophage chemokine expression by lipopolysaccharide in vitro and in vivo. *Journal of Immunology* 163(3):1537-44
- 69 Kuroda, E., Sugiura, T., Okada, K., Zeki, K., and Yamashita, U. (2001) Prostaglandin E2 up-regulates macrophage-derived chemokine production but suppresses IFN-inducible protein-10 production by APC. *Journal of Immunology* 166(3):1650-8

- 70 la Sala, A., Ferrari, D., Corinti, S., Cavani, A., Di Virgilio, F., and Girolomoni, G. (2001) Extracellular ATP Induces a Distorted Maturation of Dendritic Cells and Inhibits Their Capacity to Initiate Th1 Responses. *Journal of Immunology* 166(3):1611-1617
- 71 Langenkamp, A., Messi, M., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2000) Kinetics of dendritic cell activation: impact on priming of TH1, TH2 and nonpolarized T cells. *Nature Immunology* 1(4):311-6
- 72 Lavelle, E. C., Jarnicki, A., McNeela, E., Armstrong, M. E., Higgins, S. C., Leavy, O., and Mills, K. H. (2004) Effects of cholera toxin on innate and adaptive immunity and its application as an immunomodulatory agent. *Journal of Leukocyte Biology* 75(5):756-63
- 73 Lechmann, M., Berchtold, S., Steinkasserer, A., and Hauber, J. (2002) CD83 on dendritic cells: more than just a marker for maturation. *Trends in Immunology* 23(6):273-275
- 74 Leung, S. Y., Yuen, S. T., Chu, K. M., Mathy, J. A., Li, R., Chan, A. S., Law, S., Wong, J., Chen, X., and So, S. (2004) Expression profiling identifies chemokine (C-C motif) ligand 18 as an independent prognostic indicator in gastric cancer. *Gastroenterology* 127(2):457-69
- 75 Liu, G., Ng, H., Akasaki, Y., Yuan, X., Ehtesham, M., Yin, D., Black, K. L., and Yu, J. S. (2004) Small interference RNA modulation of IL-10 in human monocyte-derived dendritic cells enhances the Th1 response. *European Journal of Immunology* 34(6):1680-7
- 76 Liu, L., Rich, B. E., Inobe, J., Chen, W., and Weiner, H. L. (1997) A potential pathway of Th2 development during primary immune response. IL-10 pretreated dendritic cells can prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 417:375-81
- 77 Liu, Y. J., Kanzler, H., Soumelis, V., and Gilliet, M. (2001) Dendritic cell lineage, plasticity and cross-regulation. *Nature Immunology* 2(7):585-9
- 78 Long, J. A., Fogel-Petrovic, M., Knight, D. A., Thompson, P. J., and Upham, J. W. (2004) Higher prostaglandin e2 production by dendritic cells from subjects with asthma compared with normal subjects. *American Journal of Respiratory & Critical Care Medicine* 170(5):485-91
- 79 Lukacs, N. W., Chensue, S. W., Karpus, W. J., Lincoln, P., Keefer, C., Strieter, R. M., and Kunkel, S. L. (1997) C-C chemokines differentially alter interleukin-4 production from lymphocytes. *American Journal of Pathology* 150(5):1861-8
- 80 Lundgren, M., Persson, U., Larsson, P., Magnusson, C., Smith, C. I., Hammarstrom, L., and Severinson, E. (1989) Interleukin 4 induces synthesis of IgE and IgG4 in human B cells. *European Journal of Immunology* 19(7):1311-1315
- 81 Macatonia, S. E., Doherty, T. M., Knight, S. C., and O'Garra, A. (1993) Differential effect of IL-10 on dendritic cell-induced T cell proliferation and IFN-gamma production. *Journal of Immunology* 150(9):3755-65

