

Aus der
Universitätsklinik für Zahn-, Mund- und Kieferheilkunde Tübingen
Abteilung Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und
Gesichtschirurgie

**Einfluss von Kieferperiostzellen auf die Reifung von
dendritischen Zellen**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

vorgelegt von

Leitenberger, geb. Rottau, Daniela Carmen

2021

Dekan: Professor Dr. B. Pichler

1. Berichterstatter: Professor Dr. Dr. S. Reinert

2. Berichterstatter: Professor Dr. A. Nüssler

Tag der Disputation: 19.04.2021

Für meine Eltern

Inhalt

Abkürzungsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	6
Tabellenverzeichnis	9
1 Einleitung	13
1.1 <i>Das Immunsystem</i>	13
1.1.1 Angeborenes Immunsystem.....	15
1.1.2 Adaptives Immunsystem	21
1.1.3 Antigenpräsentierende Zellen: die dendritische Zelle	23
1.2 <i>Graft-versus-Host-Disease</i>	26
1.2.1 Autoimmunität und Selbsttoleranz.....	26
1.2.2 Pathophysiologie der Graft-versus-Host-Disease (GvHD).....	27
1.3 <i>Mesenchymale Stammzellen</i>	28
1.3.1 Eigenschaften von Mesenchymalen Stammzellen.....	28
1.3.2 Immunmodulatorische Funktion von MSCs	29
1.3.3 MSCs und dendritische Zellen	31
1.3.4 Die Kieferperiozelle als Mesenchymale Stammzelle.....	32
1.3.5 Klinische Anwendung von MSCs bzw. JPCs	33
1.4 <i>Zielsetzung der Arbeit</i>	34
2 Material und Methoden	36
2.1 <i>Laborartikel</i>	36
2.1.1 Verbrauchsmaterialien: Puffer, Lösungen und Medien	36
2.1.2 Geräte.....	36
2.1.3 Material für Zellkulturen	36
2.1.4 Reagenziensätze.....	37
2.1.5 Zytokine und Chemokine.....	37
2.1.6 Antikörper	37
2.2 <i>Analyseverfahren</i>	38
2.2.1 Durchflusszytometrie	38
2.2.2 Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)	39
2.2.3 Zellkultur und osteogene Induktion	40
2.2.4 Färbung mit Alizarin.....	41

2.2.5	Färbung der Alkalischen Phosphatase.....	41
2.2.6	ELISA aus den Überständen der Zellkultur zur osteogenen Induktion	42
2.3	<i>Differenzierung von dendritischen Zellen aus peripheren mononukleären Blutzellen</i>	43
2.3.1	Isolation der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs)	43
2.3.2	FACS Analyse der ersten 6-Well-Platte	44
2.3.3	Differenzierung der PBMCs zu Dendritischen Zellen.....	46
2.3.4	FACS Analyse	46
2.4	<i>Kokulturen</i>	47
2.4.1	Herstellen von Überständen für die Kokultur-Versuche	47
2.4.2	Transwell-Platten: Aufbau der Kokultur.....	48
2.4.3	Aussähen der Zellen in die Transwell-Platten	48
2.4.4	Differenzierung der Zellen in der Transwell-Platte	51
2.4.5	FACS Analyse der zu differenzierenden Zellen	52
2.5	<i>ELISA aus den Überständen der Kokulturen</i>	52
2.5.1	ELISA: IL-12	52
2.5.2	ELISA IL-6 und ELISA TNF- α	55
3	Ergebnisse	56
3.1	<i>Nachweis von Kieferperiostzellen</i>	56
3.1.1	Alizarinfärbung zum Nachweis von Kalziumpräzipitaten im Knochengewebe	56
3.1.2	Alkalische Phosphatase - Färbung zum Nachweis von Knochensubstanz	57
3.1.3	Nachweis der PGE ₂ und IDO Konzentration in den Überständen der Zellkultur	59
3.2	<i>Nachweis von dendritischen Zellen</i>	62
3.3	<i>Einfluss von Kieferperiostzellen auf die Ausreifung von dendritischen Zellen</i>	75
3.3.1	Monokultur mit 1 Million bzw. 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium.....	76
3.3.2	Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs	78
3.3.3	Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und den Überständen	91
3.3.4	Vergleich der Kulturen mit 4 Millionen PBMCs	92
3.3.5	Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs	93
3.3.6	Kokultur mit 1 Million PBMCs und den Überständen	97
3.3.7	Vergleich der Kulturen mit 1 Million PBMCs.....	98
3.3.8	Vergleich der Kokulturen mit JPCs und PBMCs in unterschiedlicher Zelldichte.	98
3.3.9	Vergleich der Kokulturen mit den Versuchen zum Nachweis dendritischer Zellen	99
3.4	<i>Zytokin-Konzentrationen in den Überständen der Kokulturen</i>	103
4	Diskussion	109

4.1	<i>Osteogene Induktion der Kieferperiostrazellen</i>	109
4.2	<i>Verifizierung des Differenzierungsprotokolls zur dendritischen Zellreifung</i>	110
4.3	<i>Nachweis der PGE₂ undIDO Konzentration in den Überständen von Kieferperiostrazellen</i>	112
4.4	<i>Einfluss von Kieferperiostrazellen auf die dendritische Zellreifung</i>	113
4.4.1	Monokultur mit JPCs und DMEM Medium	113
4.4.2	Kokulturen aus PBMCs und JPCs.....	114
4.4.3	Kokulturen aus PBMCs und Überständen.....	117
4.5	<i>Nachweis von proinflammatorischen Zytokinen aus den Überständen der Kokulturen</i> 118	
5	Zusammenfassung	122
6	Literaturverzeichnis	124
7	Erklärung zum Eigenanteil	136
8	Veröffentlichungen	137
	Danksagung	138

Abkürzungsverzeichnis

APC	<i>Antigen presenting cell, Antigenpräsentierende Zellen</i>
BCR	<i>B-Zell-Rezeptor</i>
CD	<i>Cluster of Differentiation, Cluster of differentiation</i>
CXCL	<i>CXC-Motiv-Chemokin</i>
DC	<i>Dendritische Zelle</i>
DC1	<i>konventionelle dendritische Zelle</i>
DC2	<i>Plasmacytoide dendritische Zelle</i>
DMEM	<i>Dulbecco`s Modified Eagle Medium</i>
EIA	<i>Enzymimmunoassay</i>
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated Cell Sorting bzw. Scanning</i>
FCS	<i>Fetal calf serum</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GM-CSF	<i>Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor</i>
GVHD	<i>Graft-versus-Host-disease</i>
HGF- β	<i>Human growth factor</i>
HLA	<i>Human leucocyte antigen</i>
IDO	<i>Indolamin-2,3-Dioxygenase</i>
IFN- α	<i>Interferon-α</i>
IL	<i>Interleukin</i>
INF- γ	<i>Interferon-γ</i>
JPC	<i>Jaw periosteal cell</i>
LPS	<i>Lipopolysaccharid</i>
MALT	<i>Mucoassoziiertes lymphatisches Gewebe</i>
MBL	<i>mannosebindendes Lektin</i>
M-CSF	<i>Makrophage-stimulierender Faktor</i>
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i>
MPS	<i>Mononukleäres Phagozytose-System</i>
MSC	<i>Mesenchymale Stammzelle</i>
NK	<i>Natürliche Killerzellen</i>
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cell</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PGE ₂	<i>Prostaglandin E2</i>
T _c	<i>Zytotoxische T-Zelle</i>
TCR	<i>T-Zell-Rezeptor</i>
TGF- β	<i>Transforming growth factor</i>
TH ₁ -Zelle	<i>Typ1-T-Helferzelle</i>

TLR *Toll-Like-Rezeptoren*

TNF- α *Tumornekrosefaktor- α*

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Übersicht über den Einfluss der MSC auf die Zytokinausschüttung.	31
Abbildung 2: Falcon mit Ficoll und PBS-Blut-Gemisch.	43
Abbildung 3: Falcon mit Schichtung nach der Zentrifugation.	44
Abbildung 4: Aufbau einer Transwell Platte.	47
Abbildung 5: Transwell Platte ohne Insert: nur das untere Kompartiment mit der unterschiedlichen Anzahl an PBMCs.	49
Abbildung 6: Transwell Platte im Kokultur-Versuch: Platte 1 mit jeweils 20.000 JPCs im oberen Kompartiment / Insert.	50
Abbildung 7: Transwell Platte im Kokultur-Versuch: Platte 2 mit den zuvor hergestellten Überständen im oberen Kompartiment / Insert.	50
Abbildung 8: Transwell Platte im Monokultur-Versuch: Platte 3 als Kontrolle mit DMEM Medium im oberen Kompartiment / Insert.	51
Abbildung 9: Repräsentatives Bild einer Alizarinfärbung von Kieferperiostzellen nach osteogener Induktion: Tag 41.	56
Abbildung 10: Repräsentatives Bild einer Alizarinfärbung von Kieferperiostzellen ohne osteogene Induktion: Tag 41.	57
Abbildung 11: Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase in osteogen induzierten Kieferperiostzellen an Tag 21 (repräsentatives Bild).	58
Abbildung 12: Nachweis der alkalischen Phosphatase in Kieferperiostzellen ohne osteogene Induktion an Tag 21 (repräsentatives Bild).	59
Abbildung 13: Ermittlung der Konzentration von PGE ₂ in pg/ml: Mittelwerte aus allen vier JPC-Proben. Aufgrund der sehr hohen Standardabweichung wurde diese nicht ins Diagramm eingefügt.	60
Abbildung 14: Ermittlung der IDO Konzentration in pg/ml: die Mittelwerte sowie die Standardabweichung aus allen vier JPC-Proben sind im Diagramm abgebildet.	61
Abbildung 15: Dot Plot undifferenzierter Blutmonozyten, Blutprobe 1, Platte 1.	64
Abbildung 16: Repräsentatives Histogramm der CD80 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 1 (vor DC Differenzierung).	65
Abbildung 17: Repräsentatives Histogramm der CD80 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 2 (nach DC Differenzierung).	65
Abbildung 18: Repräsentatives Histogramm der CD83 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 1 (vor DC Differenzierung).	66
Abbildung 19: Repräsentatives Histogramm der CD83 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 3 (nach DC Differenzierung mit LPS).	67
Abbildung 20: Repräsentatives Histogramm der CD86 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 1 (vor DC Differenzierung).	68

Abbildung 21: Repräsentatives Histogramm der CD86 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 1 (nach DC Differenzierung). Zwei Populationen, die sich hinsichtlich der CD86 Expression deutlich voneinander unterscheiden, sind sichtbar.	68
Abbildung 22: Repräsentatives Histogramm der HLA-I Oberflächenexpression in Blutprobe 2, Platte 1 (vor DC Differenzierung).	69
Abbildung 23: Repräsentatives Histogramm der HLA-I Oberflächenexpression in Blutprobe 2, Platte 2 (nach DC Differenzierung).	69
Abbildung 24: Repräsentatives Histogramm der HLA-DR Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 1 (vor DC Differenzierung).	70
Abbildung 25: Repräsentatives Histogramm der HLA-DR Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 3 (nach DC Differenzierung).	71
Abbildung 26: Repräsentatives Histogramm der CD14 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 1 (vor DC Differenzierung).	72
Abbildung 27: Repräsentatives Histogramm der CD14 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 2 (nach DC Differenzierung).	72
Abbildung 28: Repräsentatives Histogramm der CCR7 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 1 (vor DC Differenzierung).	74
Abbildung 29: Repräsentatives Histogramm der CCR7 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 2 (nach DC Differenzierung).	74
Abbildung 30: Dot Plot: Kokultur: 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs - CD80 Patient 3, Versuch 2.	80
Abbildung 31: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs - Histogramm der CD80 Expression in Zellen von Patient 3 im zweiten Versuch.	81
Abbildung 32: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM - Histogramm der CD80 Expression in Zellen von Patient 3 im zweiten Versuch.	81
Abbildung 33: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Histogramm der Oberflächenexpression von CD83 bei Patient 3 im zweiten Versuch.	83
Abbildung 34: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Histogramm der Oberflächenexpression von CD83 bei Patient 3 im zweiten Versuch.	83
Abbildung 35: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Histogramm der Oberflächenexpression von HLA-I bei Patient 1 im zweiten Versuch.	85
Abbildung 36: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Histogramm der Oberflächenexpression von HLA-I bei Patient 1 im ersten Versuch.	86
Abbildung 37: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Histogramm der Oberflächenexpression von HLA-DR bei Patient 1 im ersten Versuch.	87
Abbildung 38: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Histogramm der Oberflächenexpression von HLA-DR bei Patient 1 im ersten Versuch.	87

Abbildung 39: Monokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium: Histogramm der Oberflächenexpression von CD80 bei Patient 2 im zweiten Versuch.	95
Abbildung 40: Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs: Histogramm der Oberflächenexpression von CD80 bei Patient 2 im zweiten Versuch.	95
Abbildung 41: Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs: Histogramm der Oberflächenexpression des DC Signs bei Patient 1 im ersten Versuch.	96
Abbildung 42: Monokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium: Histogramm der Oberflächenexpression des DC Signs bei Patient 1 im ersten Versuch.	97
Abbildung 43: Balkendiagramm zur Konzentration von IL-12 an den verschiedenen Tagen und abhängig vom Aufbau der Kultur.	104
Abbildung 44: Balkendiagramm zur Konzentration von IL-12 an den verschiedenen Tagen und abhängig vom Aufbau der Kultur.	105
Abbildung 45: Balkendiagramm zur Konzentration von IL-6 an den verschiedenen Tagen und abhängig vom Aufbau der Kultur.	106
Abbildung 46: Balkendiagramm zur Konzentration von IL-6 an den verschiedenen Tagen und abhängig vom Aufbau der Kultur.	107
Abbildung 47: Balkendiagramm zur Konzentration von TNF-α an den verschiedenen Tagen und abhängig vom Aufbau der Kokultur.	108
Abbildung 48: Balkendiagramm zur Konzentration von TNF-α an den verschiedenen Tagen und abhängig vom Aufbau der Kokultur.	108

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antikörpertyp und die Spezifität der verwendeten Antikörper.....	45
Tabelle 2: Antikörpertyp und die Spezifität der verwendeten Antikörper.....	52
Tabelle 3: Standard-Verdünnungsreihe für den IL-12 ELISA.	54
Tabelle 4: Konzentration von PGE ₂ in pg/ml: Mittelwerte aus drei Versuchsreihen mit je vier Proben.	60
Tabelle 5: Konzentration von IDO in pg/ml: Mittelwerte aus drei Versuchsreihen mit je vier Proben.	62
Tabelle 6: Durchflusszytometrisch ermittelter Anteil an positiven Zellen (Mittelwert in %) für die aufgeführten Oberflächenmarker. Erste Platte: Messung vor der dendritischen Zelldifferenzierung. Zweite Platte: Messung nach der DC Differenzierung mit dem zweiten Zytokincocktail. Dritte Platte: Messung nach der DC-Differenzierung mit LPS.	63
Tabelle 7: Anteil CD80-positiver Zellen (in %) am Beispiel von Blutprobe 1 vor und nach der DC- Differenzierung mittels Zytokincocktail oder LPS.	64
Tabelle 8: Anteil CD83-positiver Zellen (in %) am Beispiel von Blutprobe 1 vor und nach der DC- Differenzierung mittels Zytokincocktail oder LPS.	66
Tabelle 9: Anteil CD86-positiver Zellen (in %) am Beispiel von Blutprobe 1 vor und nach der DC- Differenzierung mittels Zytokincocktail oder LPS.	68
Tabelle 10: Anteil HLA-DR-positiver Zellen (in %) am Beispiel von Blutprobe 1 vor und nach der DC- Differenzierung mittels Zytokincocktail oder LPS.	70
Tabelle 11: Anteil CD14-positiver Zellen (in %) am Beispiel von Blutprobe 1 vor und nach der DC- Differenzierung mittels Zytokincocktail oder LPS.	72
Tabelle 12: Anteil CCR7-positiver Zellen (in %) am Beispiel von Blutprobe 3 vor und nach der DC- Differenzierung mittels Zytokincocktail oder LPS.	73
Tabelle 13: Anteil CD3-positiver Zellen (in %) vor und nach der DC-Differenzierung mittels Zytokincocktail oder LPS.	75
Tabelle 14: Mittelwerte der einzelnen Prozentzahlen an positiven Zellen (aus drei Donoren) für die aufgelisteten Oberflächenmarker. Versuchsaufbau: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium.	76
Tabelle 15: Mittelwerte der einzelnen Prozentzahlen an positiven Zellen (aus zwei Donoren) für die aufgelisteten Oberflächenmarker. Versuchsaufbau: Kokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium.	76
Tabelle 16: Mittelwerte der Monokulturen von 4 bzw. 1 Million PBMCs im unteren Kompartiment und DMEM im oberen Kompartiment. Die positiven Zellen sind in % angegeben.....	77
Tabelle 17: Mittelwerte der Oberflächenexpression von CD80 in Zellen aus allen Patienten in %.	77
Tabelle 18: Mittelwerte der Oberflächenexpression von CD83 in Zellen von allen Patienten in %.	78

Tabelle 19: Mittelwerte der einzelnen Prozentzahlen an positiven Zellen (aus drei Donoren) für die aufgelisteten Oberflächenmarker. Versuchsaufbau: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 Kieferperiozstellen.....	78
Tabelle 20: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs mit 20.000 JPCs und der Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM-Medium.	78
Tabelle 21: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: CD80 Expression in dendritischen Zellen von Patient 3 in %.....	79
Tabelle 22: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von CD80 in %.....	79
Tabelle 23: Kokultur mit 4 Millionen und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CD80 in %.....	79
Tabelle 24: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CD83 in %.....	82
Tabelle 25: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von CD83 in %.....	82
Tabelle 26: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CD86 in %.....	84
Tabelle 27: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von CD86 in %.....	84
Tabelle 28: Mittelwert der CD86 Expression (in%) in Zellen von Patient 3.	84
Tabelle 29: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von HLA-I in %.....	85
Tabelle 30: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von HLA-I in %.....	85
Tabelle 31: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von HLA-DR in %.....	86
Tabelle 32: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von HLA-DR in %.....	87
Tabelle 33: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CD14 in Zellen von Patient 1 in %.....	88
Tabelle 34: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CD14 in %.....	88
Tabelle 35: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von CD14 in %.....	88
Tabelle 36: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CCR7 in %.....	89
Tabelle 37: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von CCR7 in %.....	89
Tabelle 38: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression des DC Signs in %.....	90
Tabelle 39: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression des DC Signs in %.....	90

Tabelle 40: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CD3 in % .	90
Tabelle 41: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von CD3 in %.....	91
Tabelle 42: Mittelwerte der einzelnen Prozentzahlen an positiven Zellen (aus drei Donoren) für die aufgelisteten Oberflächenmarker. Versuchsaufbau: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und Überständen.....	91
Tabelle 43: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und den Überständen sowie aus der Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM.	91
Tabelle 44: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus der Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium, aus der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs sowie aus der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und den Überständen.....	92
Tabelle 45: Gemittelte Prozentzahlen der Markerexpression in Zellen von zwei Patienten aus drei Versuchsdurchgängen. Versuchsaufbau: Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 Kieferperiozstzellen.....	93
Tabelle 46: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus der Monokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium und aus der Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs.	93
Tabelle 47: Monokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM: Oberflächenexpression von CD80 in Zellen von Patient 2 in %	94
Tabelle 48: Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CD80 in Zellen von Patient 2 in %	94
Tabelle 49: Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von DC Sign in Zellen von Patient 1 in %.....	96
Tabelle 50: Monokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von DC Sign in Zellen von Patient 1 in %.....	96
Tabelle 51: Gemittelte Prozentzahlen der Markerexpression in Zellen von zwei Patienten aus drei Versuchsdurchgängen, Versuchsaufbau: Kokultur mit 1 Million PBMCs und Überständen.	97
Tabelle 52: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus der Monokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium und aus der Kokultur mit 1 Million PBMCs und den Überständen.	98
Tabelle 53: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus der Monokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium, aus der Kokultur mit 1 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs sowie aus der Kokultur mit 1 Million PBMCs und den Überständen.....	98

Tabelle 54: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs und aus der Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs.	99
Tabelle 55: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus den Versuchen zum Nachweis dendritischer Zellen und der Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs.	100
Tabelle 56: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus den Versuchen zum Nachweis dendritischer Zellen und der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs.	102
Tabelle 57: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus den Versuchen zum Nachweis dendritischer Zellen und der Kokultur mit 1 Million PBMCs und den Überständen.	102
Tabelle 58: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus den Versuchen zum Nachweis dendritischer Zellen und der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und den Überständen.	103
Tabelle 59: Mittelwerte der IL-12 Konzentrationen in pg/ml in der Kokultur bzw. Monokultur mit 1 Million PBMCs.	104
Tabelle 60: Mittelwerte der IL-12 Konzentrationen in pg/ml in der Kokultur bzw. Monokultur mit 4 Millionen PBMCs.	104
Tabelle 61: Mittelwerte der IL-6 Konzentrationen in pg/ml in der Kokultur bzw. Monokultur mit 1 Million PBMCs.	105
Tabelle 62: Mittelwerte der IL-6 Konzentrationen in pg/ml in der Kokultur bzw. Monokultur mit 4 Millionen PBMCs.	106
Tabelle 63: Mittelwerte der TNF-α Konzentrationen in pg/ml in der Kokultur bzw. Monokultur mit 1 Million PBMCs.	107
Tabelle 64: Mittelwerte der TNF-α Konzentrationen in pg/ml in der Kokultur bzw. Monokultur mit 4 Millionen PBMCs.	108

1 Einleitung

Nachfolgend gehe ich auf die wichtigsten Mechanismen des Immunsystems ein, sowie die Rolle der dendritischen Zelle im Immunsystem. Außerdem werde ich die Eigenschaften von mesenchymalen Stammzellen und Kieferperiostzellen zusammenfassen und auf mögliche klinische Anwendungen eingehen.

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem eines jeden Organismus spielt bei der Abwehr von potentiell schädigenden Stoffen und Mikroorganismen eine essentielle Rolle.

Aufgabe des Immunsystems ist es, den Körper wirksam vor Erregern, die von außen eindringen (z.B. Bakterien) sowie vor Angriffen aus dem Inneren des Körpers (z.B. entartete Zellen), zu schützen (1) (2). Weitere wichtige Aufgaben des Immunsystems sind die Differenzierung zwischen fremdem und eigenem Gewebe, aber auch die Fähigkeit, einen bereits bekannten Erreger bzw. ein Antigen bei einer erneuten Auseinandersetzung schneller wiederzuerkennen, um dementsprechend schneller darauf zu reagieren (3).

Es wird zwischen dem angeborenen und dem adaptiven Immunsystem unterschieden. Beide bestehen aus humoralen und zellulären Anteilen. Für eine effektive Abwehr von Angriffen ist ein gutes Zusammenspiel der beiden genannten Systeme notwendig.

Bestandteile des Immunsystems: Zellen

Das Blut des menschlichen Körpers besteht aus drei wichtigen Zellpopulationen: den Erythrozyten, den Thrombozyten und den Leukozyten. Letztere sind für die Immunabwehr zuständig. Die Leukozyten lassen sich wiederum in folgende Untergruppen einteilen (2) (4).

Angeborene Immunabwehr:

- Granulozyten: manche Granulozyten können Granula freisetzen, die Erreger abtöten oder aufnehmen, ähnlich wie auch Makrophagen.