- 82 Macatonia, S. E., Hosken, N. A., Litton, M., Vieira, P., Hsieh, C. S., Culpepper, J. A., Wysocka, M., Trinchieri, G., Murphy, K. M., and O'Garra, A. (1995) Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *Journal of Immunology* 154(10):5071-5079
- 83 Magnan, A., van Pee, D., Bongrand, P., and Vervloet, D. (1998) Alveolar macrophage interleukin (IL)-10 and IL-12 production in atopic asthma. *Allergy* 53(11):1092-5
- 84 Makela, M. J., Kanehiro, A., Borish, L., Dakhama, A., Loader, J., Joetham, A., Xing, Z., Jordana, M., Larsen, G. L., and Gelfand, E. W. (2000) IL-10 is necessary for the expression of airway hyperresponsiveness but not pulmonary inflammation after allergic sensitization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97(11):6007-12
- 85 Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in Immunology* 25(12):677-86
- 86 Marfaing-Koka, A., Maravic, M., Humbert, M., Galanaud, P., and Emilie, D. (1996) Contrasting effects of IL-4, IL-10 and corticosteroids on RANTES production by human monocytes. *International Immunology* 8(10):1587-94
- 87 Marsland, B. J., Battig, P., Bauer, M., Ruedl, C., Lassing, U., Beerli, R. R., Dietmeier, K., Ivanova, L., Pfister, T., and Vogt, L. (2005) CCL19 and CCL21 Induce a Potent Proinflammatory Differentiation Program in Licensed Dendritic Cells. *Immunity* 22(4):493-505
- 88 Matsumoto, K., Narita, S., Rerecich, T., Snider, D. P., and O'Byrne, P. M. (2004) Different profile of interleukin-10 production in circulating T cells from atopic asthmatics compared with healthy subjects. *Canadian Respiratory Journal* 11(1):33-8
- 89 Melchers, I., Jooss-Rudiger, J., and Peter, H. H. (1997) Reactivity patterns of synovial T-cell lines derived from a patient with rheumatoid arthritis. I. Reactions with defined antigens and auto-antigens suggest the existence of multireactive T-cell clones. *Scandinavian Journal of Immunology* 46(2):187-94
- 90 Mellman, I. and Steinman, R. M. (2001) Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell* 106(3):255-8
- 91 Moore, K. W., de Waal, M. R., Coffman, R. L., and O'Garra, A. (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology* 19:683-765
- 92 Moore, K. W., Vieira, P., Fiorentino, D. F., Trounstein, M. L., Khan, T. A., and Mosmann, T. R. (1990) Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-Barr virus gene BCRF1. *Science* 248(4960):1230-4
- 93 Morelli, A. E. and Thomson, A. W. (2003) Dendritic cells: regulators of alloimmunity and opportunities for tolerance induction. *Immunological Reviews* 196:125-146
- 94 Moser, M. and Murphy, K. M. (2000) Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nature Immunology* 1(3):199-205

- 95 Mosmann, T. R., Cherwinski, H., Bond, M. W., Giedlin, M. A., and Coffman, R. L. (1986) Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology* 136(7):2348-57
- 96 Mrazek, F., Sekerova, V., Drabek, J., Kolek, V., du Bois, R. M., and Petrek, M. (2002) Expression of the chemokine PARC mRNA in bronchoalveolar cells of patients with sarcoidosis. *Immunology Letters* 84(1):17-22
- 97 Muraille, E., De Trez, C., Pajak, B., Brait, M., Urbain, J., and Leo, O. (2002) T cell-dependent maturation of dendritic cells in response to bacterial superantigens. *Journal of Immunology* 168(9):4352-60
- 98 Nibbs, R. J., Salcedo, T. W., Campbell, J. D., Yao, X. T., Li, Y., Nardelli, B., Olsen, H. S., Morris, T. S., Proudfoot, A. E., Patel, V. P., and Graham, G. J. (2000) C-C chemokine receptor 3 antagonism by the beta-chemokine macrophage inflammatory protein 4, a property strongly enhanced by an amino-terminal alanine-methionine swap. *Journal of Immunology* 164(3):1488-97
- 99 Nomura, I., Gao, B., Boguniewicz, M., Darst, M. A., Travers, J. B., and Leung, D. Y. (2003) Distinct patterns of gene expression in the skin lesions of atopic dermatitis and psoriasis: a gene microarray analysis. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 112(6):1195-202
- 100 Ohmen, J. D., Hanifin, J. M., Nickoloff, B. J., Rea, T. H., Wyzkowski, R., Kim, J., Jullien, D., McHugh, T., Nassif, A. S., and Chan, S. C. (1995) Overexpression of IL-10 in atopic dermatitis. Contrasting cytokine patterns with delayed-type hypersensitivity reactions. *Journal of Immunology* 154(4):1956-63
- 101 Olikowsky, T., Wang, Z. Q., Dudhane, A., Horowitz, H., Conti, B., and Hoffmann, M. K. (1997) Two distinct pathways of human macrophage differentiation are mediated by interferon-gamma and interleukin-10. *Immunology* 91(1):104-8
- 102 Olson, T. S. and Ley, K. (2002) Chemokines and chemokine receptors in leukocyte trafficking. *American Journal of Physiology - Regulatory Integrative & Comparative Physiology* 283(1):7-28
- 103 Omata, N., Yasutomi, M., Yamada, A., Iwasaki, H., Mayumi, M., and Ohshima, Y. (2002) Monocyte chemoattractant protein-1 selectively inhibits the acquisition of CD40 ligand-dependent IL-12-producing capacity of monocyte-derived dendritic cells and modulates Th1 immune response. *Journal of Immunology* 169(9):4861-6
- 104 Ostroukhova, M., Seguin-Devaux, C., Oriss, T. B., Dixon-McCarthy, B., Yang, L., Ameredes, B. T., Corcoran, T. E., and Ray, A. (2004) Tolerance induced by inhaled antigen involves CD4(+) T cells expressing membrane-bound TGF-beta and FOXP3. *Journal of Clinical Investigation* 114(1):28-38
- 105 Panina-Bordignon, P., Mazzeo, D., Lucia, P. D., D'Ambrosio, D., Lang, R., Fabbri, L., Self, C., and Sinigaglia, F. (1997) Beta2-agonists prevent Th1 development by selective inhibition of interleukin 12. *Journal of Clinical Investigation* 100(6):1513-9

- 106 Pearce, E. J., Caspar, P., Grzych, J. M., Lewis, F. A., and Sher, A. (1991) Downregulation of Th1 cytokine production accompanies induction of Th2 responses by a parasitic helminth, *Schistosoma mansoni*. *Journal of Experimental Medicine* 173(1):159-66
- 107 Pivarsci, A., Gombert, M., Dieu-Nosjean, M. C., Lauerma, A., Kubitza, R., Meller, S., Rieker, J., Muller, A., Da Cunha, L., Haahtela, A., Sonkoly, E., Fridman, W. H., Alenius, H., Kemeny, L., Ruzicka, T., Zlotnik, A., and Homey, B. (2004) CC chemokine ligand 18, an atopic dermatitis-associated and dendritic cell-derived chemokine, is regulated by staphylococcal products and allergen exposure. *Journal of Immunology* 173(9):5810-7
- 108 Prasse, A., Petchkovski, D., Ludwig, C., Goldmann, T., Vollmer, E., Müller-Quernheim, J., Zissel, G. (2004) Increased CCL18 Production by human Alveolar Macrophages is associated with pulmonary fibrosis. 13th International Colloquium on Lung Fibrosis
- 109 Prasse, A., Georges, C. G., Biller, H., Hamm, H., Matthys, H., Luttmann, W., and Virchow, J. C., Jr. (2000) Th1 cytokine pattern in sarcoidosis is expressed by bronchoalveolar CD4+ and CD8+ T cells. *Clinical & Experimental Immunology* 122(2):241-8
- 110 Quinn, T. J., Taylor, S., Wohlford-Lenane, C. L., and Schwartz, D. A. (2000) IL-10 reduces grain dust-induced airway inflammation and airway hyperreactivity. *Journal of Applied Physiology* 88(1):173-9
- 111 Randolph, D. A., Carruthers, C. J., Szabo, S. J., Murphy, K. M., and Chaplin, D. D. (1999) Modulation of airway inflammation by passive transfer of allergen-specific Th1 and Th2 cells in a mouse model of asthma. *Journal of Immunology* 162(4):2375-83
- 112 Reape, T. J., Rayner, K., Manning, C. D., Gee, A. N., Barnette, M. S., Burnand, K. G., and Groot, P. H. (1999) Expression and cellular localization of the CC chemokines PARC and ELC in human atherosclerotic plaques. *American Journal of Pathology* 154(2):365-74
- 113 Reider, N., Reider, D., Ebner, S., Holzmann, S., Herold, M., Fritsch, P., and Romani, N. (2002) Dendritic cells contribute to the development of atopy by an insufficiency in IL-12 production. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 109(1):89-95
- 114 Renkl, A. C., Wussler, J., Ahrens, T., Thoma, K., Kon, S., Uede, T., Martin, S. F., Simon, J. C., and Weiss, J. M. (2005) Osteopontin functionally activates dendritic cells and induces their differentiation towards a Th-1 polarizing phenotype. *Blood* 2004-2008, epublication ahead of print
- 115 Rissoan, M. C., Soumelis, V., Kadowaki, N., Grouard, G., Briere, F., de Waal, M. R., and Liu, Y. J. (1999) Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283(5405):1183-6
- 116 Romagnani, S. (1991) Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *International Journal of Clinical & Laboratory Research* 21(2):152-8