- Zellen des mononukleären Phagozytose-Systems (MPS): Monozyten, Makrophagen und ihre Vorläuferzellen: Aufnehmen und Abtöten der Erreger (5).
- Natürliche Killerzellen (NK-Zellen): töten virusinfizierte Zellen oder auch Krebszellen ab (6).
- Dendritische Zellen: werden als Antigen-präsentierende Zellen (APC) bezeichnet, weil sie nach Phagozytose Bakterien-Antigene auf ihrer Oberfläche den T-Zellen präsentieren (T steht für Thymus, Ort der Differenzierung) (2).

Adaptive / erworbene Immunabwehr:

- T-Zellen: diese Zellen können die Wirkung anderer Zellpopulationen verstärken oder infizierte Zellen abtöten; man unterscheidet hier hauptsächlich zwischen Helfer und Effektor T-Zellen.
- B-Lymphozyten: produzieren Antikörper (B steht für „bone marrow“, Ort der Entstehung).
- Antigenpräsentierende Zellen, unter anderem auch dendritische Zellen (DC) (2).

Bestandteile des Immunsystems: Humorale (lösliche) Bestandteile

Das sogenannte Komplementsystem ist ein System aus verschiedensten Enzymen, das bei der angeborenen und adaptiven Immunantwort beteiligt ist. Weitere Proteine, die sogenannten Zytokine und Chemokine, sind für die Kommunikation zwischen angeborener und adaptiver Abwehr zuständig. Insbesondere die angeborene Immunantwort hat als zusätzliche Verstärkung Akute-Phase-Proteine, welche für die Opsonierung (Markierung von körperfremden Zellen, um diese für Fresszellen sichtbar zu machen) zuständig sind und damit zu einer verbesserten Immunantwort führen. Die B-Lymphozyten produzieren wie oben genannt Antikörper, die Antigene binden und diese unschädlich machen.

Zusammenfassend hat das Immunsystem vier Aufgaben:

- Der Organismus muss erkennen, dass eine Infektion in ihm abläuft.
- Diese sollte unterdrückt bzw. abgewehrt werden.
- Trotz der Aktivität des Immunsystems sollte die Immunreaktion reguliert werden, um eine überschießende und damit den Organismus schädigende Reaktion zu verhindern.
- Entwicklung eines immunologischen Gedächtnisses, um bei einem erneuten Auftreten einer Erkrankung schneller und effektiver reagieren zu können (1).

Sobald pathogene Mikroorganismen in den Körper eindringen, wird innerhalb von Minuten die angeborene Immunabwehr in Gang gesetzt. Dies verhindert, dass ständig eine Vielzahl von Krankheitserregern in unserem Körper aktiv wird. Da Mikroorganismen sich aber durchaus über diese erste Abwehr hinwegsetzen können, werden die Aktivierung des adaptiven Immunsystems und das anschließende gemeinsame Zusammenspiel der beiden Anteile notwendig (7).

Stoffe, die eine Immunreaktion auslösen können, werden als Antigene bezeichnet. Diese Antigene binden spezifisch an einen Antikörper und können dadurch die Bildung weiterer Antikörper auslösen. Ist dies der Fall, werden sie als Immunogene bezeichnet (8). Der Organismus muss Antigene, die auf unterschiedliche Arten in den Organismus gelangen, erkennen und eliminieren. Darüber hinaus ist es essentiell, dass die Immunreaktion nach Abtötung des Antigens nicht weiter aktiv ist und sich nicht gegen den eigenen Körper bzw. gegen das eigene Gewebe richtet. Um dies alles zu gewährleisten, gibt es verschiedene Untersysteme, die in einem komplexen Zusammenspiel eine Immunreaktion hervorrufen und die Aktivität kontrollieren.

1.1.1 Angeborenes Immunsystem

Die Grundlage des angeborenen Immunsystems ist die Erkennung von weit verbreiteten und allgemein vorkommenden Merkmalen von Pathogenen (9), welche im Genom verankert sind. Die Reaktion des angeborenen Immunsystems erfolgt schnell und bietet einen ersten Schutz gegen die Entstehung eines Infektionsherds (2).

Die wichtigsten Bestandteile des angeborenen Immunsystems sind, neben mechanischen Barrieren, die zelluläre Abwehr sowie die humorale Abwehr.

Mechanische Barrieren sind zusammengefasst alle inneren und äußeren Epithelien des menschlichen Körpers, insbesondere das Epithel der Haut und die Schleimhäute des Gastrointestinaltraktes, des Urogenitaltraktes und des Atemtraktes, die eine Trennschicht zwischen der Umgebung und dem Körperinneren schaffen (9).

Zelluläre Abwehr

Mikroorganismen, welche die mechanische Barriere überwinden, setzen die Mechanismen der angeborenen Immunabwehr in Gang. Zunächst wird der eingedrungene Erreger durch Phagozyten erkannt und aufgenommen (10). Zu den Phagozyten zählen z.B. Makrophagen, die als Monozyten im Blut zirkulieren und im Gewebe zu Makrophagen oder dendritischen Zellen heranreifen, und neutrophile Granulozyten, die im Blut aber nicht im Gewebe auftreten. Ob im Gewebe aus den Monozyten eine Makrophage oder eine dendritische Zelle heranreift, hängt von den vorliegenden Signalen der Umgebung ab. Das Zytokin Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF) zusammen mit Interleukin-4 (IL-4) leitet die Ausreifung einer dendritischen Zelle ein (9) (11) (12). Das Zytokin Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (M-CSF) ist für die Differenzierung zu Makrophagen verantwortlich (9).

Phagozyten besitzen verschiedenste Rezeptoren u.a. zur Erkennung von Zellwandbestandteilen verschiedener Bakterien. Beispiele hierfür sind der Mannoserezeptor (13) oder der Scavenger-Rezeptor (9). Durch die Bindung des Pathogens wird der Erreger phagozytiert und abgetötet. Die Makrophagen werden durch die Bindung des Pathogens außerdem aktiviert und setzen verschiedene Stoffe frei. Hierzu gehören unter anderem Chemokine und Zytokine, die zu einer lokalen Entzündungsreaktion führen und neutrophile Granulozyten an den Ort des Geschehens bringen (9). Wenn eine dendritische Zelle, welche bereits vor ihrer vollständigen Ausreifung über das Blut ins

Gewebe gelangt ist, auf ein Pathogen trifft, wird dieses ebenfalls aufgenommen und abgetötet (14).

Dendritische Zellen und Makrophagen gehören außerdem wie auch die B-Zellen zu den Antigen-präsentierenden Zellen. Als Antigenpräsentation bezeichnet man das Präsentieren von Bruchstücken des Antigens auf der Oberfläche der Zelle. Dies geschieht zusammen mit den MHC-II-Molekülen (major histocompatibility complex, s.u.), die sich auf der Zell-Oberfläche befinden. Neutrophile Granulozyten sind wiederum nicht in der Lage Antigene an ihrer Oberfläche zu präsentieren (4). Die dendritische Zelle hat jedoch die Fähigkeit, nachdem sie einen Erreger phagozytiert hat, Teile des Erregers sowie co-stimulierende Faktoren an ihrer Oberfläche zu präsentieren. Sie transportiert diese zu den peripheren sekundär lymphatischen Organen, um dort mit den T-Lymphozyten reagieren zu können. Dies führt dazu, dass T-Lymphozyten als Teil der adaptiven Immunantwort aktiviert werden, sich vermehren und weiter differenzieren (14). Außerdem setzen dendritische Zellen Zytokine frei, die die weitere Immunantwort entscheidend beeinflussen und sind damit an der Einleitung der adaptiven Immunabwehr beteiligt (9) (14). In Kapitel 1.1.3 werden die dendritische Zelle und ihre Rolle im Immunsystem näher erläutert.

Aktivierungswege und Rezeptoren der zellulären Immunabwehr

Die Zellwände von Bakterien tragen, je nachdem ob sie grampositiv oder gramnegativ sind, bestimmte sich immer wiederholende Strukturen, die vom angeborenen Immunsystem als solche erkannt werden (9). Dies ist eine wichtige Grundlage zur Unterscheidung von körpereigenen und körperfremd. So bildet z.B. das mannosebindende Lektin (MBL), das als freies Protein im Plasma vorkommt, einen Komplex mit Mikroorganismen, die an ihrer Oberfläche Mannose- und Fructosereste in einem bestimmten Abstand voneinander aufweisen, wie er nur bei Mikroorganismen und nicht bei körpereigenen Strukturen auftaucht. MBL bindet mit hoher Affinität an diese Zuckerreste (9) (15). Nach der Bildung des Komplexes wird dieser von Phagozyten aufgenommen und innerhalb der Phagozyten fragmentiert.

Anschließend werden Fragmente an der Zelloberfläche präsentiert, um die weiteren Vorgänge, wie oben beschrieben, in Gang zu setzen.

Eine weitere wichtige Rezeptorfamilie ist die der Toll-like Rezeptoren (TLR). Der Toll-Rezeptor wurde bei der Taufliege *Drosophila melanogaster* zum ersten Mal entdeckt (16). Ähnliche Rezeptoren kommen bei Pflanzen, Insekten und Säugetieren vor und werden dann Toll-ähnliche bzw. Toll-like Rezeptoren (TLR) genannt. Beim Menschen gibt es zehn verschiedene TL Rezeptoren, die molekulare Strukturen, wie sie bei pathogenen Mikroorganismen vorkommen, erkennen (9) (17).

Der TLR-4 auf den Makrophagen, der mit CD14 (Cluster of differentiation, s.u.) assoziiert ist, erkennt beispielsweise das Lipopolysaccharid (LPS), ein Bestandteil der Zellwand von gramnegativen Bakterien (18). Dies hat verschiedene Reaktionen zur Folge, u.a. wird die Ausschüttung des pro-inflammatorischen Zytokins Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) induziert, das bei einer systemischen (ganzheitlichen) Infektion und der darauffolgenden systemischen Ausschüttung zum septischen Schock führen kann, wenn die Reaktion überschießt und nicht reguliert wird (9) (19).

Die Signalwege der TLR führen wie bereits beschrieben einerseits zur Ausschüttung von Chemokinen und Zytokinen und andererseits zur Expression von co-stimulierenden Faktoren an der Zelloberfläche (9). Diese co-stimulierenden Moleküle, CD80 und CD83, werden von Makrophagen und dendritischen Zellen nach erfolgter TLR-Reaktion exprimiert. Sie setzen, zusammen mit weiteren Antigenpeptiden, die anhand MHC Klasse II Molekülen auf den APCs präsentiert werden, die adaptive Immunantwort durch Aktivierung der Helfer (CD4+) T-Zellen in Gang. Weitere Zytokine sorgen dafür, dass z.B. die dendritische Zelle in die Lymphknoten wandert, um dort den Kontakt zur T-Zelle herzustellen. (20)

Bei den MHC-Molekülen auf der Oberfläche einer Zelle handelt es sich um Glykoproteine, die eine essentielle Rolle bei der Immunerkennung und bei der Verträglichkeit von Geweben oder Transplantationen spielen. Sie werden auch als „human leucocyte antigens“ (HLA) bezeichnet, da sie zunächst auf

Leukozyten identifiziert wurden. Es gibt verschiedene Subtypen der MHC Proteine. MHC-I wird auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert, währenddessen MHC-II Moleküle auf B-Lymphozyten und den APCs vorhanden sind (2) (21).

Nachfolgend werden die B- und T-Zellen bei der adaptiven Immunabwehr näher erläutert.

Humorale Abwehr

Das Komplementsystem besteht aus einer Gruppe von Proteinen, die entweder direkt durch Erreger oder durch Komplexe von Pathogenen und Antikörpern aktiviert werden können (22). Die wichtigste Aufgabe des Komplementsystems ist es, einen Komplex von Antikörpern bzw. Proteinen und Erregern im Blut zu bilden, so dass dieser von Granulozyten oder den Zellen des MPS erkannt und zerstört werden kann (4). Die Aktivierung des Komplementsystems folgt einer sogenannten „triggered-enzyme-cascade“ Reaktion (9). Ein Enzym des Komplementsystems, welches selbst durch Spaltung aktiviert wurde, spaltet und aktiviert wiederum ein weiteres Enzym. So werden mit jedem Schritt weitere Enzyme und somit eine Kaskade ausgelöst (9).

Das Komplementsystem kann über verschiedene Wege aktiviert werden. Der klassische Weg führt zur Bildung eines Antigen-Antikörper-Komplexes (9). Beim Lektin-Weg bindet das oben beschriebene MBL an die Kohlenhydratreste der Oberfläche von Bakterien. Der alternative Weg, eine Art Verstärkungsmechanismus der beiden anderen Wege, wird durch die Anheftung des Proteins C3 an die Bakterienoberfläche in Gang gesetzt (9). Alle drei Wege führen zu der Bildung der Protease C3. Diese setzt eine Kaskade in Gang, die die Ausschüttung einer Vielzahl weiterer Komplementeffektorproteine zur Folge hat (9). Diese Proteine haben drei wichtige Aufgaben. Zunächst können aktivierte Proteine an Erreger binden und sie somit für die Phagozytose durch andere Zellen bereit machen, die sogenannte Opsonierung. Kleinere Proteine des Komplementsystems locken weitere Phagozyten an und aktivieren diese. Manche Enzyme wirken, indem sie Poren in der Bakterienwand erzeugen und diese somit zerstören (9).

Zytokine und Chemokine

Nach Erkennung eines Pathogens und der Aktivierung der angeborenen Immunantwort werden eine Vielzahl von Zytokinen und Chemokinen wie oben beschrieben freigesetzt, die die weitere Immunantwort über lokale und systemische Effekte beeinflussen. Während Chemokine bei der Migration von Leukozyten eine wichtige Rolle spielen, sind die Zytokine an der Aktivierung vieler verschiedener Zellen und Reaktionswege beteiligt. Zytokine wirken endokrin (Sekretion und Wirkung im Blut), parakrin (Sekretion und Wirkung im Interstitium bzw. in der unmittelbaren Umgebung) oder autokrin (Wirkung auf die eigene Zelle) (22).

Zytokine werden u.a. von Makrophagen oder dendritischen Zellen nach ihrer Aktivierung durch die Phagozytose eines Pathogens sezerniert. Zu den wichtigsten Zytokinen, die von dendritischen Zellen und Makrophagen freigesetzt werden, gehören folgende:

- IL-1: verstärkt die Immunantwort über die Aktivierung der T-Zellen und wirkt außerdem pyrogen (Fieber erzeugend) (23).
- IL-6: verstärkt die Immunantwort über Anregung von Wachstum und Differenzierung von T- und B-Zellen. IL-6 wirkt ebenso wie IL-1 über die Ausschüttung von Akute-Phase-Proteinen pyrogen und sorgt für eine lokale Entzündungsreaktion (23).
- CXCL-8 (IL-8): gehört genau genommen zu den Chemokinen und wirkt chemotaktisch (Chemotaxis bedeutet eine Richtungslenkung von Zellen oder Organismen durch chemische Reize) auf neutrophile Granulozyten (23).
- IL-12: führt zu einer Aktivierung von NK-Zellen und fördert die Differenzierung von Typ1-T-Helferzellen (T_H1 -Zellen). T-Helferzellen sind Subpopulationen von Lymphozyten, die an der Einleitung der Immunantwort beteiligt sind. T_H1 - und T_H2 -Zellen unterscheiden sich in den Oberflächenmolekülen und bezüglich der Sekretion von Zytokinen. Die T_H1 -Zelle sezerniert beispielsweise u.a. Interferon- γ (IFN- γ) (23) (24).
- TNF- α : ist ein pro-inflammatorisches Zytokin und kann, wenn es systemisch wirkt, zum Schock führen (25) (26). TNF- α sorgt dafür dass Flüssigkeit mit

Zellen und Proteinen, die für die Abwehr wichtig sind, an die lokale Entzündungsstelle gelangen können (23). TNF- α kann allerdings ebenso zum programmierten Zelltod führen (Apoptose) (27).

Die oben genannten Zytokine gehören folglich zwar zur angeborenen Immunabwehr, spielen aber eine entscheidende Rolle beim Übergang von angeborener zu adaptiver Immunabwehr. Damit sind die dendritischen Zellen und Makrophagen wichtige Zellen an der Schnittstelle zwischen angeborener und adaptiver Immunabwehr.

1.1.2 Adaptives Immunsystem

Wenn Erreger die angeborene Immunabwehr überwinden, wird die adaptive Immunabwehr in Gang gesetzt.

Diese ist in der Lage, einen bestimmten Erreger zu erkennen und zu einem späteren Zeitpunkt bei einer erneuten Infektion verstärkt und schneller anzugehen (7).

Antigenerkennung und Effektormechanismen der zellulären und humoralen Abwehr

Bei der adaptiven Immunabwehr spielen vor allem die Lymphozyten eine wichtige Rolle (4). T- und B-Zellen haben eine ähnliche Morphologie, aber unterschiedliche Funktionen. Diese Zellen werden als „naiv“ bezeichnet, wenn sie noch keinen Antigenkontakt hatten. Sie sind in der Lage, Gedächtniszellen zu bilden, die zu einer schnelleren und besseren Immunabwehr bei einer erneuten Infektion mit demselben Erreger zu einem späteren Zeitpunkt führen. Die Reifung der T-Zelle findet im Thymus statt, die Reifung der B-Zelle im Knochenmark (4).

T-Zellen besitzen einen T-Zell-Rezeptor (TCR) und lassen sich in CD4+ (Helfer)-Zellen und CD8+ (Effektor) T-Zellen unterteilen. CD4+ T-Zellen tragen auf ihrer Oberfläche ein CD4-Molekül (Cluster of Differentiation). Dies sind Membranproteine, welche wichtig für die Unterscheidung von Zellpopulationen sind. Die Erreger gelangen über Phagozytose während der davor geschalteten

angeborenen Immunantwort in eine Zelle oder es handelt sich um Viren, die in eine Zelle eindringen können, um sich dort zu vermehren (2).

Zur Antigenerkennung benötigen CD4+ T-Zellen ein Bruchstück eines Antigens, das zusammen mit dem MHC-II Rezeptor beispielsweise von einer dendritischen Zelle exprimiert wird. Diese benötigen hierfür außerdem costimulatorische Moleküle wie z.B. CD80 und CD86. Dies führt zu einer Produktion von Zytokinen durch die dendritischen Zellen. Ein Zytokin ist das IL-12, welches wiederum die T-Zellen zur Differenzierung anregt. Nach der Antigenerkennung aktivieren T-Helferzellen ihre eigene Zellteilung, sowie weitere Zellen des adaptiven Immunsystems. Anschließend differenzieren sich die aktivierten T-Zellen zu CD4+ oder CD8+ T-Zellen und produzieren weitere Zytokine bzw. Interleukine (2) (4).

Zu den CD4+-Zellen gehört die T-Helferzellen (T_H), die sich funktionell wieder in weitere Gruppen einteilen lässt (T_{H1} und T_{H2} -Zellen) (2). Die verschiedenen Subpopulationen produzieren unterschiedliche Zytokine, welche die Immunantwort in unterschiedlichen Abschnitten beeinflussen. Die T_{H1} Zelle verstärkt die Immunantwort indem sie die pro-inflammatorischen Zytokine IL-2, INF- γ und TNF- α sezerniert (24) (28). INF- γ aktiviert Makrophagen, die dann weitere proinflammatorische Zytokine wie z.B. TNF-a, IL-6 und GM-CSF ausschütten (2). Die T_{H2} -Zelle sezerniert die Zytokine IL-4, IL-5, I-6, IL-10 und IL-13. (29) Dies führt zu einer Interaktion mit B-Zellen, wodurch die Sekretion von Antikörpern beeinflusst wird. Über die Zytokine IL-4, IL-10 und IL-13 wirkt die T_{H2} -Zelle außerdem anti-inflammatorisch, indem die Funktion der T_{H1} -Zellen gehemmt und die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen inhibiert wird. (30).

Die zytotoxische oder Effektor T-Zelle (T_C) gehört zu den CD8+ T-Zellen. Sie erkennt über MHC-I Moleküle eine infizierte körpereigene Zelle und tötet diese ab. Die T_C -Zelle ist somit in der Lage, jede infizierte Zelle des Körpers zu eliminieren. Dies geschieht anhand freigesetzter Granula der T_C -Zelle, welche die Zellmembran der Zielzelle perforieren, sowie durch Enzyme, die die infizierte Zelle zur Apoptose veranlassen (2).

B-Zellen besitzen einen B-Zell-Rezeptor (BCR), welcher aus einem membrangebundenen Antikörper besteht, der nach Ausschüttung aus einer Plasmazelle auch in gelöster Form vorkommt (2). Naive B-Zellen, d.h. B-Zellen vor Antigenkontakt, sind zunächst nicht in der Lage Antikörper zu produzieren. Hierfür müssen die B-Zellen aktiviert werden (2). Im Gegensatz zu T-Zellen, die mit ihrem TCR Antigene in Verbindung mit MHC-Molekülen identifizieren, erkennen B-Zellen native Antigene anhand des BCR. Nach Bindung des Antigens werden auf der Zelloberfläche der B-Zelle vermehrt MHC-II-Moleküle exprimiert. Über diesen Komplex, sowie über den CD40 Rezeptor interagiert die B-Zelle mit einer T-Helferzelle und wird so aktiviert. Die Aktivierung führt zur Freisetzung von IL-4, IL-5 und IL-6. Diese Zytokine regen die B-Zellen zur Differenzierung von Antikörper-produzierenden Plasmazellen und zur klonalen B-Zell Expansion an (2).

1.1.3 Antigenpräsentierende Zellen: die dendritische Zelle

Die dendritische Zelle gehört zu den potentesten Antigen-präsentierenden Zellen (31). Sie stammt aus einer CD34+ lymphatischen bzw. aus der myeloiden CD11c-positiven Zelle aus dem Knochenmark (32). Von dort wandern sie über die Blutbahn in periphere lymphatische Organe oder ins Gewebe, wo sie als unreife dendritische Zellen zirkulieren. Nach der Aktivierung sind sie maßgeblich an der Stimulation von T-Zellen beteiligt (2) (33) (34). In vitro können dendritische Zellen durch die Stimulation mit GM-CSF und IL-4 aus Monozyten heranreifen (35) (20) (36).

Aufgaben und Funktion

Die Aufgaben der dendritischen Zelle reichen von der Regulation des Immunsystems, bis hin zur Beeinflussung von Autoimmunprozessen und Verträglichkeit von Transplantaten (36). Wie bereits erwähnt, spielen die dendritischen Zellen beim Immunsystem eine wichtige Rolle bezüglich der Kommunikation von angeborener und adaptiver Immunabwehr. Sie initiieren eine effektive Immunantwort (31).

Dendritische Zellen lassen sich in zwei Gruppen einteilen:

- konventionelle dendritische Zellen (DC1), welche an der Antigenpräsentation beteiligt sind und anschließend für die T-Zell-Aktivierung sorgen (31). Diese Zelle ist CD11c-positiv (37). Ihre Vorläuferzellen stammen aus der myeloiden Reihe.
- plasmacytoide dendritische Zellen (DC2), welche vor allem Interferone produzieren und sich weniger an der Aktivierung von T-Zellen beteiligen (38). Diese Zelle ist CD11c-negativ (37). Die DC2 exprimiert BDCA-4. Ihre Vorläuferzelle stammt aus der plasmacytoide Reihe.