- 117 Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D., and Schuler, G. (1996) Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *Journal of Immunological Methods* 196(2):137-151
- 118 Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C., and Lanzavecchia, A. (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine* 182(2):389-400
- 119 Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (1994) 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. *Journal of Experimental Medicine* 179(4):1109-18
- 120 Sallusto, F. and Lanzavecchia, A. (2002) The instructive role of dendritic cells on T-cell responses. *Arthritis Research* 4(3):127-32
- 121 Sallusto, F., Schaerli, P., Loetscher, P., Schaniel, C., Lenig, D., Mackay, C. R., Qin, S., and Lanzavecchia, A. (1998) Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *European Journal of Immunology* 28(9):2760-9
- 122 Schraufstatter, I., Takamori, H., Sikora, L., Sriramarao, P., and DiScipio, R. G. (2004) Eosinophils and monocytes produce pulmonary and activation-regulated chemokine, which activates cultured monocytes/macrophages. *American Journal of Physiology - Lung Cellular & Molecular Physiology* 286(3):494-501
- 123 Schutyser, E., Struyf, S., Proost, P., Opdenakker, G., Laureys, G., Verhasselt, B., Peperstraete, L., Van, d. P., I, Saccani, A., Allavena, P., Mantovani, A., and Van Damme, J. (2002) Identification of biologically active chemokine isoforms from ascitic fluid and elevated levels of CCL18/pulmonary and activation-regulated chemokine in ovarian carcinoma. *Journal of Biological Chemistry* 277(27):24584-93
- 124 Schutyser, E., Struyf, S., Wuyts, A., Put, W., Geboes, K., Grillet, B., Opdenakker, G., and Van Damme, J. (2001) Selective induction of CCL18/PARC by staphylococcal enterotoxins in mononuclear cells and enhanced levels in septic and rheumatoid arthritis. *European Journal of Immunology* 31(12):3755-62
- 125 Smith, A. P., Paolucci, C., Di Lullo, G., Burastero, S. E., Santoro, F., and Lusso, P. (2005) Viral replication-independent blockade of dendritic cell maturation and interleukin-12 production by human herpesvirus 6. *Journal of Virology* 79(5):2807-13
- 126 Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C. M., and Kapsenberg, M. L. (1998) High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *International Immunology* 10(11):1593-8
- 127 Snijdewint, F. G., Kalinski, P., Wierenga, E. A., Bos, J. D., and Kapsenberg, M. L. (1993) Prostaglandin E2 differentially modulates cytokine secretion profiles of human T helper lymphocytes. *Journal of Immunology* 150(12):5321-9