Aktivierung und Reifung

Nachdem der Körper einen Infektionsherd festgestellt hat, kommt es zu einer Entzündungsreaktion. Infolgedessen wird die Reifung von dendritischen Zellen, die sich zunächst im Gewebe aufhalten, angeregt. Dies geschieht entweder anhand von Zytokinen oder anhand der Rezeptoren auf den dendritischen Zellen, welche Antigene erkennen (38). Dendritische Zellen haben im unreifen Zustand eine hohe Kapazität zur Antigenaufnahme und exprimieren eine hohe Anzahl MHC-I und -II Moleküle an ihrer Oberfläche. Die noch unreifen dendritischen Zellen phagozytieren als Teil der angeborenen Immunität zunächst Krankheitserreger und präsentieren Bruchstücke von ihnen mithilfe der MHC-Moleküle an der Oberfläche (33) (34) (36) (38). Bei der Reifung nimmt das Potential zur Antigenaufnahme und im Vergleich zur unreifen dendritischen Zelle deutlich ab (36). Nach der Phagozytose ändern sich außerdem die exprimierten Rezeptoren auf der Oberfläche der dendritischen Zelle so, dass diese in ein peripheres lymphatisches Gewebe einwandern kann, wie beispielsweise die Lymphknoten aber auch die Milz oder das mucoassoziierte lymphatische Gewebe (MALT). Der wichtigste Vertreter ist der Chemokinrezeptor CCR7, der die dendritischen Zellen durch die lymphatischen Bahnen in lymphatische Organe führt. Dort sind die aktivierten dendritischen Zellen in der Lage, den naiven T-Zellen Antigene an der Oberfläche zu präsentieren und diese zu aktivieren (38). Da die naiven T-Zellen zur Aktivierung die Antigenpräsentation benötigen und sich diese vor allem in den

lymphatischen Organen befinden, müssen die dendritischen Zellen in die lymphatischen Organe einwandern, um den T-Zellen die Antigenbruchstücke zu präsentieren. Die aktivierten T-Zellen werden dann zur Teilung und weiteren Reifung, z.B. zu Effektorzellen, angeregt (38). Dendritische Zellen beeinflussen demnach die Immunantwort durch eine Aktivierung der T-Zellen. Allerdings gibt es ebenso Mechanismen, bei denen die Reifung und Aktivierung weiterer Lymphozyten, wie z.B. B-Zellen oder NK-Zellen beeinflusst wird (34) (36).

Oberflächenmarkierung und Zytokinproduktion

Die meisten Zellen lassen sich über eine Kombination unterschiedlicher Oberflächenmoleküle identifizieren. So hat auch die dendritische Zelle verschiedene Oberflächenmoleküle. Die konventionelle dendritische Zelle exprimiert unter anderem MHC Klasse I und II, sowie das DC-Sign (CD209 – dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin) und CCR7. Außerdem besitzt sie die TLR, welche wichtig für die Antigenerkennung sowie die folgende Phagozytose sind. Anhand der MHC-II Moleküle werden die Antigene an der Oberfläche präsentiert. Die plasmacytoide dendritische Zelle exprimiert nur MHC-II, sowie z.B. CXCR3. Die reifen dendritischen Zellen weisen allerdings eine veränderte Oberflächenstruktur auf. Sie exprimieren vermehrt das DC-Sign und MHC-I bzw. –II auf ihrer Oberfläche und weitere Proteine wie CD80, CD83 und CD86 (38) (36). Oberflächenantigene der B-Zellen wie z.B. CD19 oder CD20, der T-Zellen (CD3) oder der Monozyten (CD14) sind auf der dendritischen Zelle nicht zu finden (36) (33).

Die reife dendritische Zelle sezerniert pro-inflammatorische Zytokine wie z.B. IL-6, IL-12, IL-18, IL-23 und Interferone wie IFN- γ und Interferon- α (IFN- α), die einerseits zur Aktivierung weiterer dendritischer Zellen führen, aber auch zur Bildung co-stimulierender Moleküle auf der Oberfläche der dendritischen Zelle führen. Dies hat eine Hochregulierung von MHC-I und –II Molekülen und Aktivierung der T-Helferzellen zur Folge (2) (38) (36).

Reife dendritische Zellen sind mitunter Hauptproduzenten von IL-12 (34). Dieses Zytokin sorgt für eine Ausreifung und Aktivierung von T-Zellen und NK-Zellen. B-Zellen werden durch IL-12 zur Antikörperproduktion angeregt (36).

Wie bereits erwähnt, werden bei einer Infektion ohnehin die Zytokine IFN- γ und IFN- α ausgeschüttet. Dies ist wichtig bei der Unterscheidung von "fremd" und "eigen". Untersuchungen haben gezeigt, dass eine alleinige Verabreichung von körperfremden Proteinen keine Immunreaktion auslöst, da vermutlich die costimulatorische Aktivierung der dendritischen Zellen fehlt und erst die zusätzliche Gabe von Bakterien notwendig ist (38).

1.2 Graft-versus-Host-Disease

1.2.1 Autoimmunität und Selbsttoleranz

Unser Körper unterscheidet in der Regel sicher zwischen "fremd" und "eigen". Das bedeutet, er toleriert körpereigene Antigene, ohne eine Immunreaktion auszulösen (39). Autoimmunität bedeutet, dass der Körper eine Immunreaktion gegen den eigenen Körper richtet und somit körpereigene Zellen und Gewebe zerstört werden (2).

Um das zu verhindern, durchlaufen T- und B-Zellen während ihrer Reifung einen Prozess, welcher für eine Aussortierung jener Zellen sorgt, die auf körpereigene Antigene reagieren (40). Im Folgenden wird dieser Prozess anhand der T-Zellen erläutert. Es wird zwischen einer zentralen und einer peripheren Toleranz unterschieden. Bei der zentralen Toleranz kommen die unreifen Thymozyten im Thymus immer wieder mit eigenen Antigenen in Kontakt. Diese werden von APCs über den MHC-II-Rezeptor präsentiert. Reagiert die T-Zelle mit hoher Affinität auf das Antigen, so wird die Zelle zur Apoptose, also zum programmierten Zelltod, veranlasst. Bindet der Thymozyt mit niedriger Affinität, verlässt er als naive, unreife T-Zelle den Thymus. Auf diese Art und Weise verlassen nur 1-2% der Thymozyten den Thymus als unreife T-Zellen (2). Allerdings gibt es auch Zellen, welche diesem Mechanismus entkommen und daher im Rahmen weiterer Mechanismen der peripheren Toleranz eliminiert werden müssen. Ein Beispiel hierfür ist die klonale Deletion, bei der körpereigene Antigene für eine permanente

Stimulation von T-Zellen sorgen, die dann über den Fas-Liganden zur Apoptose veranlasst werden (2).

1.2.2 Pathophysiologie der Graft-versus-Host-Disease (GvHD)

Bei der Transplantation von fremden Organen oder Gewebe steht die Medizin vor einer wichtigen Herausforderung. Da unser Körper die fremden Antigene, in diesem Fall sogenannte "Alloantigene", erkennt und angreift, muss eine Abstoßungsreaktion verhindert werden. Dies geschieht einerseits durch eine Immunsuppression des Empfängers und andererseits durch die Auswahl eines geeigneten Empfängers, der die beste Übereinstimmung bei der HLA-Typisierung aufweist (2). Bei einer Abstoßungsreaktion des Empfängers gegenüber dem Spender handelt es sich um eine Host-versus-Graft-Disease. Umgekehrt, beispielsweise bei der Transplantation von Knochenmark oder Knochengewebe, ist es ebenfalls möglich, dass das gespendete Material eine Immunreaktion gegen den Körper des Empfängers auslöst. Hierbei handelt es sich um eine Graft-versus-Host-Disease (GvHD).

Die Abstoßungsreaktion läuft in verschiedenen Phasen ab. Zunächst wird durch die Behandlung das Gewebe des Empfängers aktiviert. Bei der Behandlung handelt es sich z.B. um Bestrahlung bei einer hämatoonkologischen Erkrankung. Infolgedessen werden proinflammatorische Zytokine, wie z.B. TNF- α , IFN- γ , IL-1, IL-2 und IL-12 sezerniert (41). Hierdurch kommt es zu einer Hochregulation der MHC-Komplexe sowie von weiteren Adhäsionsoberflächenmolekülen (41). Außerdem werden APCs und T-Zellen des Spenders aktiviert und zur Teilung angeregt (42) (43). Die T-Zellen des Spenders können sich nach Kontakt zu den APCs weiter differenzieren und vermehren (44).

Als Zeichen der akuten GvHD wird zuletzt durch die aktivierten Immunzellen das Gewebe des Empfängers geschädigt (41). Dieser Zustand ist lebensbedrohlich und bedarf einer sehr starken Immunsuppression. Aktuell sind ca. 20-40% der pädiatrischen Patienten nach einer Knochenmarktransplantation von einer GvHD betroffen. Zur Prophylaxe einer GvHD erfolgt eine Immunsuppression mit Ciclosporin A, dem Zytostatikum

Metothrexat, Steroidhormonen oder dem Antikörper Anti-Thymozyten-Globulin. Diese Medikamente weisen verschiedenste unerwünschte Arzneimittelwirkungen, wie z.B. Nephrotoxizität, Hepatotoxizität oder Myelosuppression, auf. Tritt trotz Prophylaxe eine GvHD auf, erfolgt als erste Wahl eine Behandlung mit Steroidhormonen (Glucocorticoide, z.B. Prednisolon) (45).

1.3 Mesenchymale Stammzellen

1.3.1 Eigenschaften von Mesenchymalen Stammzellen

Alle Gewebe und Organe des menschlichen Körpers reifen im Rahmen der Embryogenese aus verschiedenen Keimblättern heran. Mesenchymale Stammzellen (MSC) sind die Stammzellen des Bindegewebes, die aus dem Mesoderm hervorgehen und beim Erwachsenen hauptsächlich im Knochenmark, aber auch in anderem Gewebe zu finden sind (46). Mesenchymale Stammzellen sind undifferenzierte Zellen, welche sich für eine *in vitro* Anzüchtung gut eignen und eine hohe Zellteilungsrate haben (31). Außerdem sind sie imstande sich *in vitro* und im Tiermodell (47) (48) zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren. Dazu gehören Chondrozyten, Osteoblasten, Adipozyten, Myozyten und Knochenmarksstromazellen (46) (31) (49) (50) (51).

Die Untersuchung der Oberflächenmarker von MSCs ergab, dass diese negativ für hämatopoetische Marker wie CD45 und CD34, für Marker von Monozyten und Makrophagen wie CD11b oder CD14 sowie ebenfalls negativ für Marker der B-Zelle wie CD19 und CD79a sind. CD73, CD90 und CD105 gehören allerdings zu den definierenden MSC-spezifischen Oberflächenmolekülen, wobei diese in Zusammenhang mit der Plastikadhärenz exprimiert werden (52) (53). Außerdem sind die Adhäsionsmoleküle CD44, CD29, CD106, CD166 sowie der MSC-Marker STRO-1 vorhanden (49) (54) (50). MSCs exprimieren wie alle anderen kernhaltigen Zellen eine große Menge MHC-I und wenig MHC-II (48).

Zu Beginn der Wachstumsphase sezernieren MSCs die Zytokine IL-6, IL-8, IL-11, IL-12, IL-14, IL-15, GM-CSF, G-CSF (Granulocyte-colony stimulating factor) und M-CSF (55) (56). Diese Zytokine sind wichtige Botenstoffe unter anderem auch bei der Immunreaktion. IL-6 kann sowohl pro-inflammatorisch als auch anti-inflammatorisch wirken, fördert allerdings auch die Apoptose von T-Zellen und verhindert deren Proliferation (49).

Zusammenfassend haben MSCs drei wichtige Eigenschaften. Sie haben ein großes Potential zur Ausdifferenzierung in verschiedene Gewebetypen, sie produzieren trophische Faktoren, die für Gewebezüchtung wichtig sind und sie besitzen immunmodulatorische Eigenschaften (48).

1.3.2 Immunmodulatorische Funktion von MSCs

In zahlreichen Arbeiten wurde gezeigt, dass mesenchymale Stammzellen immunsuppressive Eigenschaften besitzen, die durch die Modulation von Immunzellen bzw. ihren Funktionen zustande kommen. Sie interagieren mit jeder Zelle des Immunsystems – entweder direkt oder durch lösliche Faktoren und können dadurch die Immunreaktion verhindern bzw. verlangsamen (31). So verändern MSCs aus dem Knochenmark die Sekretion von Zytokinen der Zellen des Immunsystems, wie z.B. dendritische Zellen, naive T-Zellen und T-Helfer- und Effektor-Zellen (42).

In Kokulturen von Lymphozyten und MSCs aus dem Knochenmark konnte z.B. gezeigt werden, dass MSCs eine direkte immunsuppressive Wirkung auf T-Zellen haben (32). Die T-Zell Proliferation konnte um die Hälfte verringert werden (57).

In der Kokultur mit Immunzellen in einer pro-inflammatorischen Umgebung ist eine Sezernierung vonIDO (Indolamin-2,3-Dioxygenase) durch z.B. dendritische Zellen und IL-4 und IL-10 durch die T_H2-Zelle zu erkennen (58) (31).IDO ist ein Enzym, welches das Protein Tryptophan abbaut. Ein Tryptophan-armes Milieu führt zu einer supprimierten T-Zell-Proliferation. Je mehr IDO ausgeschüttet wird, desto mehr Tryptophan wird abgebaut, was die Immunsuppression zusätzlich unterstützt (59) (60). IL-4 und IL-10 sind anti-

inflammatorische Zytokine. IL-4 senkt die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-12 und IFN- γ , IL-10 inhibiert ebenfalls IL-12.

MSCs senken außerdem selbst die Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α durch die T_H1-Zelle (61) (62) (63).

Die Zytokine HGF- β (Human Growth Factor), ein Wachstumsfaktor, und TGF- β (Transforming Growth Factor) sind weitere Faktoren, die von MSCs bei Kontakt mit Lymphozyten sezerniert werden und immunsuppressiv wirken. Beide können inhibitorisch auf die T-Zell Proliferation wirken (48). Das von den MSCs ausgeschüttete TGF- β in Kombination mit dem anti-inflammatorischen IL-10 vermindert außerdem die Ausschüttung der oben genannten pro-inflammatorischen Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α (49).

Unter normalen Bedingungen sezernieren MSCs aus dem Knochenmark wenig Prostaglandin E₂ (PGE₂), welches ein wichtiger Faktor der Immunantwort ist. PGE₂ wird von Monozyten und Makrophagen ausgeschüttet und kann durch eine negative Rückkopplung die Immunantwort begrenzen, indem es die Produktion der anti-inflammatorischen Zytokine IL-4 und IL-10 aktiviert (48). In der Kokultur von MSCs mit mononukleären Zellen des peripheren Bluts (peripheral blood mononuclear cell, PBMC) zeigte sich eine deutlich erhöhte Sezernierung von PGE₂. Nach der Zugabe von PGE₂-Inhibitoren, war die immunsuppressive Wirkung von MSCs wieder vermindert (42). Dies ließ in dieser Studie vermuten, dass PGE₂ bei der immunsuppressiven Wirkung von MSCs beteiligt ist (64).

Zahlreiche Studien konnten zeigen, dass die immunsuppressive Wirkung der MSC auf der Verschiebung des T-Helferzelltyps und somit auch auf der veränderten Zytokin-Sekretion von pro- zu anti-inflammatorisch basiert (49) (65) (49) (42).

MSCs aus dem Knochenmark tragen wie bereits erwähnt auf ihrer Oberfläche das MHC-I Molekül, aber nicht das MHC-II Molekül (8) (66). MSC sind daher vor natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) geschützt, da diese vor allem Zellen angreifen, die ihre MHC-I Expression herunterreguliert haben, wie beispielsweise Tumorzellen. Das Fehlen von MHC-II oder deren geringe

Expression sorgt folglich dafür, dass MSCs die Aktivierung von CD4+ T-Zellen nicht auslösen können (67).

Die immunsuppressiven Eigenschaften von MSCs macht diese außer für Tissue Engineering auch für weitere klinische Anwendungen, beispielsweise Gewebe-Transplantationen brauchbar (68).

Damit haben mesenchymale Stammzellen eine breite Anwendungspalette: einerseits im Bereich des Tissue Engineering zur Deckung von Gewebedefekten, andererseits auch bei der Modulation von Immunantworten z.B. während der akuten GvHD oder bei Autoimmunerkrankungen (31) (42).

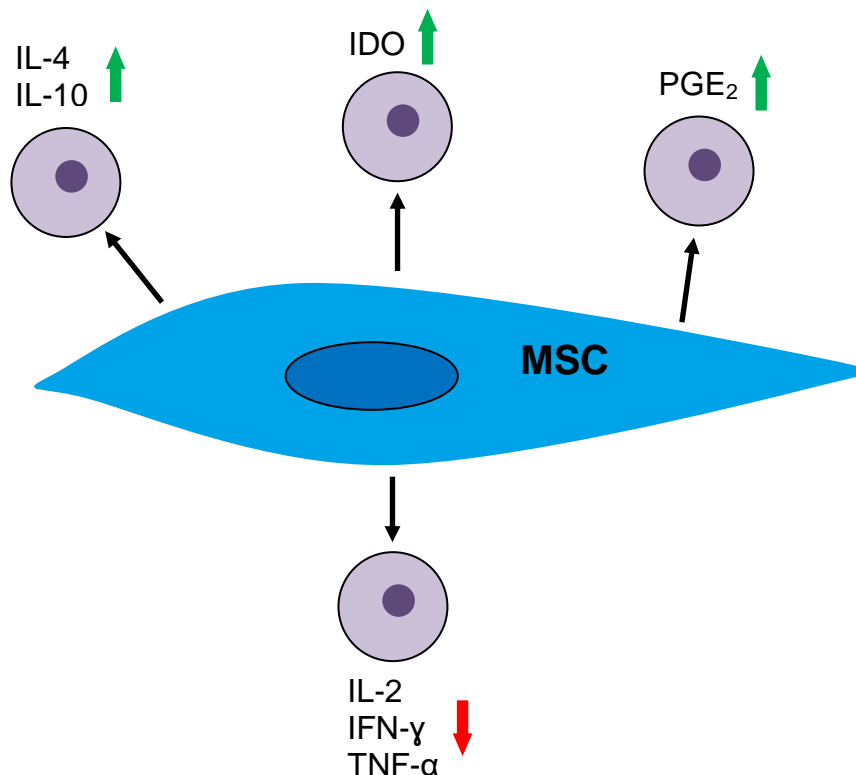


Abbildung 1: Übersicht über den Einfluss der MSC auf die Zytokinausschüttung.

1.3.3 MSCs und dendritische Zellen

Gegenstand dieser Arbeit war es den Einfluss von MSCs auf die dendritischen Zellen in allen Stadien ihrer Entwicklung – von der Differenzierung, über die Reifung bis hin zur Aktivierung, zu untersuchen (69) (52). Es stellte sich die

Frage, inwiefern dendritische Zellen in der Kokultur mit MSCs an der Reifung bzw. Differenzierung nach Stimulation mit GM-CSF und IL-4 gehindert werden können (69).

Während ihrer Reifung vom Monozyten zur dendritischen Zelle beobachtet man eine vermehrte Expression der Oberflächenmarker CD1a, CD80 und CD86 (70). Während der Differenzierungsphase hemmen die MSCs aus dem Knochenmark u.a. die Hochregulierung von CD1a, CD80, CD86 und HLA-DR von dendritischen Zellen (69) (32) (48). Diese sind co-stimulierende Moleküle, die an der Aktivierung von T-Zellen beteiligt sind. Die Expression von CD14, das vor allem auf unreifen Monozyten vorhanden ist, bleibt gut erhalten. Außerdem sind wie oben beschrieben verminderte Spiegel von pro-inflammatorischen Faktoren wie IL-2, IL-12 IFN- γ und TNF- α , jedoch erhöhte Spiegel des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 zu erkennen (71) (32) (64) (42). Von Aggarwal und Ko-Autoren folgende zugrundeliegende Mechanismen postuliert: die MSC inhibiert die TNF- α und IL-12 Ausschüttung der reifen dendritischen Zelle. Dies hat wiederum zur Folge, dass die IFN- γ Ausschüttung der pro-inflammatorischen T-Helferzelle (T_H1) gedrosselt wird. Außerdem bewirken MSCs eine vermehrte Sekretion der Zytokine IL-10 und IL-4, die z.B. von T_H2 -Zellen gebildet werden. Über Zell-Zell Kontakte können außerdem die pro-inflammatorischen NK-Zellen supprimiert sowie die anti-inflammatorischen T_H2 -Zellen zur Bildung von IL-4 angeregt werden. (72) In bisherigen Untersuchungen von Kokulturen mit MSCs zeigte sich eine reduzierte Anzahl von dendritischen Zellen, v.a. die Subpopulation DC1 betreffend (65).

1.3.4 Die Kieferperiostzelle als Mesenchymale Stammzelle

Das Periost eines Knochens besteht aus zwei Schichten: einem äußeren Blatt, dem „stratum fibrosum“ bestehend aus Fibroblasten und kollagenem Bindegewebe und einem inneren Blatt, dem „stratum osteogenicum“, das die Progenitor- (Vorläufer-) Zellen enthält, die Stammzellpotential aufweisen (73).

Von den Zellen aus dem Knochenperiost (Jaw periosteal cells, JPC) wird schon lange angenommen, dass sie ähnliche Eigenschaften wie mesenchymale Stammzellen aus dem Knochenmark aufweisen. Sie werden insbesondere zur

Reparatur von Knochen oder Knorpeldefekten angewandt (73). Periostzellen zeigen *in vitro* zunächst eine hohe Teilungsrate, die linear ansteigt, aber abhängig vom Alter des Spenders ist. Je älter der Spender ist, desto schlechter sind die Teilungsraten (46).

De Bari et. al untersuchten die Oberflächenexpression von tibialen Periostzellen. Die Untersuchungen ergaben, dass ebenso wie bei MSCs aus dem Knochenmark auch hier CD45 fehlt. Außerdem waren die u.a. MSC definierenden Moleküle CD105, CD73 und CD166 auch exprimiert (53). Die Untersuchung zeigte, dass Periostzellen wie auch die MSCs aus dem Knochenmark eine hohe Teilungsrate aufweisen und sich zu verschiedenen Gewebetypen, einschließlich Knochen, Knorpel und Fettgewebe differenzieren lassen können (46).

1.3.5 Klinische Anwendung von MSCs bzw. JPCs

Es gibt eine Vielzahl an Erkrankungen bei denen MSCs zum Einsatz kommen können (74). Bisher kamen MSCs u.a. bei der Regeneration von Gewebe zur Anwendung. Dies erklärt sich durch Eigenschaften wie eine hohe Selbsterneuerungsrate, die Möglichkeit sich zu verschiedenen Zelltypen zu differenzieren (49) sowie die oben beschriebenen Eigenschaften hinsichtlich der Modulation der Immunantwort. Diese verhindern, dass das eingesetzte Gewebe eine Immunreaktion auslöst. MSCs finden beispielsweise im Bereich von Autoimmunerkrankungen, Abstoßungsreaktionen oder Entzündungsreaktionen Anwendung (52) (75) (76). So konnten bereits Patienten mit einer akuten GvHD mit humanen haploidenten MSCs erfolgreich behandelt werden (77) (78). Sogar MSCs ohne MHC-Übereinstimmung können angewandt werden (74). In diesem Fall scheint die intravenöse Applikation von MSCs zudem keine Abstoßungsreaktion des Immunsystems hervorzurufen, unabhängig von der immunsuppressiven Behandlung (31) (79). Dementsprechend kann nicht nur die Behandlung der GvHD durch MSCs erfolgen, sondern auch die Prävention dieser schwerwiegenden Komplikation (80).