- 128 Stein, M., Keshav, S., Harris, N., and Gordon, S. (1992) Interleukin 4 potently enhances murine macrophage mannose receptor activity: a marker of alternative immunologic macrophage activation. *Journal of Experimental Medicine* 176(1):287-92
- 129 Steinbrink, K., Graulich, E., Kubsch, S., Knop, J., and Enk, A. H. (2002) CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 99(7):2468-76
- 130 Steinbrink, K., Wolfl, M., Jonuleit, H., Knop, J., and Enk, A. H. (1997) Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *Journal of Immunology* 159(10):4772-80
- 131 Struyf, S., Schutyser, E., Gouwy, M., Gijssbers, K., Proost, P., Benoit, Y., Opdenakker, G., Van Damme, J., and Laureys, G. (2003) PARC/CCL18 is a plasma CC chemokine with increased levels in childhood acute lymphoblastic leukemia. *American Journal of Pathology* 163(5):2065-75
- 132 Stumbles, P. A., Thomas, J. A., Pimm, C. L., Lee, P. T., Venaille, T. J., Proksch, S., and Holt, P. G. (1998) Resting respiratory tract dendritic cells preferentially stimulate T helper cell type 2 (Th2) responses and require obligatory cytokine signals for induction of Th1 immunity. *Journal of Experimental Medicine* 188(11):2019-31
- 133 Tanaka, H., Demeure, C. E., Rubio, M., Delespesse, G., and Sarfati, M. (2000) Human monocyte-derived dendritic cells induce naive T cell differentiation into T helper cell type 2 (Th2) or Th1/Th2 effectors. Role of stimulator/responder ratio. *Journal of Experimental Medicine* 192(3):405-412
- 134 Tang, C., Rolland, J. M., Ward, C., Thien, F., Li, X., Gollant, S., and Walters, E. H. (1998) Differential regulation of allergen-specific T(H2)- but not T(H1)-type responses by alveolar macrophages in atopic asthma. *Journal of Allergy & Clinical Immunology* 102(3):368-75
- 135 Thery, C. and Amigorena, S. (2001) The cell biology of antigen presentation in dendritic cells. *Current Opinion in Immunology* 13(1):45-51
- 136 Traidl-Hoffmann, C., Mariani, V., Hochrein, H., Karg, K., Wagner, H., Ring, J., Mueller, M. J., Jakob, T., and Behrendt, H. (201) Pollen-associated phytoprostanes inhibit dendritic cell interleukin-12 production and augment T helper type 2 cell polarization. *Journal of Experimental Medicine* 201(4):627-636
- 137 Tzachanis, D., Berezovskaya, A., Nadler, L. M., and Boussiotis, V. A. (2002) Blockade of B7/CD28 in mixed lymphocyte reaction cultures results in the generation of alternatively activated macrophages, which suppress T-cell responses. *Blood* 99(4):1465-73
- 138 van der Voort, R., Kramer, M., Lindhout, E., Torensma, R., Eleveld, D., van Lieshout, A. W. T., Looman, M., Ruers, T., Radstake, T. R. D. J., Figdor, C. G., and Adema, G. J. (2005) Novel monoclonal antibodies detect elevated levels of the chemokine CCL18/DC-CK1 in serum and body fluids in pathological conditions. *Journal of Leukocyte Biology* 77(5):739-747
- 139 Vecchiarelli, A., Siracusa, A., Monari, C., Pietrella, D., Retini, C., and Severini, C. (1994) Cytokine regulation of low-affinity IgE receptor (CD23) on monocytes from asthmatic subjects. *Clinical & Experimental Immunology* 97(2):248-53

- 140 Veeraswamy, R. K., Cella, M., Colonna, M., and Unanue, E. R. (2003) Dendritic cells process and present antigens across a range of maturation states. *Journal of Immunology* 170(11):5367-72
- 141 Vulcano, M., Struyf, S., Scapini, P., Cassatella, M., Bernasconi, S., Bonecchi, R., Calleri, A., Penna, G., Adorini, L., Luini, W., Mantovani, A., Van Damme, J., and Sozzani, S. (2003) Unique Regulation of CCL18 Production by Maturing Dendritic Cells. *Journal of Immunology* 170, 3843-3849
- 142 Whelan, M., Harnett, M. M., Houston, K. M., Patel, V., Harnett, W., and Rigley, K. P. (2000) A filarial nematode-secreted product signals dendritic cells to acquire a phenotype that drives development of Th2 cells. *Journal of Immunology* 164(12):6453-60
- 143 Yoshida, R., Imai, T., Hieshima, K., Kusuda, J., Baba, M., Kitaura, M., Nishimura, M., Kakizaki, M., Nomiyama, H., and Yoshie, O. (1997) Molecular cloning of a novel human CC chemokine EB11-ligand chemokine that is a specific functional ligand for EB11, CCR7. *Journal of Biological Chemistry* 272(21):13803-9
- 144 Zhou, L. J. and Tedder, T. F. (1995) Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *Journal of Immunology* 154(8):3821-35
- 145 Zissel, G., Schlaak, J., Schlaak, M., and Muller-Quernheim, J. (1996) Regulation of cytokine release by alveolar macrophages treated with interleukin-4, interleukin-10, or transforming growth factor beta. *European Cytokine Network* 7(1):59-66
- 146 Zlotnik, A. and Yoshie, O. (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity* 12(2):121-7
- 147 Zou, J., Young, S., Zhu, F., Gheyas, F., Skeans, S., Wan, Y., Wang, L., Ding, W., Billah, M., McClanahan, T., Coffman, R. L., Egan, R., and Umland, S. (2002) Microarray profile of differentially expressed genes in a monkey model of allergic asthma. *Genome Biology* 3(5):20-22