Bei der Behandlung der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis, die der Multiplen Sklerose bezüglich der Pathophysiologie sehr ähnlich ist, konnten

MSCs die Entzündungsreaktion und Demyelinisierung im zentralen Nervensystem vermindern (81).

Der Einsatz von Kieferperiostzellen bringt den Vorteil, dass dieses Gewebe leicht zugänglich ist und damit auch eine geeignete Quelle für Material in der Regenerativen Medizin darstellt (73).

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Seit einigen Jahren besteht großes Interesse an der *in vitro* Züchtung von Gewebe. Das Forschungslabor der Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie in Tübingen untersucht die Eigenschaften von Kieferperiostzellen, welche Stammzellpotential zeigen, bezüglich ihres Phänotyps, ihres osteogenen Potentials und ihrer Eigenschaften in der zwei- und dreidimensionalen Zellkultur. Weiterhin wird untersucht, inwiefern die Zellen zur Mineralisierung und damit zur Knochenbildung befähigt sind. *In vitro* gezüchtetes Knochengewebe aus Kieferperiostzellen kann zur Knochenregeneration bzw. -neubildung angewandt werden und dient damit als Quelle für autologes Gewebe.

Der Einsatz von *in vitro* gezüchtetem Knochengewebe, basierend auf mesenchymalen Stammzellen aus dem Kieferperiost, setzt allerdings voraus, dass die körpereigene Immunreaktion verhindert wird. Stammzellen aus dem Knochenmark sind hinsichtlich ihrer immunsuppressiven Eigenschaften bereits weitreichend untersucht und es wurde in Studien ausreichend belegt, dass die allogene Transplantation von Knochenmark-Stammzellen möglich ist und diese positive Effekte auf Zellen des Immunsystems ausübt (8). Diese immunsuppressive Wirkung kommt entweder indirekt durch die Freisetzung zahlreicher immunsuppressiver Faktoren oder durch eine direkte Beeinflussung der Immunzellen zustande.

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, inwiefern Kieferperiostzellen in ihrer Eigenschaft als MSCs immunsuppressiv wirken und welchen Effekt sie auf die Reifung der dendritischen Zelle als Schlüsselzelle für die Initiation einer Immunantwort haben. Damit soll zumindest partiell geklärt werden, ob eine

unerwünschte Immunreaktion bei der Anwendung von *in vitro* gezüchtetem Knochenmaterial zur Defektdeckung durch den Einsatz von Kieferperiostzellen verhindert werden könnte. Hierfür werden verschiedene Kokulturen mit Kieferperiostzellen und dendritischen Zellen angesetzt und mittels Durchflusszytometrie auf ihre Oberflächenmarkierung untersucht, sowie pro- und anti-inflammatorische Faktoren mittels ELISA in den Überständen der Zellkulturen untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Laborartikel

2.1.1 Verbrauchsmaterialien: Puffer, Lösungen und Medien

Dulbecco's Modified Eagle Medium / F12 + Glutamax (DMEM), Thermo Fisher Scientific (Waltham)

Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS), Sigma-Aldrich (Steinheim)

Amphotericin B, Biochrome/Merck (Berlin)

Trypsin, Lonza (Basel)

Ficoll Paque, GE Healthcare (Little Chalfont)

X-Vivo 15, Biozym (Hessisch Oldendorf)

Trypan blue solution 0,4%, Sigma Aldrich (Steinheim)

FACS-Puffer: 500ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline, 2,5ml Natriumazid 20% Lösung (4g Na-Azid + 20ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline), 5ml BSA 10% (5g BSA in 50ml Dulbecco's Phosphate Buffered Saline)

Mouse-Serum, Jackson Immuno-Research, Dianova (Hamburg)

2.1.2 Geräte

Zentrifugen „5804 R“, Eppendorf (Wesseling-Berzdorf)

ELISA Reader, „KC4“, BIO-TEK Instruments (Winooski)

FACS Gerät Guava® easyCyte Flow Cytometers, Merck Millipore (Darmstadt)

2.1.3 Material für Zellkulturen

Zellkulturflasche

6-Well-Platten

96-Well Platten

Transwell Platten, 24mm with 0,4 Pore Polyester Membrane insert, Corning (Amsterdam)

Pipettenspitzen, Starlab (Milton Keynes)

2.1.4 Reagenziensätze

Prostaglandin E2 ELISA Kit, Hölzel Diagnostik (Köln)

Human indoleamine 2,3-dioxygenase ELISA Kit, Biotang (Lexington)

ELISA Kit Human IL-12, R&D Systems (Wiesbaden)

2.1.5 Zytokine und Chemokine

IL-6, Tebu-Bio (Offenbach)

IL-1 β , Tebu-Bio (Offenbach)

PGE2, Focus Biomolecules (Philadelphia)

LPS, Santa Cruz Biotechnologie (Dallas)

IL-4, Sigma Aldrich (Steinheim)

TNF α , Tebu-Bio (Offenbach)

GM-CSF, Sigma Aldrich (Steinheim)

2.1.6 Antikörper

APC DC Sign Antikörper (CD209), Biolegend (San Diego)

APC IgG1 Antikörper, Biolegend (San Diego)

APC CD3 Antikörper, Biolegend (San Diego)

APC CD80 Antikörper, Biolegend (San Diego)

APC CD197 (CCR7), Biolegend (San Diego)

APC HLA-DR Antikörper, Bio-Rad AbD Serotec (Puchheim)

APC CD19 Antikörper, Biolegend (San Diego)

APC CD86 Antikörper, Biolegend (San Diego)

APC HLA-A,B,C Antikörper Biolegend (San Diego)

APC CD14 Antikörper, Biolegend (San Diego)

APC CD83 Antikörper, Biolegend (San Diego)

APC Anti IgG2a Antikörper, Biolegend (San Diego)

APC Anti IgG2b Antikörper, Biolegend (San Diego)

APD Anti CD1a Antikörper, BD Pharmingen/Biosciences (Heidelberg)

2.2 Analyseverfahren

2.2.1 Durchflusszytometrie

Bei der Durchflusszytometrie handelt es sich um eine Analyse von Partikeln mittels Fluoreszenzmikroskopie. In der Regel handelt es sich bei den Partikeln um Zellen, die im kontinuierlichen Probendurchfluss untersucht werden. Dabei werden diese hinsichtlich ihrer Granularität, Größe und Oberflächenmarkierungen gruppiert. Beim Fluorescence-activated Cell Sorting (FACS) handelt es sich um eine Methode, bei der die Zellen anhand ihrer Eigenschaften analysiert und sortiert werden. Ein FACS-Gerät besteht aus einem Flüssigkeitssystem inklusive Messzelle, einem Laser und einem optischen System mit verschiedenen Detektoren. Die Grundlage der Messung bildet eine Zellsuspension, die auch mit Fluoreszenzfarbstoff gefärbt sein kann. Jede Zelle in der Messflüssigkeit passiert einzeln eine Kapillare (hydrodynamische Fokussierung) und trifft anschließend in der Messzelle auf einen Laserstrahl. Die Detektoren messen sowohl das an der Zelle gestreute Licht, als auch das Fluoreszenzlicht verschiedener Wellenlängen, sofern die Zellen zuvor mit Farbstoffen markiert wurden. Diese Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen erfolgt im Rahmen dieser Arbeit an den Oberflächenproteinen der Zelle (CD Klassifizierung).

Das an der Zelle gestreute Licht wird im Forward Scatter Detector und den Sideward Scatter Detektoren gemessen. Der Forward Scatter Detector liegt in der gleichen Ebene wie der Laser und misst das Licht, welches an der Zelle im

flachen Winkel gebrochen wurde. Damit ist es möglich, die Größe der Zelle zu bestimmen. Das Licht, das durch Streuung an den inneren Zellmembranen, wie z.B. von Vesikeln oder dem Zellkern gebrochen wurde, wird vom Sideward Scatter Detector, der im rechten Winkel zum Laserstrahl liegt, aufgenommen. Die Messung im Sideward Scatter Detector beschreibt demnach die Granularität der Zelle, d.h. das Vorhandensein und die Beschaffenheit der Zellorganellen. So können zunächst alleine anhand der Messungen der Streulichter die Zellen in verschiedene Zellpopulationen eingeteilt werden. Sind die Zellen mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, können weitere Detektoren das von den Zellen emittierte Licht einer bestimmten Wellenlänge aufnehmen. Je nach Gerät können auch verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe gleichzeitig eingesetzt werden.

2.2.2 Enzyme-linked Immunoabsorbent Assay (ELISA)

Die sogenannten ELISAs gehören zu den enzymgekoppelten Immunoabsorptionstests (EIA), die den nachzuweisenden Stoff anhand enzymatischer Reaktionen detektieren. Bei einem Capture-ELISA, welches auch als Sandwich-ELISA bezeichnet wird, können zudem sezernierte und gelöste Stoffe, wie z.B. Zytokine, nachgewiesen werden. Im Folgenden liegt der Fokus auf dem Vorgehen des Sandwich-ELISAs, da dieser im Rahmen der Arbeit zur Anwendung kam.

Das Grundprinzip eines ELISAs besteht aus einer immunologischen Reaktion, bei der ein Komplex aus Antikörper-Antigen-Antikörper gebildet wird, sowie einer enzymatischen Reaktion. Bei Letzterer wird ein Enzym mit einem Substrat umgesetzt, welches zu einer Farbreaktion führt, die wiederum photometrisch gemessen werden kann. Nach der Auswertung kann die Konzentration des zu untersuchenden Stoffes ermittelt werden.

Ein ELISA besteht aus einer Trägerplatte bzw. Mikrotiterplatte mit Wells, die mit einem zum Antigen passenden Antikörper (sogenannte Capture-Antikörper) beschichtet sind. Die Probe mit dem zu untersuchenden Antigen muss in die Wells gegeben werden und für eine bestimmte Zeit inkubieren. Um zu verhindern, dass nicht gebundene Antigene die späteren Ergebnisse

verfälschen, müssen diese sorgfältig von der Platte abgewaschen werden. Anschließend wird ein zweiter enzymgekoppelter Antikörper (Detektionsantikörper) hinzugegeben, der an einer anderen Stelle am Antigen bindet und damit den Antikörper-Antigen-Antikörper Komplex bildet. Nach weiteren Waschschrritten wird ein farbloses Substrat hinzugegeben. Der enthaltene Farbstoff wird durch das Enzym, welches an den zweiten hinzugegebenen Antikörper gekoppelt ist, umgesetzt und dadurch aktiviert, was zu einer Farbreaktion führt. Diese wird anschließend photometrisch gemessen. Anhand des gemessenen Wertes kann die Konzentration des Antikörper-Antigen-Antikörper Komplexes ermittelt werden, woraus die in der Ausgangslösung enthaltene Konzentration des zu untersuchenden Stoffes resultiert.

2.2.3 Zellkultur und osteogene Induktion

Die Kieferperiostzellen wurden bei operativen Eingriffen im Kieferbereich entnommen, entsprechend aufbereitet und in flüssigem Stickstoff konserviert. Für die Versuche im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Zellen von vier Spendern verwendet. Die Zellen wurden nach dem Auftauen zunächst in 75 cm² Zellkulturflaschen in DMEM-Medium mit 10% FCS (fetal calf serum), 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Fungizone ausgesät und kultiviert. Nach einer Waschung mit PBS konnten die Kieferperiostzellen durch das Hinzugeben von 2ml 0,25 %Trypsin abgelöst, transferiert und zentrifugiert werden. Das Pellet wurde in oben genanntem Medium bzw. inklusive zusätzlicher Aktivatoren resuspendiert. Pro Spender wurden zwei 6-Well-Platten mit 40.000 Zellen in jedem Well angesetzt. Auf einer Platte befand sich das Medium als Kontrolle, auf der anderen Platte wurde das Medium mit 0,1% Vitamin C, 0,04% Dexamethason und 1% β -Glycerolphosphat versehen. In Abständen von 2 bis 3 Tagen wurde das entsprechende Kulturmedium gewechselt. Die Überstände der Platten wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bis Tag 21 nach dem Aussähen in die 6-Well-Platten gesammelt und bei -80°C für spätere Versuche aufbewahrt. Die Behandlung der Zellen erfolgte bis Tag 30. Zum Vergleich der Ergebnisse wurde parallel eine 6-Well-Platte als Kontrolle angesetzt, bei der

das Medium nicht mit Vitamin C, Dexamethason und β -Glycerolphosphat versetzt wurde. Alle anderen Schritte wurden analog zum beschriebenen Versuch durchgeführt. Die Versuchsdurchführung wurde mit je vier Patienten in drei Durchgängen wiederholt.

2.2.4 Färbung mit Alizarin

Zur Darstellung der von differenzierten Kieferperiostzellen gebildeten Kalziumphosphatpräzipitate wurden die 6-Well-Platten mit Alizarin Red gefärbt. Es folgten zunächst ein Waschschrift mit PBS und anschließend eine Fixierung mit Ethanol für 1 min. Anschließend wurden die Zellen mit 4mM Alizarinlösung (pH 4,2) gefärbt und für 30 min. bei Raumtemperatur belassen. Nach vier Waschschriften zu je 15 min. mit Aqua dest. wurden die Zellen erneut mit Ethanol fixiert, bei Raumtemperatur luftgetrocknet und fotografiert. Auch hier wurde parallel ein Kontrollversuch angesetzt.

2.2.5 Färbung der Alkalischen Phosphatase

Bei der alkalischen Phosphatase handelt es sich um eine zytochemische Färbung, bei der ein Enzym ein Reaktionsprodukt umsetzt. Dieses wird angefärbt und ist damit im Mikroskop sichtbar.

Alkalische Phosphatase ist ein Enzym des menschlichen Körpers, das vor allem in Knochengewebe, in der Leber und in den Gallengängen vorkommt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Färbung genutzt, um das Vorhandensein von Knochengewebe nachzuweisen.

Zunächst musste eine Fixierlösung hergestellt werden. Diese besteht aus einer Zitratarbeitslösung aus 2ml Zitratkonzentrat und 100ml Aqua dest. Zu 1ml Zitratlösung wird noch 1,5ml Aceton gegeben. Das Gewebe in den 6-Well-Platten wurde mit je 1ml pro Well dieser Lösung für ca. 30 Sekunden fixiert. Anschließend wurde die Fixierlösung abgenommen und die Wells wurden mit je 2ml Aqua dest. gespült.

Anschließend wurden pro Well 2ml eines Alkalifarbstoffgemischs zugegeben. Dieses besteht aus 27ml Diazoniumsalzlösung und 1,125ml Naphtyl AS-MX-

Phosphat-Alkalilösung. Die 6-Well-Platten wurden nun für 30 min. bei Raumtemperatur (18-26°) inkubiert. Nach dem Abpipettieren der Alkalilösung wurde jedes Well gründlich mit 2ml Aqua dest. gespült. Anschließend wurde noch 1ml pro Well Mayers Hämatoxylin-Lösung hinzugegeben und für 10 min. inkubiert. Nach Abpipettieren dieser Lösung und zweimaligem Spülen mit Leitungswasser mit je 2ml pro Well konnte das Gewebe unter dem Mikroskop fotografiert werden.

Das Naphtyl-Phosphat dient hier als Substrat. Als Produkt entsteht Naphtol, das mit dem Diazoniumsalz reagiert, wobei ein rötlicher Niederschlag im Cytoplasma ausfällt. Die Hämatoxylin Färbung dient zur Gegenfärbung des Zellkerns, welcher blau erscheint.

2.2.6 ELISA aus den Überständen der Zellkultur zur osteogenen Induktion

Während der osteogenen Differenzierung der Zellen wurden bei jedem Medienwechsel die Überstände der Zellkulturen abgenommen und bei -80°C konserviert. Da die Kieferperiostzellen ein lokales immunsuppressives Milieu bilden sollen, mussten die Überstände auf immunsuppressive Faktoren untersucht werden, um den am besten geeigneten Zeitpunkt zu detektieren, bei dem in späteren Versuchen in der Kokultur die Zellen auf ihre Oberflächendifferenzierung untersucht werden. Folgende Faktoren wurden untersucht:

- PGE₂
- IDO

Für die Untersuchung von PGE₂ und IDO wurden jeweils die Überstände von Tag 7, Tag 14 und Tag 21 der unbehandelten oder osteogen-induzierten Kieferperiostzellen verwendet.

2.3 Differenzierung von dendritischen Zellen aus peripheren mononukleären Blutzellen

2.3.1 Isolation der peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs)

Zunächst wurde 36ml Blut in EDTA Monovetten abgenommen. Das EDTA dient als Chelatbildner und soll eine Aggregation von Leukozyten verhindern. In drei 50ml Falcons wurde jeweils 15ml Ficoll vorgelegt. Ficoll ist ein Polysaccharid, welches besonders zur Dichtegradientenzentrifugation geeignet ist. Das abgenommene Blut wurde 1:1 mit PBS verdünnt und gut gemischt. Danach wurde in jedes mit 15ml Ficoll vorbereitete 50ml Falcon 24ml Blut gegeben. Hierbei war darauf zu achten, dass das Blut vorsichtig überschichtet wurde und sich nicht mit dem Ficoll vermischt. Anschließend erfolgte eine Zentrifugation für 20 min. bei 18°C, 820xg und ausgeschalteter Bremse.

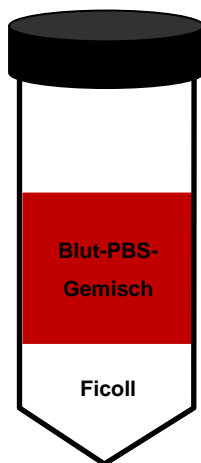


Abbildung 2: Falcon mit Ficoll und PBS-Blut-Gemisch.

Nach der Zentrifugation sind im Falcon drei Schichten zu erkennen. Die oberste Schicht ist das Blutplasma, welches zur späteren Herstellung des Mediums benötigt und daher abgenommen, gesammelt und bei -80°C eingefroren wird. In der schmalen Interphase befinden sich die mononukleären Zellen. Diese werden für die Zellkultur benötigt und daher vorsichtig abpipettiert. Dabei ist darauf zu achten, dass kein Material aus der Schicht oberhalb oder unterhalb

der Interphase mit aufgenommen wird. Die dritte Schicht besteht aus dem Polysaccharid Ficoll. An der Spitze des Falcons sammeln sich die Erythrozyten und Granulozyten. Die abgenommene Interphase wird in drei Zentrifugationsschritten mit 1400 rpm, 1400 rpm und 1250 rpm bei 18°C mit PBS gewaschen. Das zuletzt entstandene Pellet wird in DC - Medium aufgenommen und auf drei 6-Well-Platten mit je 2ml Medium pro Well verteilt. Das DC-Medium bestand aus X-Vivo 15, 1% L-Glutamin, 1% Penicillin/Streptomycin und 3% des vorher abgenommenen autologen Plasmas. Die drei Platten wurden anschließend zum Inkubieren in einen Brutschrank bei 36 °C gebracht.

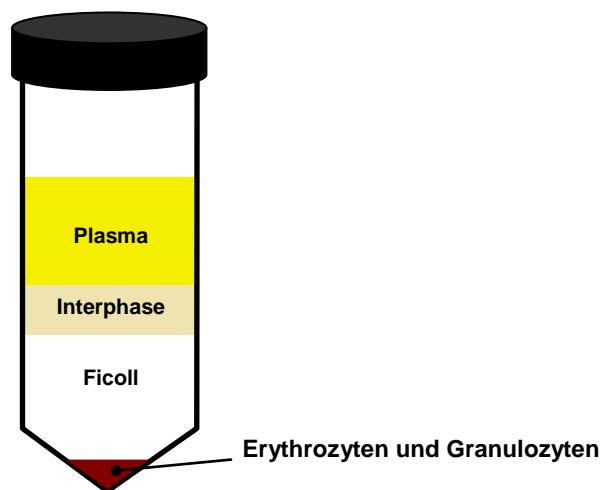


Abbildung 3: Falcon mit Schichtung nach der Zentrifugation.

2.3.2 FACS Analyse der ersten 6-Well-Platte

Die adhärennten Zellen aus einer der drei Platten wurde nach der Inkubation über Nacht für eine FACS Färbung verwendet. Bei den Zellen, die über Nacht adhärennt wurden, handelt es sich um Monozyten, die sich nach Aktivierung zu dendritischen Zellen differenzieren lassen. Hier dienen sie als Kontrolle zur FACS Analyse der später ausdifferenzierten dendritischen Zellen. Die Zellen der restlichen zwei 6-Well-Platten wurden weiter kultiviert und zur Differenzierung stimuliert (siehe 2.3.3).

Für die FACS Analyse der ersten 6-Well-Platte wurde zunächst der Überstand aus den Wells abgenommen und verworfen. Nachdem die Wells mit PBS gewaschen wurden, wurde in jedes Well 1,5ml Trypsin gegeben. Je nach Dauer, in der sich die Zellen vom Boden des Wells ablösten, wurde zwischen 20 und 45 min mit Trypsin bei 37°C inkubiert. Der Ablösevorgang wurde durch das Hinzugeben von 2ml DC-Medium gestoppt. Die entstandene Zellsuspension wurde sorgfältig aus den Wells abpipettiert, gezählt und zentrifugiert. Um unspezifische Bindungsstellen an den Zellen zu besetzen, müssen diese zunächst mit Maus-Serum vorinkubiert werden. Pro 10⁶ Zellen war die Zugabe von 20µl Maus-Serum (1:20 mit FACS Puffer verdünnt) notwendig. Das Pellet konnte dann entsprechend der Zellzahl in dem Maus-Serum aufgenommen werden und musste anschließend 15 min. im Dunkeln und auf Eis inkubieren. Um ausreichend Volumen für das Übertragen in insgesamt 13 Wells einer 96-Well-Platte zu erhalten, musste die Zellsuspension mit FACS Puffer aufgefüllt werden. In jedem Well der 96-Well-Platte sollten 50µl der verdünnten Zellsuspension sein, so dass insgesamt ein Volumen von 650µl vorlag. Nach Überführen der Zellsuspension auf die 96-Well-Platte wurden in jedes Well 10µl eines APC-markierten Antikörpers pipettiert. Der Typ und die Spezifität der verwendeten Antikörper ist in

Tabelle 1 aufgeführt.

IgG1	CD3	CD80	CCR7	CD19	CD86	CD1a
IgG2a	HLA-DR	HLA-I	CD14			
IgG2b	CD83					

Tabelle 1: Antikörpertyp und die Spezifität der verwendeten Antikörper.

Anschließend erfolgte eine weitere Inkubation im Dunkeln und auf Eis für 15 min. Nach dem Auffüllen mit 150µl FACS Puffer pro Well, wurden die 96-Well-Platten bei 8°C für 7min. und 1400rpm zentrifugiert, kräftig abgeschüttet und wieder mit 200µl FACS Puffer aufgefüllt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt wurden die Platten erneut abgeschüttet und mit 200µl

FACS Puffer pro Well in je ein FACS-Tube überführt. Die gefüllten Tubes wurden bis zur Verwendung im Dunkeln und auf Eis gelagert.