7 LEBENS LAUF

Name: Barbara Everding
 Geburtsdatum: 20.02.1980
 Geburtsort: Münster (Westf.)
 Eltern: Hildegard Everding geb. Heemann, Dr. Joachim Everding

Schulbildung:

1986-1990: Annette-von-Droste-Hülshoff-Grundschule Nienberge
 1990-1999: Schillergymnasium Münster
 Mai 1999: Abitur am Schillergymnasium Münster

1999-2000: Europäischer Freiwilligendienst in „La Pommeraië“, Heim für Erwachsene mit geistiger Behinderung, Ellignies-Ste-Anne, Belgien

Studium:

Okt. 2000: Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Ruprecht-Karls-Universität, Heidelberg

Feb./März 2001: Pflegepraktikum am Clemenshospital Münster

Sept. 2002: Ärztliche Vorprüfung in Heidelberg

Seit Okt. 2002: Studium an der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg

März 2003: Famulatur in der Abteilung Innere Medizin, Betriebskrankenhaus Hall in Tirol

Sept. 2003: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Okt. 2003: Beginn der Dissertation im Labor der Abteilung Pneumologie der Uniklinik Freiburg bei PD Dr. Gernot Zissel

Sept. 2004: Famulatur in der Pneumologischen Ambulanz der Uniklinik Freiburg

März 2005: Famulatur in der Unfallchirurgie, Allgemeines Krankenhaus Wandsbek, Hamburg

8 DANKSAGUNG

Zunächst danke ich meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Gernot Zissel für die Überlassung des aktuellen Themas, die Flexibilität und schnelle Korrektur sowie seine phänomenale Geduld und Freundlichkeit.

Herrn PD Dr. Stefan Martin danke ich für die schnelle Bereitschaft, meine Arbeit als Zweitgutachter zu korrigieren.

Einen besonderen Dank schulde ich Frau Dr. Antje Prasse für die Betreuung meiner Arbeit, die Hilfe beim experimentellen Teil und die große Unterstützung bei der Erstellung des Manuskripts.

Ausdrücklich möchte ich mich bei Frau CTA Sofia Kamenker für die selbstlose Hilfe bei vielen Problemen und ihre herzliche und mitfühlende Art bedanken.

Auch soll an dieser Stelle den TAs Stefanie Hahn und Sieglinde Bock für die Unterstützung bei der experimentellen Arbeit, speziell Frau Stefanie Hahn für die Bestimmung der IgE-Spiegel, gedankt sein.

Den anderen Doktoranden und Diplomanden, Dawn, Nadia, Jasmin, Daniel, Tobias, Florian, Hans, Kathrin, Verena, Nathalie, Christine, Christina, Miriam und Katrin danke ich für die freundschaftliche Atmosphäre im Labor, die selbstverständliche gegenseitige Hilfe und guten Ratschläge und nicht zuletzt für die bereitwilligen Blutspenden! Insbesondere will ich mich bei meinem guten Freund und Mitdoktoranden Jan bedanken, ohne dessen Beistand ich wohl so manches Mal verzweifelt und ohne dessen Hilfe diese Arbeit so nicht zustande gekommen wäre.

Ganz herzlich sei der Familie Bisping für das Interesse an meiner Arbeit und die aufmunternden Worte gedankt.

Bei meinen Eltern und Geschwistern möchte ich mich ganz besonders bedanken für die Unterstützung meines Studiums und ihre liebevollen Ermutigungen und Bestärkungen, auf dem richtigen Weg zu sein.

Zum Schluss möchte ich mich bei meinem lieben Freund Volker bedanken. Obwohl selbst im Examensstress, war er doch immer für mich da und half mir mit seiner Anteilnahme, seinem Verständnis und seinen Aufmunterungen auch über die schwierigen Phasen dieser Arbeit hinweg.