2.3.3 Differenzierung der PBMCs zu Dendritischen Zellen

Bei den zwei übrigen 6-Well-Platten wurde nach der Inkubation über Nacht ein Medienwechsel vorgenommen. Der Überstand wurde verworfen, da die Monozyten, die sich zu dendritischen Zellen differenzieren, adhärent sind und an der 6-Well-Platte haften. Zu dem neuen DC-Medium wurde jeweils GM-CSF in einer Konzentration von 100ng/ml und IL-4 in einer Konzentration von 40ng/ml hinzugegeben. Es erfolgte eine Inkubation bei 37°C. An Tag 7 wurde bei einer der zwei übrigen 6-Well-Platten erneut ein Medienwechsel vorgenommen. Sobald die zuvor adhärennten Monozyten sich zu dendritischen Zellen differenziert haben, gehen sie in den Überstand über. Daher wurde bei diesem Medienwechsel der Überstand zunächst abgenommen, zentrifugiert und das Pellet in neuem Medium aufgenommen. Dieses wurde wieder auf die 6-Well-Platten verteilt. Dem neuen Medium wurde erneut IL-4 und GM-CSF in oben genannter Konzentration zugeführt. Zusätzlich wurde IL-1 β (10ng/ml), TNF- α (10ng/ml), IL-6 (10ng/ml) und PGE₂ (1 μ g/ml) hinzugegeben. Bei der anderen Platte wurde zusätzlich zu GM-CSF und IL-4 nur LPS in einer Konzentration von 200ng/ml zugefügt.

2.3.4 FACS Analyse

Nach einer weiteren Inkubation bei 37°C über Nacht wurden nun die reifen, dendritischen Zellen der zwei 6-Well-Platten mittels FACS analysiert. Die zwei 6-Well-Platten wurden zusammenfassend folgendermaßen behandelt:

- an Tag 1 Zugabe von GM-CSF und IL-4, an Tag 7 nach Medienwechsel Zugabe von GM-CSF, IL-4, IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE₂
- an Tag 1 Zugabe von GM-CSF und IL-4, an Tag 7 nach Medienwechsel Zugabe von GM-CSF, IL-4 und LPS.

Für die FACS Analyse musste der Überstand der Zellen abgenommen, zentrifugiert und gezählt werden. Die weiteren Schritte wurden wie unter 2.3.2 beschrieben durchgeführt.

2.4 Kokulturen

Bei dieser Versuchsreihe wurden Transwell Platten verwendet. Hierbei handelte es sich um 6-Well-Platten mit einem Durchmesser von 24mm je Well und einem Insert mit einer Größe von $4,67\text{cm}^2$. So entstand ein unteres Kompartiment und durch das Insert ein oberes Kompartiment. In das untere Kompartiment wurden 2,6ml Medium gegeben. Die Größe des Inserts war für 1,5ml Medium ausgelegt.

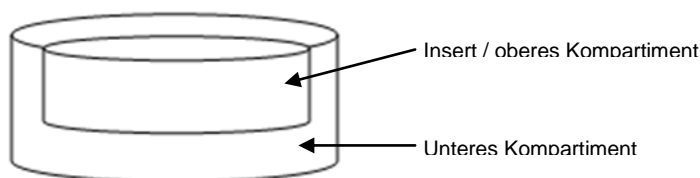


Abbildung 4: Aufbau einer Transwell Platte.

2.4.1 Herstellen von Überständen für die Kokultur-Versuche

Die Versuche der Kokulturen waren so aufgebaut, dass pro Versuch ein Blutspender einem Spender der Kieferperiostzellen zugeordnet war. Für die Versuche wurde eine Reihe von Überständen aus Kulturen mit Kieferperiostzellen benötigt. Diese wurden zunächst vor Beginn der eigentlichen Kokultur hergestellt. Hierfür wurden die entsprechenden Kieferperiostzellen der Spender, die dann auch für die Kokulturen verwendet wurden, aufgetaut, zentrifugiert und in frischem DMEM Medium aufgenommen. Von der Zellsuspension wurden anschließend jeweils 20.000 Zellen in 1,5ml in die Inserts, die zuvor aus den Transwell-Platten entnommen wurden, gegeben und für 6 Stunden bei 37°C inkubiert. Nach dieser Zeit wurden zunächst die unteren Kompartimente der Transwell-Platten mit DC-Medium versehen und

anschließend die Inserts in die Transwell-Platten gesetzt. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Überstände der Inserts abgenommen und für die spätere Verwendung der Kokulturen bei -80°C eingefroren. Im unteren Kompartiment erfolgte ein Medienwechsel mit DC-Medium inklusive GM-CSF und IL-4 in bekannter Konzentration. An Tag 3 und Tag 6 erfolgte ebenfalls ein Medienwechsel der Inserts bei dem jeweils das alte Medium abgenommen, für die Kokulturen eingefroren und durch neues DMEM ersetzt wurde. Nach Tag 6 wurden die Platten verworfen.

2.4.2 Transwell-Platten: Aufbau der Kokultur

Pro Versuch wurden drei Transwell-Platten angesetzt. In jeder Transwell-Platte befanden sich im unteren Kompartiment die isolierten PBMCs in einer bestimmten Konzentration. Um herauszufinden, ob die Ergebnisse der Kokultur-Versuche abhängig von der Zellzahl der Kieferperiozyten im Verhältnis zu den PBMCs sind, wurde in den Wells der einzelnen 6-Well-Platten mit unterschiedlichen Zellzahlen gearbeitet. Auf jeder Transwell-Platte wurden die unteren Kompartimente von zwei Wells mit jeweils 4 Millionen PBMCs und die restlichen vier Kompartimente mit jeweils 1 Million Zellen bestückt. Im oberen Kompartiment bzw. im Insert befanden sich auf einer Transwell-Platte 20.000 Kieferperiozyten pro Well, auf der zweiten. Transwell-Platte die in 2.4.1 hergestellten Überstände und auf der letzten Platte als Kontrolle nur DMEM Medium mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Fungizone.

2.4.3 Aussähen der Zellen in die Transwell-Platten

Zunächst wurde Blut in EDTA Monovetten abgenommen und die PBMCs wurden entsprechend dem Versuchsaufbau in 2.3.1 aus dem Blut isoliert. Das nach dem letzten Zentrifugationsschritt entstandene Pellet wurde in DC-Medium aufgenommen. Die Inserts wurden zunächst von den Platten entfernt und unter sterilen Bedingungen bis zum nächsten Tag bei Raumtemperatur gelagert. Wie unter 2.4.2 beschrieben, wurden auf jeder der drei Transwell-Platten die ersten beiden Wells mit jeweils 4 Millionen PBMCs versehen, die restlichen vier Wells

wurden mit jeweils 1 Million PBMCs bestückt. Abbildung 5 zeigt den Aufbau der Platten nach Aussähen der PBMCs.

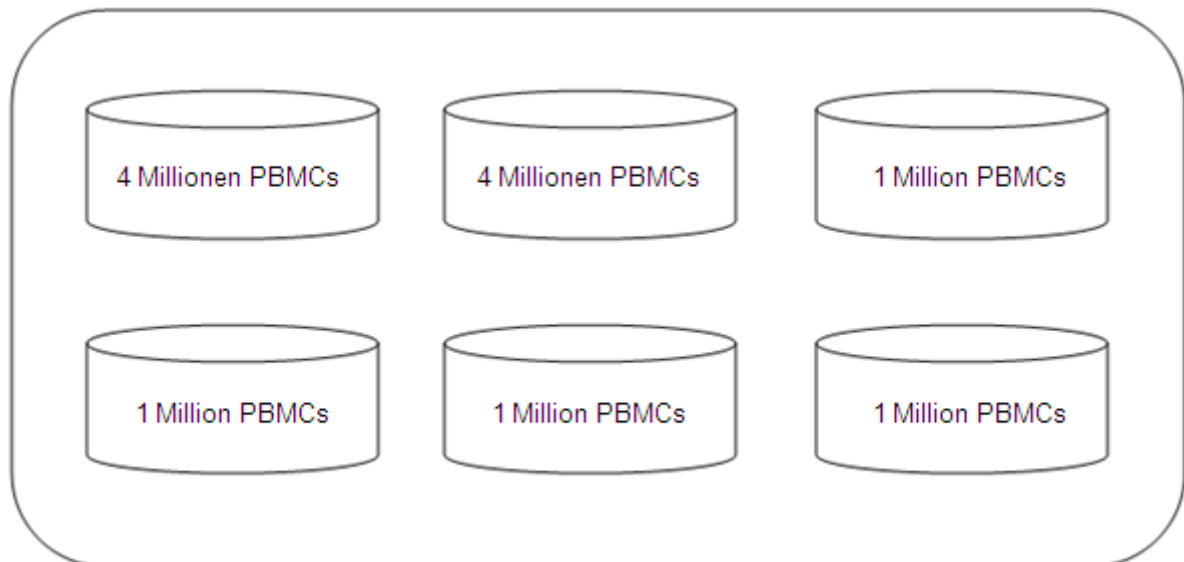


Abbildung 5: Transwell Platte ohne Insert: nur das untere Kompartiment mit der unterschiedlichen Anzahl an PBMCs.

Am nächsten Tag wurden bei allen drei Platten die Überstände des unteren Kompartiments abgenommen, nach Anzahl der PBMCs (4 Millionen bzw. 1 Million) gepoolt und bei -80°C eingefroren. Die Überstände wurden für spätere Versuche noch benötigt und daher gesammelt. In das untere Kompartiment wurde anschließend jeweils 2,6ml von neuem DC-Medium gegeben, das mit GM-CSF und IL-4 in oben genannter Konzentration versehen wurde.

Die Inserts wurden anschließend zur Verwendung in der Kokultur vorbereitet. Das entsprechende Material an Kieferperiostzellen wurde aufgetaut, zentrifugiert und in DMEM Medium mit 10% FCS, 1% Penicillin/Streptomycin und 1% Fungizone aufgenommen. In jedes Insert von einer Transwell Platte wurden 20.000 MSCs ausgesät und für 6 Stunden in den Inkubator gegeben. Nach der Inkubation konnten die Inserts in die bereits mit neuem DC-Medium versetzten unteren Kompartimente von einer der drei Transwell-Platten gesetzt werden. In die Inserts der anderen beiden Transwell-Platten wurden zum einen

die unter 2.4.1 hergestellten Überstände gegeben und zum anderen als Kontrolle nur DMEM Medium. Alle drei Transwell-Platten wurden nun bei 37°C in den Inkubator gegeben.

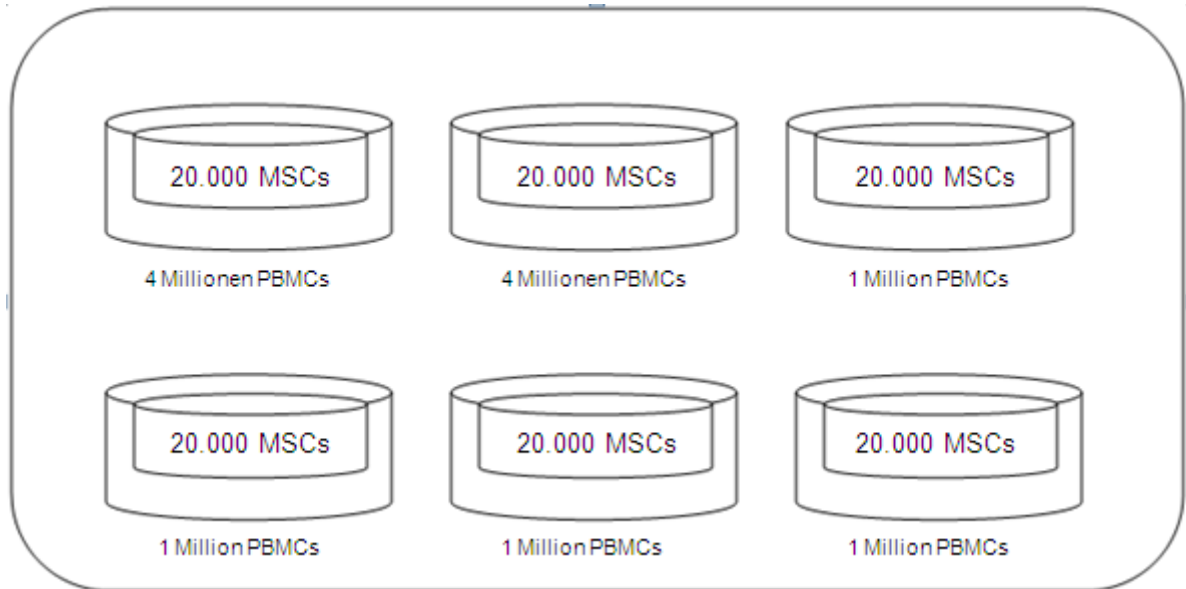


Abbildung 6: Transwell Platte im Kokultur-Versuch: Platte 1 mit jeweils 20.000 JPCs im oberen Kompartiment / Insert.

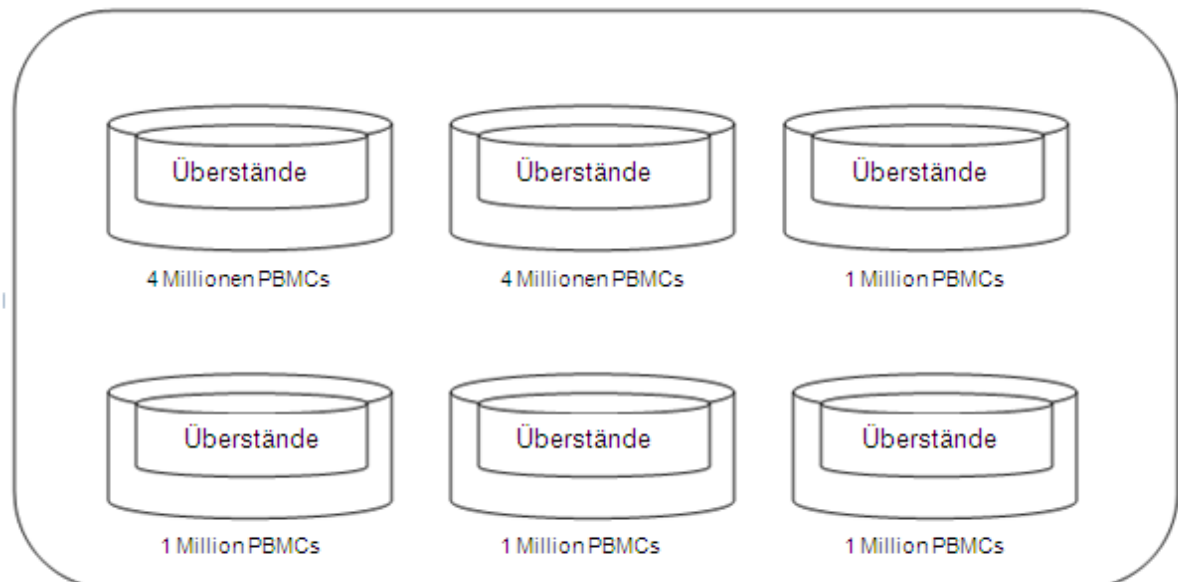


Abbildung 7: Transwell Platte im Kokultur-Versuch: Platte 2 mit den zuvor hergestellten Überständen im oberen Kompartiment / Insert.

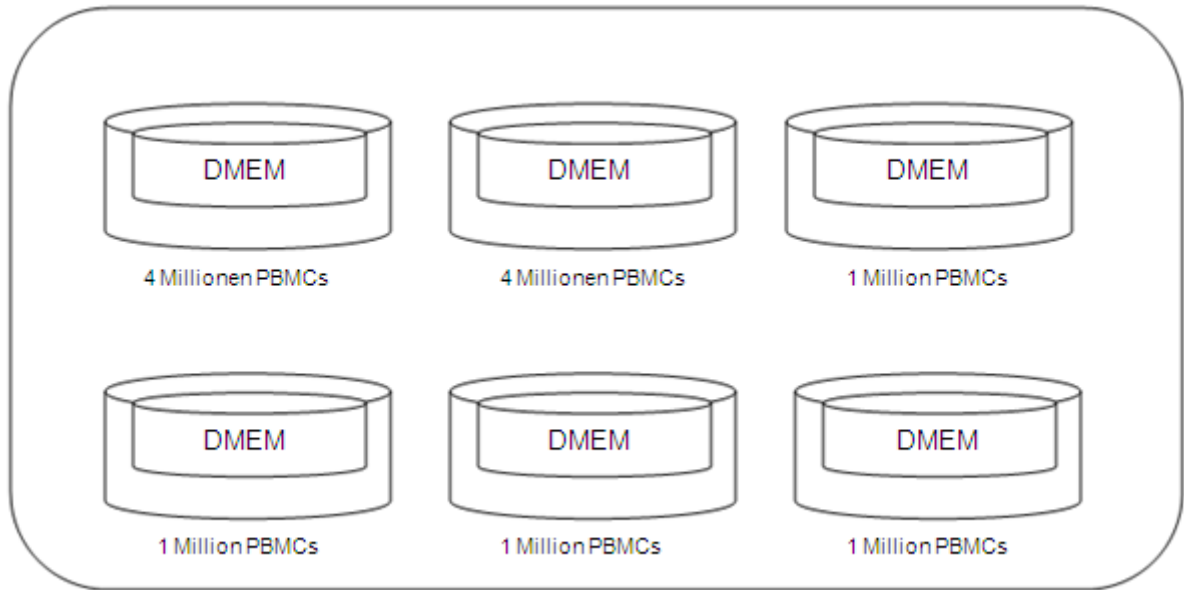


Abbildung 8: Transwell Platte im Monokultur-Versuch: Platte 3 als Kontrolle mit DMEM Medium im oberen Kompartiment / Insert.

2.4.4 Differenzierung der Zellen in der Transwell-Platte

An Tag 3 wurde ein Medienwechsel im oberen Kompartiment vorgenommen. Bei Platte 1 und 3 wurde das alte Medium abgesaugt und durch neues wie oben beschrieben zusammengesetztes DMEM Medium ersetzt. Bei Platte 2 wurde das Medium durch die zuvor hergestellten Überstände ersetzt. An Tag 6 erfolgte derselbe Medienwechsel der Inserts. Zusätzlich fand an Tag 7 ein Medienwechsel im unteren Kompartiment statt. Das abgenommene Medium des unteren Kompartiments wurde wie bereits an Tag 2 abgenommen und zunächst nach Konzentrationen der PBMCs gepoolt (1 bzw. 4 Millionen). Nach einem Zentrifugationsschritt wurden die nun zellfreien Überstände abgenommen und bei -80°C konserviert, um es für spätere Versuche verwenden zu können. Das Pellet, in dem sich eventuell schon in den Überstand übergegangene dendritische Zellen befinden, wurde in neuem DC-Medium inklusive des Cocktails mit GM-CSF, IL-4, IL-1 β , TNF- α , IL-6 und PGE $_2$ in oben genannter Konzentration aufgenommen. Die Zellsuspension konnte dann wieder in die unteren Kompartimente verteilt werden. An Tag 8 wurden die Überstände des unteren Kompartiments wieder abgenommen und zentrifugiert.

Das Zellpellet wurde für die FACS Analyse verwendet, während der Überstand nach der Zentrifugation wieder abgenommen und bei -80°C eingefroren wurde.

2.4.5 FACS Analyse der zu differenzierenden Zellen

Mit den Zellen, die in den Überstand des unteren Kompartiments übergegangen sind, wurde eine FACS Analyse durchgeführt. Zusätzlich zu den in 2.3.2 aufgeführten Antikörpern wurde als 14. Antikörper noch das DC-Sign (IgG2a) hinzugenommen.

IgG1	CD3	CD80	CCR7	CD19	CD86	CD1a
IgG2a	HLA-DR	HLA-I	CD14	DC Sign		
IgG2b	CD83					

Tabelle 2: Antikörpertyp und die Spezifität der verwendeten Antikörper.

2.5 ELISA aus den Überständen der Kokulturen

Bei den Kokultur- Versuchen wurden an den Tagen 2, 7 und 8 jeweils das Medium des unteren Kompartiments, in dem sich PBMCs/DCs befanden, abgenommen und bei -80°C eingefroren.

Diese Überstände konnten nach dem Auftauen und Zentrifugieren aliquotiert und anschließend hinsichtlich der Konzentration von Zytokinen untersucht werden.

2.5.1 ELISA: IL-12

IL-12 wird unter anderem von dendritischen Zellen produziert. Wie in der Einleitung beschrieben, führt IL-12 zu einer Aktivierung von NK-Zellen und fördert die Differenzierung von T_H1-Zellen, was somit die adaptive Immunantwort vorantreibt. Der Reifegrad der dendritischen Zellen kann indirekt über die IL-12 Konzentration ermittelt werden, der von diesen produziert wird.

Die Überstände aus dem unteren Kompartiment der Kokulturen wurden jeweils an Tag 2, Tag 7 und Tag 8 beim Medienwechsel abgenommen und bei -80°C konserviert.

Der Aufbau des Tests wurde entsprechend der Beschreibung eines „Sandwich ELISAs“ durchgeführt.

Das ELISA Kit Human IL-12 (*R&D systems*) beinhaltet folgende Komponenten:

- eine mit IL-12-Antikörpern beschichtete 96-Well-Platte,
- eine gefriergetrocknete Substanz zur Herstellung der Standardreihe,
- eine Kalibrierlösung zur Herstellung der Verdünnungsreihe des Standards („Calibrator Diluent“),
- eine Lösung zur Probenverdünnung („Assay Diluent“),
- ein Konzentrat zur Herstellung eines Waschpuffers,
- eine Lösung mit den Enzym-gekoppelten Antikörpern („Conjugate“),
- eine Substratlösung für die Farbreaktion, sowie
- eine Lösung zum Stoppen der Farbreaktion.

Vorbereitungen:

- Die Überstände, die nach der Abnahme aus der Zellkultur zentrifugiert und bei -80°C eingefrorenen wurden, mussten zunächst wieder aufgetaut werden.
- Herstellung des Waschpuffers: 20ml des Waschpuffer-Konzentrats wurden mit 500ml destilliertem Wasser gemischt.
- Mischen der Verdünnungslösung für die Standard-Verdünnungsreihe: 20ml „Calibrator Diluent“ + 80ml destilliertes Wasser.
- Herstellen der Ausgangslösung für die Standard-Verdünnungsreihe: Auflösen der gefriergetrockneten Substanz mit 5ml „Calibrator Diluent“. Es entsteht eine Ausgangslösung mit einer IL-12 Konzentration von 500pg/ml.

Herstellen der Standard-Verdünnungsreihe:

Die Verdünnungsreihe besteht aus acht verschiedenen Proben. Im ersten Röhrchen befand sich die unverdünnte Ausgangslösung. In jedes weitere Röhrchen wurden 500µl des „Calibrator Diluents“ vorgegeben. Nun wurden 500µl der Ausgangslösung in das erste Röhrchen mit den 500µl „Calibrator Diluent“ gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurden von der

Lösung des zweiten Röhrchens wiederum 500µl in das dritte Röhrchen gegeben. Dieser Vorgang wiederholte sich bis zum siebten Röhrchen. Im achten Röhrchen wurde nur der „Calibrator Diluent“ belassen.

Die Standard-Verdünnungsreihe sollte demnach folgendermaßen aussehen:

Standard	1	2	3	4	5	6	7	8
Konzentration in pg/ml	500	250	125	62,5	31,3	15,6	7,8	0

Tabelle 3: Standard-Verdünnungsreihe für den IL-12 ELISA.

Versuchsaufbau:

- In jedes benötigte Well der 96-Well-Platte wurde 50µl der Probenverdünnung („Assay Diluent“) gegeben.
- In jedes Well wurde jeweils 200µl der Standards bzw. der Proben gegeben. Alle Proben wurden in Duplikaten auf die Platte aufgetragen.
- Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur.
- Es folgten drei Waschschrirte. Hierbei mussten jeweils zunächst die Lösungen aus der Platte abgeschüttet werden, bevor jedes Well mit 400µl des hergestellten Waschpuffers aufgefüllt wurde. Es erfolgte eine Zentrifugation bei 8°C und 1400rpm für 7 min.
- Anschließend wurde in jedes Well 200µl des IL-12 „Konjugates“ pipettiert.
- Inkubation für 2 Stunden bei Raumtemperatur.
- Es folgten drei weitere Waschschrirte wie oben beschrieben.
- Nun mussten in jedes Well 200µl der Substratlösung gegeben werden.
- Inkubationszeit für 20 min. bei Raumtemperatur im Dunkeln.
- Als letzter Schritt muss nun die Stop-Lösung hinzugegeben werden. Hierbei findet der Farbumschlag von blau zu gelb statt.
- Innerhalb von 30 min. sollte nun die Messung mit einem Photometer bei einer Wellenlänge von 450nm stattfinden.

2.5.2 ELISA IL-6 und ELISA TNF- α

Analog zu dem oben beschriebenen Aufbau des ELISAs zu IL-12, wurde ebenso mit den abgenommenen Überständen aus den Kokulturen ein ELISA zur Untersuchung des Zytokins IL-6 und einer zur Untersuchung von TNF- α durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Nachweis von Kieferperiostzellen

3.1.1 Alizarinfärbung zum Nachweis von Kalziumpräzipitaten im Knochengewebe

Die Zellen aus dem Kieferperiost wurden zunächst mit Hilfe von Ascorbinsäure, Dexamethason und β -Glycerolphosphat zu Knochengewebe differenziert. Es folgte eine Färbung der 6-Well-Platten und der angesetzten Kontrollplatten. Die Alizarinfärbung (färbt die Kalziumphosphatpräzipitate) ergab folgendes Ergebnis:

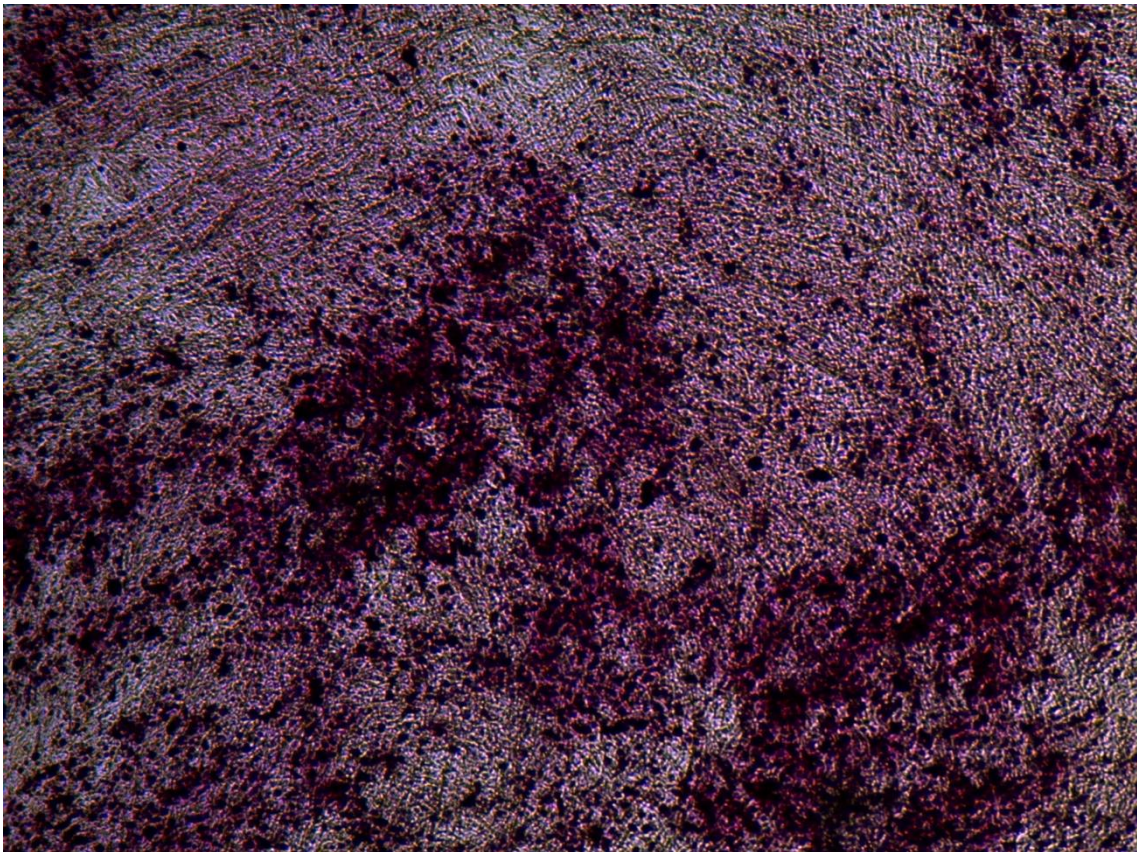


Abbildung 9: Repräsentatives Bild einer Alizarinfärbung von Kieferperiostzellen nach osteogener Induktion: Tag 41.



Abbildung 10: Repräsentatives Bild einer Alizarinfärbung von Kieferperiostzellen ohne osteogene Induktion: Tag 41.

In Abbildung 9 ist die starke rötliche Färbung deutlich zu erkennen. Diese kommt durch die Kalziumphosphatpräzipitate zustande, die von differenzierten Kieferperiostzellen gebildet werden. Im Vergleich hierzu ist auf Abbildung 10 bei den nicht osteogen induzierten Zellen keine rötliche Färbung und damit kein Nachweis von Knochensubstanz gegeben.

3.1.2 Alkalische Phosphatase - Färbung zum Nachweis von Knochensubstanz

Das Enzym alkalische Phosphatase spielt während der Knochenbildung eine wichtige Rolle. Ihr Vorkommen kann als Nachweis von Knochensubstanz gesehen werden. Es erfolgte eine Färbung zum Nachweis der Enzymaktivität der alkalischen Phosphatase.



Abbildung 11: Nachweis der Aktivität der alkalischen Phosphatase in osteogen induzierten Kieferperiostzellen an Tag 21 (repräsentatives Bild).

Auf Abbildung 11 sieht man die Zellen nach osteogener Induktion. Der rötlich-lila farbene Niederschlag ist deutlich zu erkennen. Auf Abbildung 12 sieht man die Kontrollprobe ohne osteogene Induktion und ohne den typischen roten Niederschlag, der mit Hilfe des Enzyms alkalische Phosphatase als Produkt eines Reaktionsschrittes entsteht.

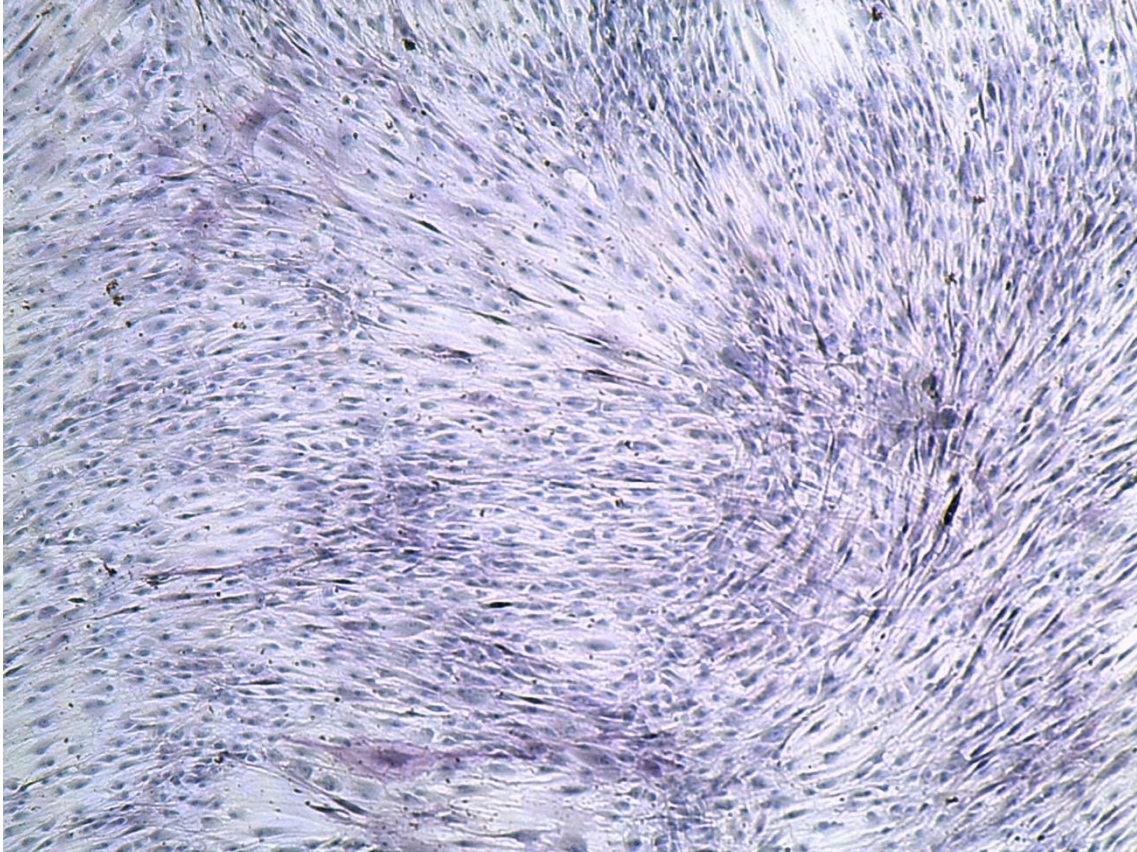


Abbildung 12: Nachweis der alkalischen Phosphatase in Kieferperiostzellen ohne osteogene Induktion an Tag 21 (repräsentatives Bild).

3.1.3 Nachweis der PGE₂ und IDO Konzentration in den Überständen der Zellkultur

Mit den Überständen der Zellkultur zur osteogenen Induktion wurde jeweils eine Analyse hinsichtlich der Faktoren PGE₂ und IDO durchgeführt. Beide nehmen eine entscheidende Rolle für das immunsuppressive Milieu ein. Die Versuchsdurchführung wurde mit je vier JPC-Proben dreimal wiederholt. Pro Probe wurde jeweils an Tag 7, Tag 14 und Tag 21 der Überstand aus den 6-Well-Platten entnommen, eingefroren und später für die Analyse verwendet.

Messung von PGE₂

Die Messung des Faktors erfolgte anhand eines ELISAs.

	Tag 7		Tag 14		Tag 21	
	Kontrolle	Osteogene Induktion	Kontrolle	Osteogene Induktion	Kontrolle	Osteogene Induktion
Patient 1	221,95	0,90	50,22	0,00	0,00	0,00
Patient 2	238,45	4,49	44,59	21,20	0,00	0,00
Patient 3	200,52	305,26	0,00	0,00	1,75	0,00
Patient 4	377,00	315,41	81,46	14,09	0,00	0,00
Mittelwert	259,48	156,51	44,07	8,82	0,44	0,00

Tabelle 4: Konzentration von PGE₂ in pg/ml: Mittelwerte aus drei Versuchsreihen mit je vier Proben.

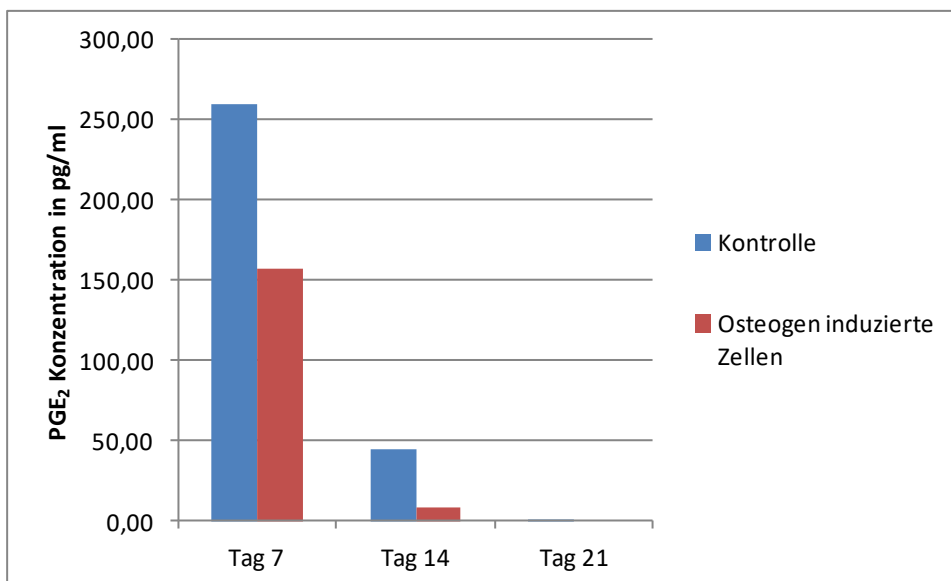


Abbildung 13: Ermittlung der Konzentration von PGE₂ in pg/ml: Mittelwerte aus allen vier JPC-Proben. Aufgrund der sehr hohen Standardabweichung wurde diese nicht ins Diagramm eingefügt.

Tabelle 4 zeigt die Mittelwerte aus den drei Versuchsreihen je JPC-Probe und ebenfalls die Mittelwerte aus allen vier Proben.

Abbildung 13 zeigt diese Mittelwerte im Balkendiagramm. Aufgrund der sehr hohen Standardabweichung wurde diese nicht ins Diagramm eingefügt.

Anhand der Mittelwerte ist deutlich zu erkennen, dass PGE_2 vor allem zu Beginn der Zellkultur (geringe Zelldichte) verstärkt ausgeschüttet wird. An der Kontrolle ist zu sehen, dass die Kieferperiostzellen im nicht osteogen induzierten Zustand ebenfalls mehr PGE_2 sezernieren, wenn alle vier Proben berücksichtigt werden. Wenn jedoch nur Probe 3 und 4 der osteogen stimulierten Proben in Betracht gezogen werden, sind die PGE_2 Konzentrationen in den osteogenen Proben etwas höher. An Tag 21 ist PGE_2 weder in der Kontrolle noch in der Kultur mit der osteogenen Induktion nachweisbar. Bei Betrachtung der einzelnen Proben fällt auf, dass die Sezernierung von PGE_2 individuell stark schwanken kann. So sind bei den osteogen induzierten Proben 1 und 2, auch schon an Tag 7 nur minimale PGE_2 Levels zu messen. Bei Proben 3 und 4 sind die Werte näherungsweise entsprechend den Werten der Proben in der Kontrolle.

Messung von IDO

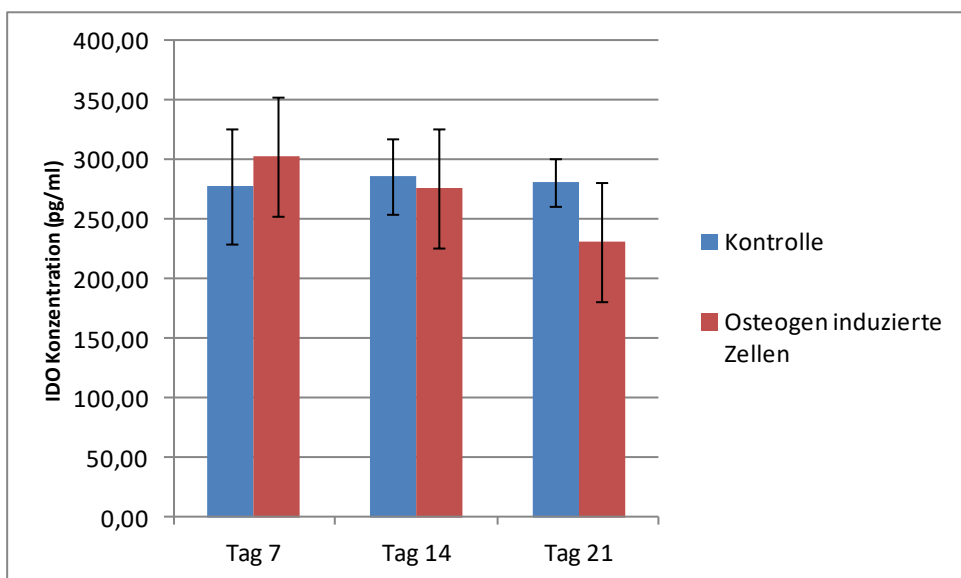


Abbildung 14: Ermittlung der IDO Konzentration in pg/ml: die Mittelwerte sowie die Standardabweichung aus allen vier JPC-Proben sind im Diagramm abgebildet.

	Tag 7		Tag 14		Tag 21	
	Kontrolle	Osteogene Induktion	Kontrolle	Osteogene Induktion	Kontrolle	Osteogene Induktion
Probe 1	210,90	376,35	263,59	330,40	254,22	253,80
Probe 2	281,23	183,45	323,53	307,31	279,86	242,30
Probe 3	323,00	340,83	300,59	207,55	285,88	151,36
Probe 4	296,89	311,63	257,36	260,10	303,61	274,73
Mittelwert	278,00	303,06	286,27	276,34	280,89	230,55
Standardabweichung	47,94	84,02	31,32	54,40	20,44	54,47

Tabelle 5: Konzentration von IDO in pg/ml: Mittelwerte aus drei Versuchsreihen mit je vier Proben

Die Konzentration des Enzyms IDO zeigt im Vergleich zu PGE₂ ein anderes Bild.

Tabelle 5 zeigt die IDO Konzentrationen in pg/ml als Mittelwerte aus drei Versuchen pro Probe, sowie die dazugehörigen Mittelwerte jeweils für die Kontrolle und für die Kultur mit osteogener Induktion der Kieferperiostzellen. In Abbildung 14 sind die Mittelwerte der IDO Konzentrationen in pg/ml aus den vier Proben im Balkendiagramm dargestellt. Insgesamt ist kein signifikanter Unterschied bezüglich der Kontrolle und der Kultur mit osteogenem Medium zu erkennen.

3.2 Nachweis von dendritischen Zellen

Zum Nachweis von dendritischen Zellen wurden zunächst Monozyten aus dem peripheren Blut isoliert und in drei verschiedenen Versuchen angesetzt.

Folgende Versuche wurden in 6-Well-Platten angesetzt:

- Erste Platte: FACS Analyse nach Inkubation über Nacht ohne Induktion: durchflusszytometrische Messung an Tag 2
- Zweite Platte: nach 7 Tagen und Behandlung mit GM-CSF, IL-4, IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE₂: FACS Analyse an Tag 8
- Dritte Platte: nach 7 Tagen und Behandlung mit GM-CSF, IL-4 und LPS: FACS Analyse ebenfalls an Tag 8

Der Versuchsaufbau wurde jeweils mit Blut von drei verschiedenen Spendern durchgeführt. Tabelle 6 zeigt eine Übersicht der Analyse der Oberflächenmarker aus allen drei Blutproben gemittelt jeweils an Tag 2 (Platte 1) ohne Differenzierung zu dendritischen Zellen und an Tag 8 nach der Zugabe von Zytokinen (Platten 2 und 3), welche die Ausreifung der PBMCs zu dendritischen Zellen anregen sollen.

	CD80	CD 83	CD86	HLA I	HLA-DR	CD14	CCR7	CD3
1. Platte	12,37	26,33	39,50	97,47	33,07	24,70	53,47	56,77
2. Platte	42,83	38,87	48,43	95,33	32,67	11,00	84,20	63,33
3. Platte	29,87	43,57	41,13	95,43	34,43	3,10	67,30	60,10

Tabelle 6: Durchflusszytometrisch ermittelter Anteil an positiven Zellen (Mittelwert in %) für die aufgeführten Oberflächenmarker. Erste Platte: Messung vor der dendritischen Zelldifferenzierung. Zweite Platte: Messung nach der DC Differenzierung mit dem zweiten Zytokincocktail. Dritte Platte: Messung nach der DC-Differenzierung mit LPS.

Oberflächenmarker CD80:

CD80 ist ein Marker, der vor allem auf der aktivierten dendritischen Zelle vorkommt. Bei der Analyse an Tag 2 (erste Platte) ist daher ein niedriger Wert zu erwarten, da sich vorrangig Monozyten auf der Platte befinden sollen, die nach Inkubation über Nacht adhärent wurden und dann mittels Durchflusszytometrie analysiert wurden. An Tag 8 ist mit einer erhöhten Expression zu rechnen, da durch die entsprechende Stimulation mit Zytokinen die Ausreifung von dendritischen Zellen angeregt werden sollte. Dies spiegelt sich insbesondere in dem Ergebnis der zweite Platte wider, bei der die Zellen mit GM-CSF, IL-4, IL-1 β , TNF- α , IL-6 und PGE₂ behandelt wurden. Eine Induktion mit LPS anstatt IL-1 β , TNF- α , IL-6 und PGE₂ zeigt allerdings weniger Wirkung.

Abbildung 15 zeigt repräsentativ das Dot Plot bei der FACS Analyse von Blutprobe 1. Die gewünschte Zellpopulation ist markiert. Durch die Markierung soll verhindert werden, dass andere als die gewünschten Zellen untersucht werden. Mithilfe des Forward Scatters wird die Zellgröße, mittels Side Scatter die Granularität der Zelle ermittelt.

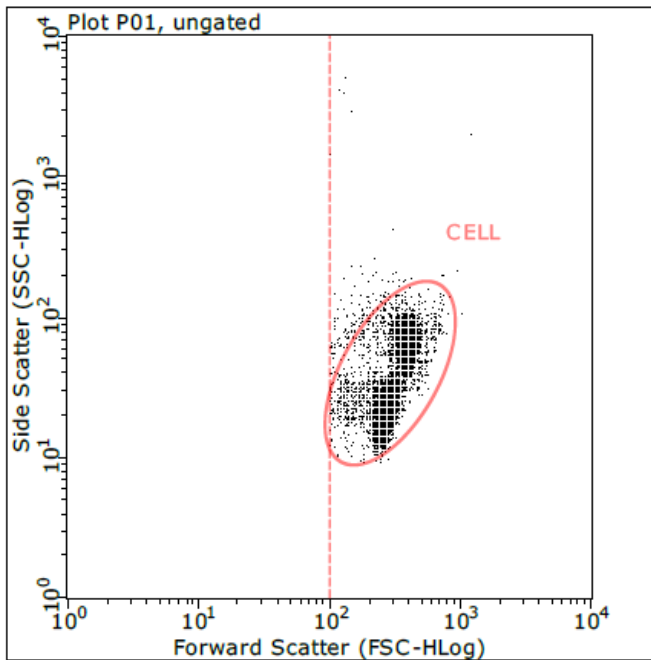


Abbildung 15: Dot Plot undifferenzierter Blutmonozyten, Blutprobe 1, Platte 1.

Tabelle 7 gibt eine Übersicht über die Expression des Markers CD80 aus Blutprobe 1. Abbildung 16 zeigt das Histogramm der Zellanalyse der ersten Platte. Die X-Achse stellt die Fluoreszenzintensität dar, während auf der Y-Achse die Zellzahl zu sehen ist. Der rote Balken zeigt die Anzahl positiver Zellen. Hier ist die Zellpopulation mit dem Balken markiert, die an Tag 2 positiv ist. Sie liegt in diesem Fall bei 0,7% und ist damit nur unwesentlich höher als die CD80 Expression der Isotypkontrolle (Abbildung 16). Abbildung 17 zeigt die Verschiebung des FACS-Histogramms und damit die Zunahme der Fluoreszenzintensität, die sich in der Anzahl CD80-positiver Zellen (50,8%) widerspiegelt.

Blutprobe 1	CD80
Platte 1: Tag 2	0,70
Platte 2: Tag 8	50,80
Platte 3: Tag 8	30,60

Tabelle 7: Anteil CD80-positiver Zellen (in %) am Beispiel von Blutprobe 1 vor und nach der DC-Differenzierung mittels Zytokincocktail oder LPS.

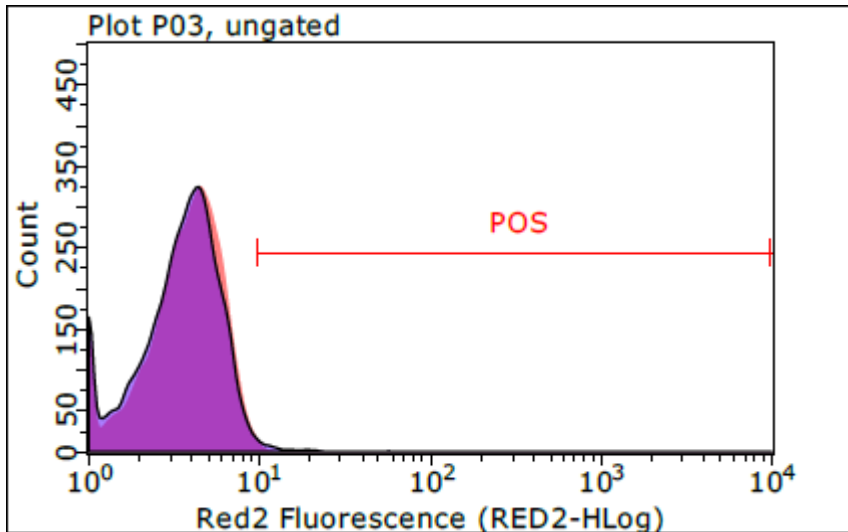


Abbildung 16: Repräsentatives Histogramm der CD80 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 1 (vor DC Differenzierung).

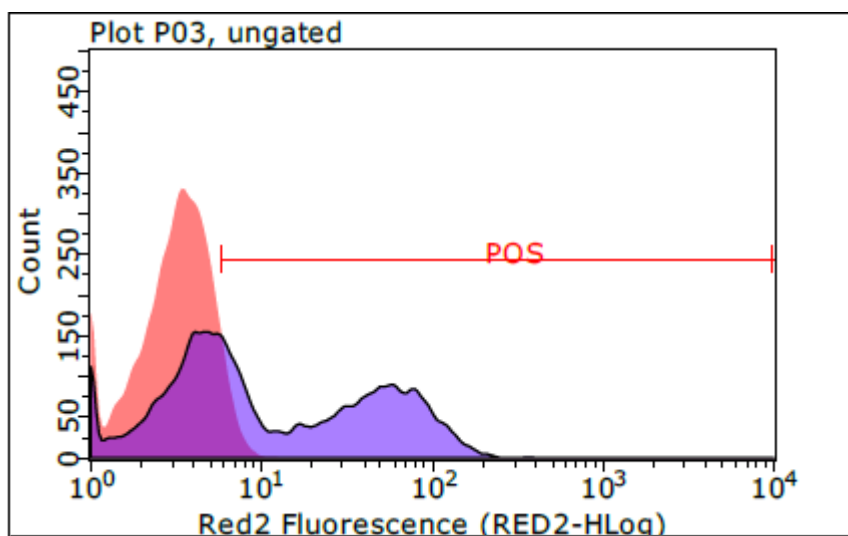


Abbildung 17: Repräsentatives Histogramm der CD80 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 2 (nach DC Differenzierung).

Oberflächenmarker CD83

Dieser Oberflächenmarker wird ebenfalls von dendritischen Zellen, aber auch von aktivierten T-Zellen exprimiert. Aus Tabelle 6 ist zu entnehmen, dass die CD83 Expression nach Zytokin- und LPS-Stimulation leicht bzw. auf das Doppelte ansteigt. Dieser Oberflächenmarker ist die einzige Ausnahme, bei dem die LPS Stimulation sich wirksamer als die Zytokin-Kombination erwies.

Tabelle 8 zeigt Mittelwerte der CD83 Expression von Blutprobe 3. Abbildung 18 und Abbildung 19 zeigen die Histogramme zur ersten und dritten Platte der Blutprobe 3.

Blutprobe 3	CD83
Platte 1: Tag 2	34,10
Platte 2: Tag 8	45,60
Platte 3: Tag 8	61,00

Tabelle 8: Anteil CD83-positiver Zellen (in %) am Beispiel von Blutprobe 1 vor und nach der DC-Differenzierung mittels Zytokincocktail oder LPS.

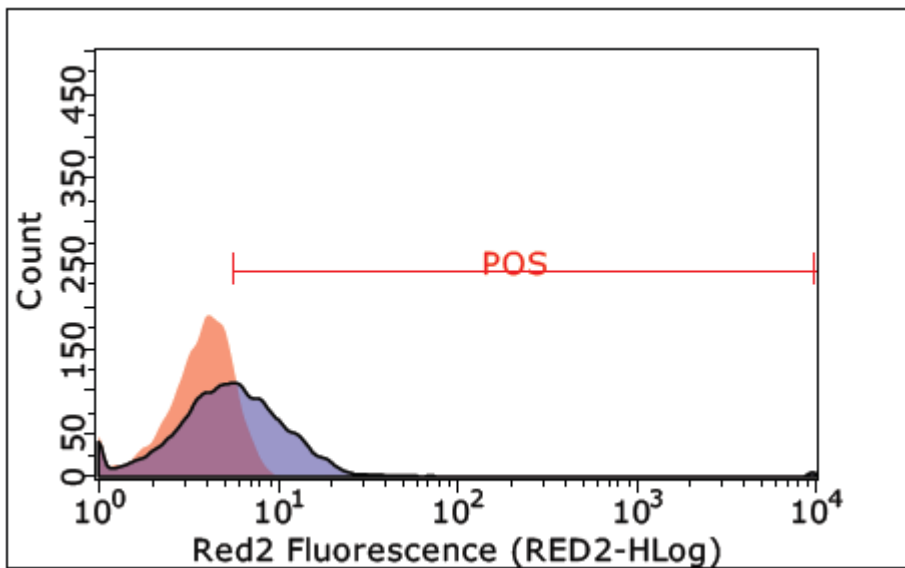


Abbildung 18: Repräsentatives Histogramm der CD83 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 1 (vor DC Differenzierung).

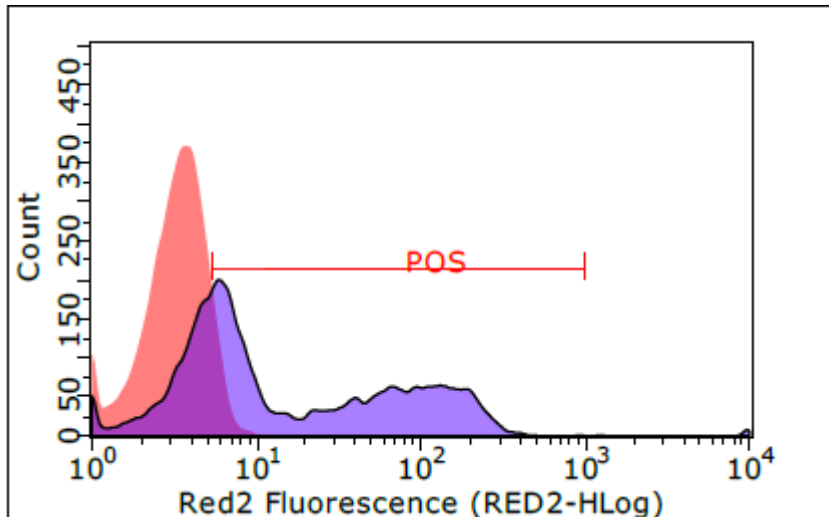


Abbildung 19: Repräsentatives Histogramm der CD83 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 3 (nach DC Differenzierung mit LPS).

Oberflächenmarker CD86

Vor allem dendritische Zellen aber auch Monozyten tragen CD86 auf ihrer Oberfläche. Somit sollten an Tag 2 auf der ersten Platte wenige positive Zellen vorhanden sein. An Tag 8 auf Platte 2 und 3 sollte die Anzahl positiver Zellen ansteigen. Wir sehen in Tabelle 6, dass die Mittelwerte aus allen drei Blutproben nur minimal diesen Effekt zeigen. Betrachtet man jedoch die Werte der einzelnen Blutproben, so sieht man den Anstieg der positiven Zellen nach der Induktion. Tabelle 9 zeigt die Übersicht der Werte aus Blutprobe 1. Vor allem auf Platte 2, bei der die Zellen ohne LPS zur Differenzierung angeregt wurden, zeigen sich etwa dreimal so viele positive Zellen als vor der Differenzierung. Die entsprechenden Histogramme zur CD86 Expression auf Zellen der Platte 1 und 2 zeigen Abbildung 20 und Abbildung 21. Der Abbildung 21 ist eindeutig zu entnehmen, dass ein Teil der stimulierten Zellen eine geringe CD86 Expression zeigen, während eine zweite und größere Zellpopulation sehr stark für CD86 positiv ist.

Blutprobe 1	CD86
Platte 1: Tag 2	21,50
Platte 2: Tag 8	64,40
Platte 3: Tag 8	48,20

Tabelle 9: Anteil CD86-positiver Zellen (in %) am Beispiel von Blutprobe 1 vor und nach der DC-Differenzierung mittels Zytokincocktail oder LPS.

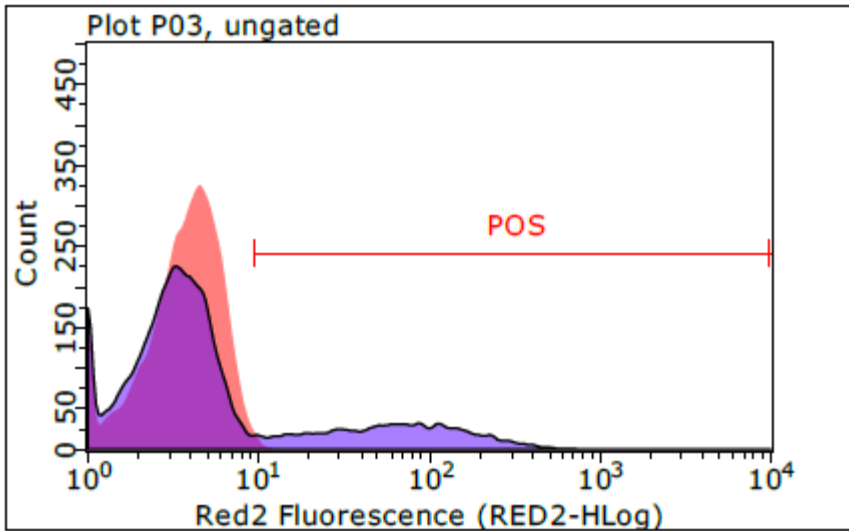


Abbildung 20: Repräsentatives Histogramm der CD86 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 1 (vor DC Differenzierung).

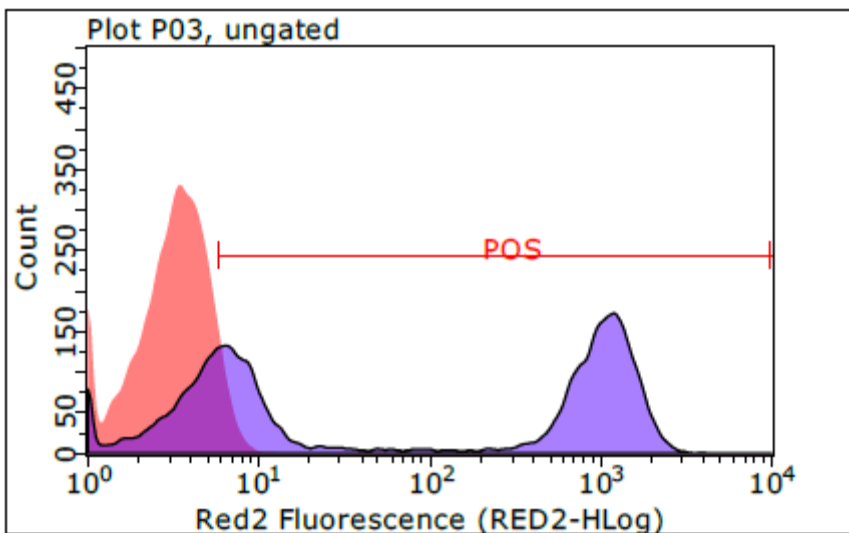


Abbildung 21: Repräsentatives Histogramm der CD86 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 1 (nach DC Differenzierung). Zwei Populationen, die sich hinsichtlich der CD86 Expression deutlich voneinander unterscheiden, sind sichtbar.

Oberflächenmarker HLA-I

Dieser Marker ist auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden. Dementsprechend sollten in allen Proben die Zellen hoch positiv für diesen Marker ausfallen. Wie in Tabelle 6 ersichtlich, ist dies der Fall. Beispielhaft ist in Abbildung 22 ein Histogramm von Zellen vor der DC-Differenzierung und in Abbildung 23 ein Histogramm von Zellen nach DC-Differenzierung.

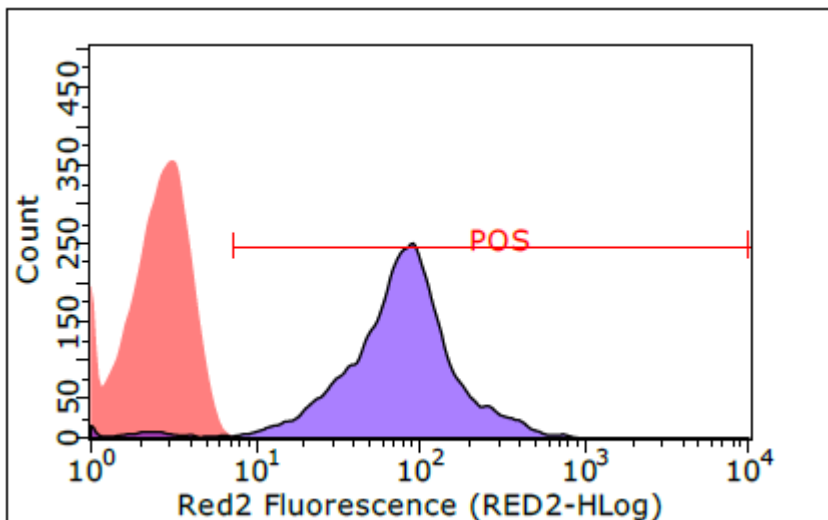


Abbildung 22: Repräsentatives Histogramm der HLA-I Oberflächenexpression in Blutprobe 2, Platte 1 (vor DC Differenzierung).

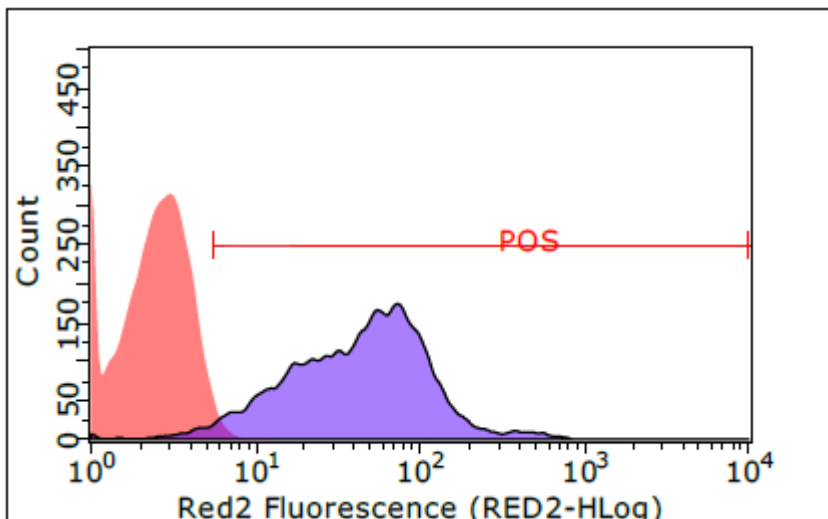


Abbildung 23: Repräsentatives Histogramm der HLA-I Oberflächenexpression in Blutprobe 2, Platte 2 (nach DC Differenzierung).

Oberflächenmarker HLA-DR

HLA-DR entspricht dem MHC-II Molekül, das vor allem auf APCs im aktivierten Zustand exprimiert wird und zur T-Helferzell-Aktivierung beiträgt. Analog zu dem Marker CD86 sind dementsprechend wenige positive Zellen an Tag 2, sowie ein Anstieg dieser an Tag 8 zu erwarten. Tabelle 6 kann entnommen werden, dass sich die Mittelwerte der HLA-DR Expression von Platte 2 und 3 kaum unterscheiden. Betrachtet man allerdings gesondert die Anzahl der HLA-DR positiven Zellen vor und nach der dendritischen Differenzierung, zeigt sich ein Anstieg auf das Doppelte an positiven Zellen.

Tabelle 10 zeigt die Übersicht der Werte aus Blutprobe 1. Abbildung 24 und Abbildung 25 zeigen die entsprechenden Histogramme der Zellen aus Platte 1 und 2 von Blutprobe 1.

Blutprobe 1	HLA-DR
Platte 1: Tag 2	29,80
Platte 2: Tag 8	41,50
Platte 3: Tag 8	45,50

Tabelle 10: Anteil HLA-DR-positiver Zellen (in %) am Beispiel von Blutprobe 1 vor und nach der DC-Differenzierung mittels Zytokincocktail oder LPS.

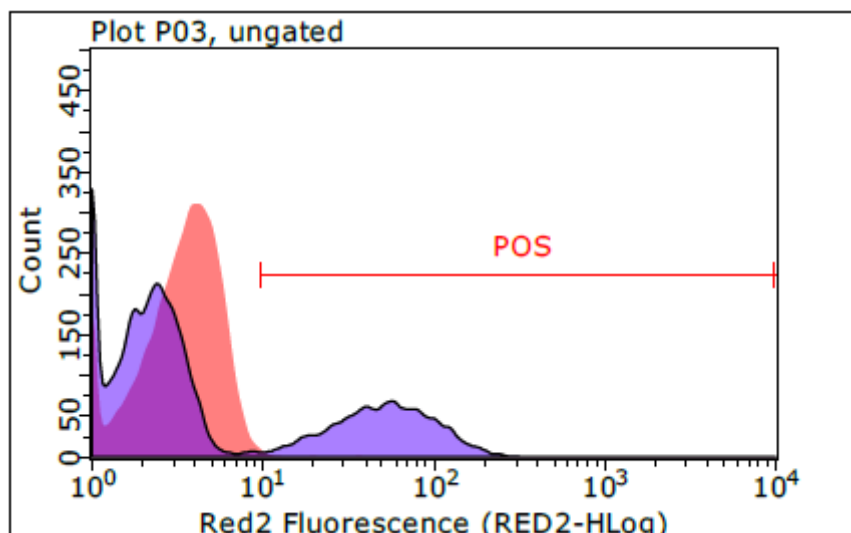


Abbildung 24: Repräsentatives Histogramm der HLA-DR Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 1 (vor DC Differenzierung).

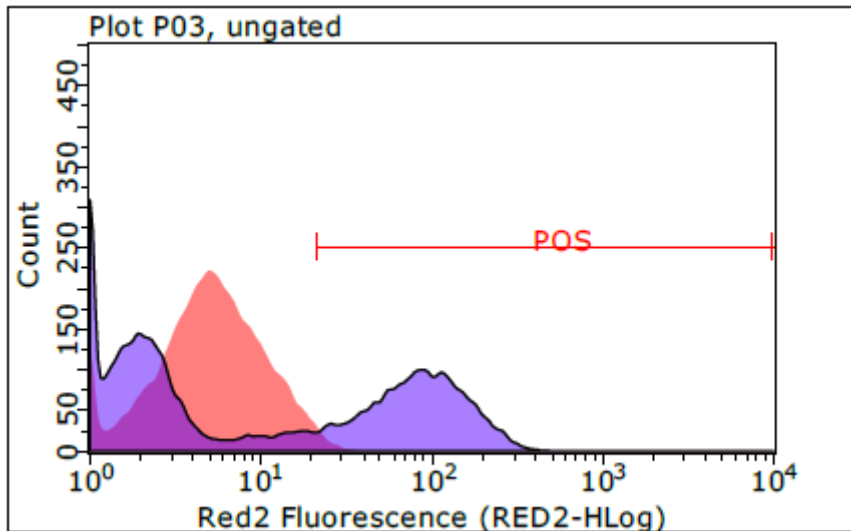


Abbildung 25: Repräsentatives Histogramm der HLA-DR Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 3 (nach DC Differenzierung).

Oberflächenmarker CD14

Der Oberflächenmarker CD14 wird von unreifen Monozyten exprimiert. Daher sollte zunächst der Anteil an positiven Zellen an Tag 2 relativ hoch sein, da hier noch die undifferenzierten Monozyten in der Zellkultur vorhanden sind. Nach Zugabe der Zytokine zur Induktion der Reifung von dendritischen Zellen, sollten diese Werte an Tag 8 schließlich wieder sinken. Tabelle 6 zeigt, dass dieser Effekt, wenn er gemittelt wird, nur leicht ausgeprägt ist. Die Werte sinken von 24,7% zu 11,0% bzw. 3,1%. Dennoch fällt auch hier wieder bei Betrachtung nur einzelner Blutproben auf, dass die Abnahme der CD14 Expression stärker ausfällt. Als Beispiel hierfür sind in Tabelle 11 die Analyse der Zellen aus Blutprobe 1 zu sehen und entsprechend in Abbildung 26 und Abbildung 27 die Histogramme für die CD14 Expression vor und nach dendritischer Zelldifferenzierung. In diesen Zellen sinkt die CD14 Expression nach Zytokinstimulation von nahezu 40% auf 0%. Dieses Ergebnis ist sehr deutlich in den FACS-Histogrammen abgebildet.

Blutprobe 1	CD14
Platte 1: Tag 2	39,10
Platte 2: Tag 8	0,50
Platte 3: Tag 8	9,50

Tabelle 11: Anteil CD14-positiver Zellen (in %) am Beispiel von Blutprobe 1 vor und nach der DC-Differenzierung mittels Zytokincocktail oder LPS.

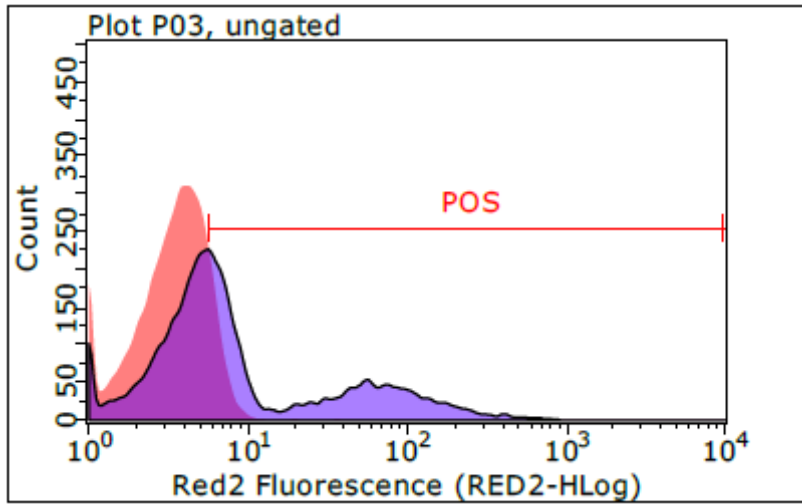


Abbildung 26: Repräsentatives Histogramm der CD14 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 1 (vor DC Differenzierung).

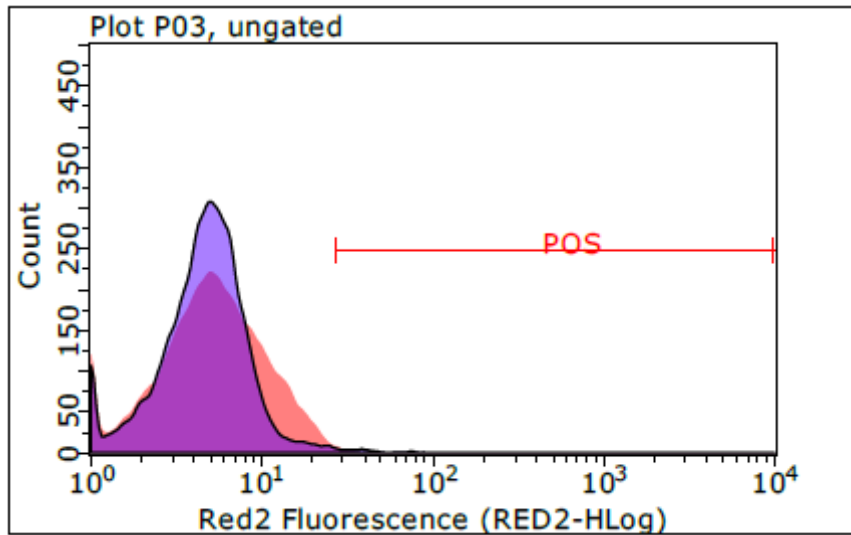


Abbildung 27: Repräsentatives Histogramm der CD14 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 2 (nach DC Differenzierung).

Oberflächenmarker CCR7:

Der Oberflächenmarker CCR7 wird von dendritischen Zellen, aber auch von T- und B-Zellen an der Oberfläche exprimiert. Zu den PBMCs gehören außer den Monozyten auch die Lymphozyten. Nach der Inkubation über Nacht sollten durch das Abnehmen des Überstandes und die ausschließliche Verwendung der adhärenen Zellen, die die Monozyten darstellen sollen, auch nur diese mittels Durchflusszytometrie analysiert werden. Tabelle 12 zeigt eine Übersicht der CCR7-positiven Zellen beispielhaft anhand Blutprobe 3. Die Messung an Tag 2 (Zelladhärenz über Nacht) ergab 53,48% CCR7-positive Monozyten (Abb. 20). Dennoch sieht man nach Behandlung der Zellen bis Tag 8 einen Unterschied. Auch bezüglich dieses Oberflächenmarkers scheint der Zytokin-Mix auf Platte 2 mit 82,7% positiven Zellen eine bessere Wirkung zu zeigen als auf Platte 3 mit nur 55,6% positiven Zellen. Abbildung 29 zeigt die Markerexpression derselben Blutprobe von Platte 2 nachdem die Zellen mit GM-CSF, IL-4, IL-1 β , TNF- α , IL-6 und PGE₂ behandelt und an Tag 8 mittels FACS analysiert wurde.

Blutprobe 3	CCR7
Platte 1: Tag 2	41,10
Platte 2: Tag 8	82,70
Platte 3: Tag 8	55,60

Tabelle 12: Anteil CCR7-positiver Zellen (in %) am Beispiel von Blutprobe 3 vor und nach der DC-Differenzierung mittels Zytokincocktail oder LPS.

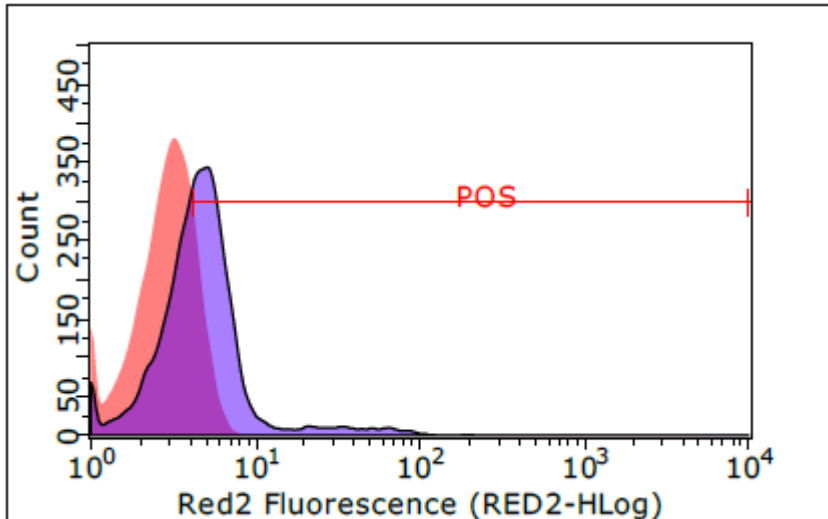


Abbildung 28: Repräsentatives Histogramm der CCR7 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 1 (vor DC Differenzierung).

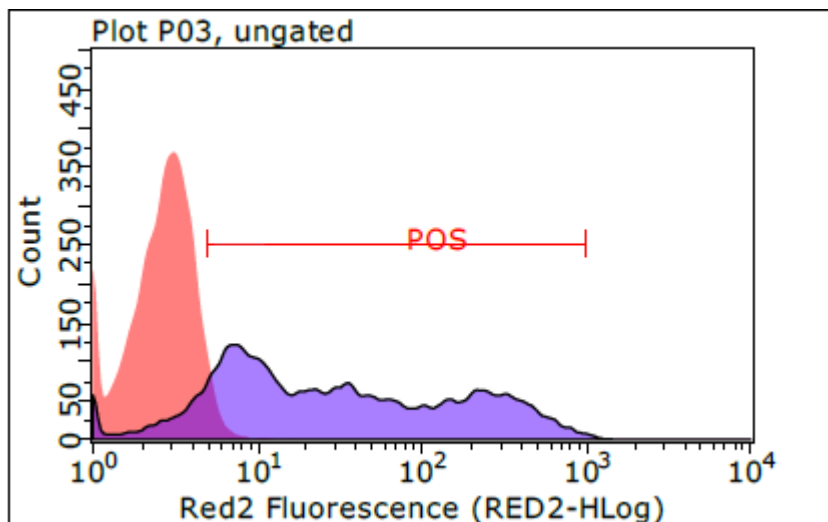


Abbildung 29: Repräsentatives Histogramm der CCR7 Oberflächenexpression in Blutprobe 1, Platte 2 (nach DC Differenzierung).

Oberflächenmarker CD3:

CD3 ist ein Oberflächenmarker der T-Zellen. Man erwartet in diesem Versuch daher einen negativen Wert sowohl vor der Differenzierung, als auch danach. Tabelle 13 zeigt die Übersicht dieser Werte. Auffallend ist, dass sowohl vor als auch nach der Differenzierung positive Zellen in der Kultur vorhanden sind. Ob die Differenzierung mit dem Zytokincocktail oder LPS stattgefunden hat zeigte ebenfalls keine Unterschiede.

	CD3
Platte 1: Tag 2	56,77
Platte 2: Tag 8	63,33
Platte 3: Tag 8	60,10

Tabelle 13: Anteil CD3-positiver Zellen (in %) vor und nach der DC-Differenzierung mittels Zytokincocktail oder LPS.

3.3 Einfluss von Kieferperioztzellen auf die Ausreifung von dendritischen Zellen

Um herauszufinden welche PBM Zellzahl sich für die Kokultur am besten eignet, erfolgte der Versuchsaufbau mit unterschiedlicher Zelldichte. Zur Auswertung sind somit Daten aus folgenden Ansätzen vorhanden:

- Kokultur aus 4 Millionen PBMCs im unteren Teil der Wells und 20.000 Kieferperioztzellen im Insert
- Kokultur aus 1 Million PBMCs im unteren Teil der Wells und 20.000 Kieferperioztzellen im Insert
- Kokultur aus 4 Millionen PBMCs im unteren Teil der Wells und die Überstände aus dem Versuch 2.4.1 im Insert
- Kokultur aus 1 Million PBMCs im unteren Teil der Wells und die Überstände aus dem Versuch 2.4.1 im Insert
- Monokultur aus 4 Millionen PBMCs im unteren Teil der Wells und DMEM Medium im Insert
- Monokultur aus 1 Million PBMCs im unteren Teil der Wells und DMEM Medium im Insert

Die PBMCs wurden zur Bildung von dendritischen Zellen angeregt. Die gesammelten Überstände aus den unteren Teilen der Wells wurden bis zur späteren Analyse mittels ELISA bei -80°C konserviert.

Die Versuche wurden mit drei Blutspendern und jeweils einer fest zugeordneten Probe von Kieferperioztzellen angesetzt und dreimal wiederholt. Eine Analyse der Zellen mittels Durchflusszytometrie erfolgte nur an Tag 8 nach der Zugabe der Zytokine GM-CSF, IL-4, IL-1 β , TNF- α , IL-6 und PGE₂ (nach vollständiger DC-Differenzierung). Diese wurden gewählt, da die Versuche mit diesen

Zytokinen eine effektivere DC Reifung erzielen als nur mit GM-CSF, IL-4 und LPS (3.2 Vgl. Ergebnisse Platte 2 und 3).

3.3.1 Monokultur mit 1 Million bzw. 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium

Die Monokulturen mit DMEM anstelle von Kieferperiostzellen dienen der Negativkontrolle. Da die PBMCs in dieser Versuchsreihe keine Beeinflussung durch Kieferperiostzellen oder die löslichen Faktoren aus der Zellkultur mit den Kieferperiostzellen haben, sollte von einem ähnlichen Oberflächenmarker-Profil wie an Tag 8 in bei den Versuchen zur Differenzierung zur dendritischen Zelle ausgegangen werden. In

Tabelle 14 sind die Ergebnisse der Kultur von 4 Millionen PBMCs im unteren Kompartiment und DMEM Medium im Insert dargestellt.

Tabelle 15 zeigt die entsprechenden Werte für die Kultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium. Hierbei musste eine Versuchsreihe verworfen werden, weshalb nur zwei Donoren dargestellt sind. In Tabelle 16 ist ein Vergleich der Mittelwerte aus beiden Kulturen zu sehen.

	CD80	CD83	CD86	HLA I	HLA DR	CD14	CCR7	DC Sign	CD 3
Patient 1	10,77	3,91	19,63	96,69	13,61	11,00	70,44	-3,59	79,78
Patient 2	45,85	6,08	51,55	89,77	-0,72	24,47	71,58	45,91	53,73
Patient 3	13,47	-5,38	17,75	92,38	8,82	33,01	63,59	37,93	73,39
Mittelwert	23,4	1,5	29,6	92,9	7,2	22,8	68,5	26,7	69,0

Tabelle 14: Mittelwerte der einzelnen Prozentzahlen an positiven Zellen (aus drei Donoren) für die aufgelisteten Oberflächenmarker. Versuchsaufbau: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium.

	CD80	CD83	CD86	HLA I	HLA DR	CD14	CCR7	DC Sign	CD 3
Patient 1	12,8	-8,2	4,9	93,4	13,0	12,6	71,8	3,2	70,2
Patient 2	16,0	10,5	23,9	88,1	20,8	26,5	53,5	27,0	58,9
Mittelwert	14,4	1,2	14,4	90,8	16,9	19,6	62,7	15,1	64,6

Tabelle 15: Mittelwerte der einzelnen Prozentzahlen an positiven Zellen (aus zwei Donoren) für die aufgelisteten Oberflächenmarker. Versuchsaufbau: Kokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium.

	CD80	CD83	CD86	HLA I	HLA DR	CD14	CCR7	DC Sign	CD3
4 Millionen PBMCs und DMEM	23,4	1,5	29,6	92,9	7,2	22,8	68,5	26,7	69,0
1 Million PBMCs und DMEM	14,4	1,2	14,4	90,8	16,9	19,6	62,7	15,1	65,6

Tabelle 16: Mittelwerte der Monokulturen von 4 bzw. 1 Million PBMCs im unteren Kompartiment und DMEM im oberen Kompartiment. Die positiven Zellen sind in % angegeben.

Bei den Werten der Oberflächenmarker ist auffallend, dass diese nicht die erwarteten Ergebnisse zeigen. Als Beispiel hierfür sind in Tabelle 17 die einzelnen Werte der drei Blutproben bezüglich des Oberflächenmarkers CD80 und in Tabelle 18 die Werte zum Marker CD83 dargestellt. Beide sollten während der Differenzierung der dendritischen Zelle exprimiert werden und dementsprechend sollten die Werte für positive Zellen höher ausfallen als in den beiden Kokultur-Versuchen. Bei den Werten von CD80 ist deutlich zu erkennen, dass der Wert von Blutprobe 2, welcher bei 45,85% liegt, als einziger in einem annähernd zu erwartenden Bereich liegt. CD83 wird ebenfalls von der dendritischen Zelle exprimiert. Auch hier sind dementsprechend mehr positive Zellen in der Zellkultur zu erwarten.

	CD80
Patient 1	10,77
Patient 2	45,85
Patient 3	13,47
Mittelwert	23,4

Tabelle 17: Mittelwerte der Oberflächenexpression von CD80 in Zellen aus allen Patienten in %.

	CD83
Patient 1	3,91
Patient 2	6,08
Patient 3	-5,38
Mittelwert	1,5

Tabelle 18: Mittelwerte der Oberflächenexpression von CD83 in Zellen von allen Patienten in %.

3.3.2 Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs

Eine Übersicht der Prozentzahlen an positiven Zellen für die untersuchten Oberflächenmarker ist in Tabelle 19 dargestellt.

	CD80	CD83	CD86	HLA DR	HLA I	CD14	CCR7	DC Sign	CD 3
Patient 1	31,34	15,59	37,91	11,22	95,16	60,29	73,87	45,09	75,20
Patient 2	42,64	18,19	46,91	16,65	90,28	10,48	68,31	36,36	60,99
Patient 3	15,78	7,22	29,65	10,98	94,02	38,88	64,25	39,13	74,07
Mittelwert	29,9	13,7	38,2	12,9	93,2	36,6	68,8	40,2	70,1

Tabelle 19: Mittelwerte der einzelnen Prozentzahlen an positiven Zellen (aus drei Donoren) für die aufgelisteten Oberflächenmarker. Versuchsaufbau: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 Kieferperiozstellen.

Tabelle 20 zeigt den Vergleich der oben genannten Kokultur mit der Monokultur aus 4 Millionen PBMCs im unteren Kompartiment und ausschließlich DMEM Medium im oberen Kompartiment. Letztere dient als Kontrolle zum Vergleich der verschiedenen Kokulturen.

	CD80	CD83	CD86	HLA I	HLA DR	CD14	CCR7	DC Sign	CD3
4 Mio. PBMCs und DMEM	23,4	1,5	29,6	92,9	7,2	22,8	68,5	26,7	69,0
4 Mio. PBMCs und 20.000 JPCs	29,9	13,7	38,2	93,2	12,9	36,6	68,8	40,2	70,1

Tabelle 20: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs mit 20.000 JPCs und der Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM-Medium.

Oberflächenmarker CD80:

Bezüglich der CD80 Positivität, erkennt man eine deutliche individuelle Schwankung zwischen den einzelnen Patienten. CD80 ist ein Oberflächenmarker von Monozyten bzw. B-Zellen. In der Kokultur sollten die untersuchten Zellen die CD80 Expression herunter regulieren in dem Fall, dass die Kieferperiostzellen immunsuppressiv wirken. Dies ist insbesondere bei Patient 3 ersichtlich. In

Tabelle 21 sind die Werte des Patienten aus allen drei identisch durchgeführten Versuchen aufgezeigt. Auch hier fällt der erste Wert aus der Reihe. Die Werte 2 und 3 sind entsprechend den Erwartungen niedrig.

Patient 3	CD80
1. Versuch	32,7
2. Versuch	6,4
3. Versuch	8,2
Mittelwert	15,8

Tabelle 21: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: CD80 Expression in dendritischen Zellen von Patient 3 in %.

	CD80
Patient 1	10,77
Patient 2	45,85
Patient 3	13,47
Mittelwert	23,4

Tabelle 22: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von CD80 in %.

	CD80
Patient 1	31,34
Patient 2	42,64
Patient 3	15,78
Mittelwert	29,9

Tabelle 23: Kokultur mit 4 Millionen und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CD80 in %.

In Tabelle 22 und Tabelle 23 sieht man die Werte der einzelnen Patienten sowie die Mittelwerte der CD80-positiven Zellen. Als Oberflächenmarker von dendritischen Zellen wäre ein niedrigerer Wert in der Kokultur zu erwarten, was sich hier leider nicht beobachten lässt. Abbildung 31 und Abbildung 32 zeigen exemplarisch ein Histogramm der CD80-positiven Zellen von Patient 3 im zweiten Versuch. Auch hier zeigt sich nicht die erhoffte Abnahme der CD80-positiven Zellen.

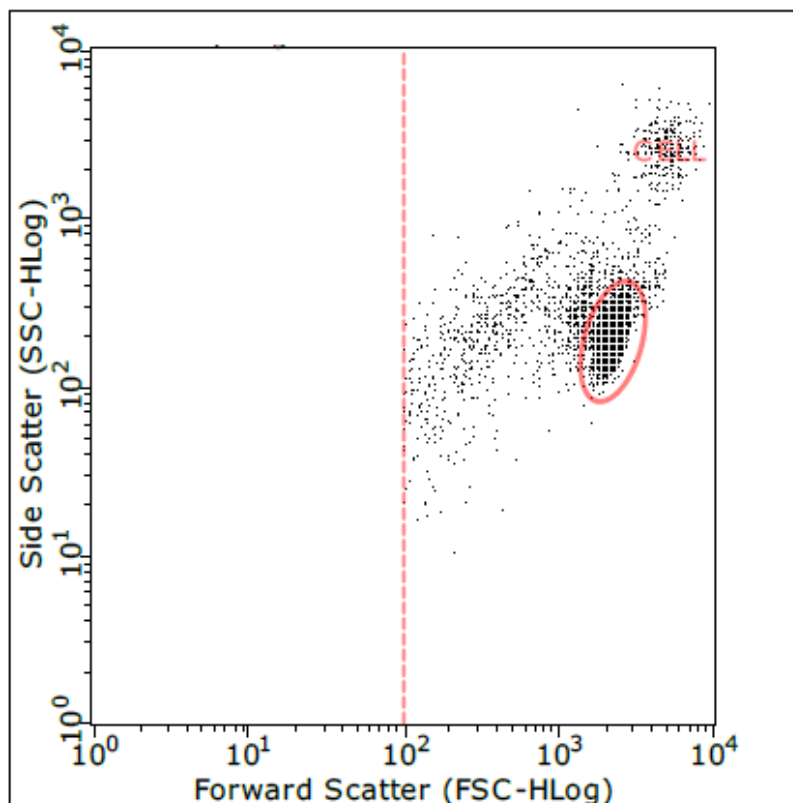


Abbildung 30: Dot Plot: Kokultur: 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs - CD80 Patient 3, Versuch 2.

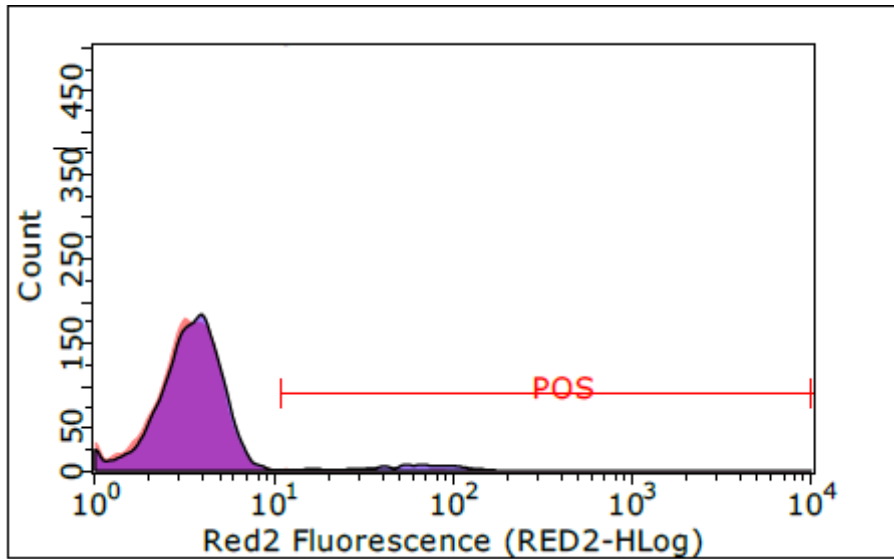


Abbildung 31: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs - Histogramm der CD80 Expression in Zellen von Patient 3 im zweiten Versuch.

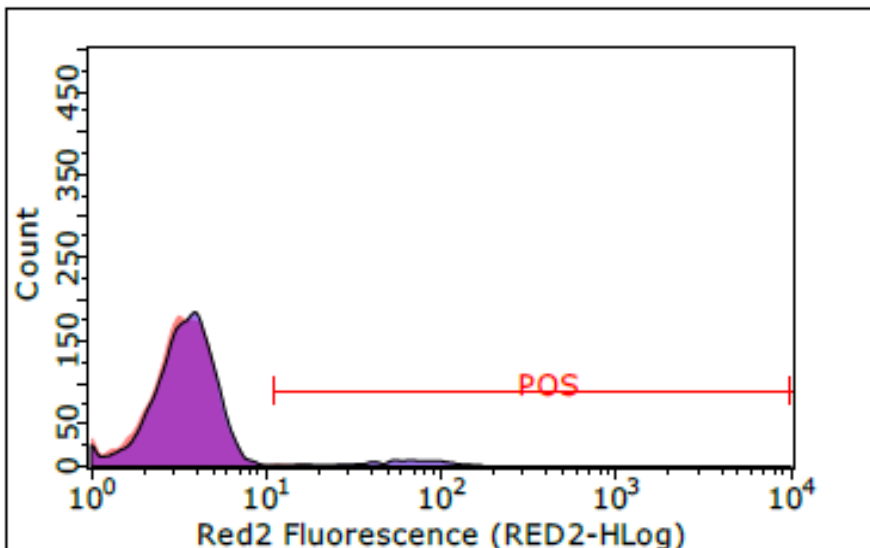


Abbildung 32: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM - Histogramm der CD80 Expression in Zellen von Patient 3 im zweiten Versuch.

Oberflächenmarker CD83:

Der Oberflächenmarker CD83 kommt auf dendritischen Zellen aber auch auf B-Zellen vor. Dementsprechend erwarten wir in der Kokultur einen niedrigeren bzw. negativen Wert im Vergleich zur Monokultur. Wie in Tabelle 19 bzw. in Tabelle 24 zu sehen ist, liegt der Mittelwert aus allen Versuchen der drei Patienten bei 13,7%. Tabelle 25 sind die Vergleichswerte aus der Monokultur

zu entnehmen. In Abbildung 33 und Abbildung 34 sind die Histogramme der CD83 Expression bei Patient 3 im zweiten Versuch exemplarisch dargestellt. Der Wert der positiven Zellen in der Kokultur lag bei 4,6%. In der Monokultur waren es 3,7% positive Zellen. Im Falle einer immunsuppressiven Wirkung durch die Kokultur mit JPCs wäre eine Abnahme an CD83 positiven Zellen in der Kokultur im Vergleich zur Monokultur zu erwarten. Dies lässt sich hier leider nicht erkennen. Allerdings zeigen sich auch hier große individuelle Unterschiede der einzelnen Patienten.

	CD83
Patient 1	15,59
Patient 2	18,19
Patient 3	7,22
Mittelwert	13,7

Tabelle 24: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CD83 in %.

	CD83
Patient 1	3,91
Patient 2	6,08
Patient 3	-5,38
Mittelwert	1,5

Tabelle 25: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von CD83 in %.

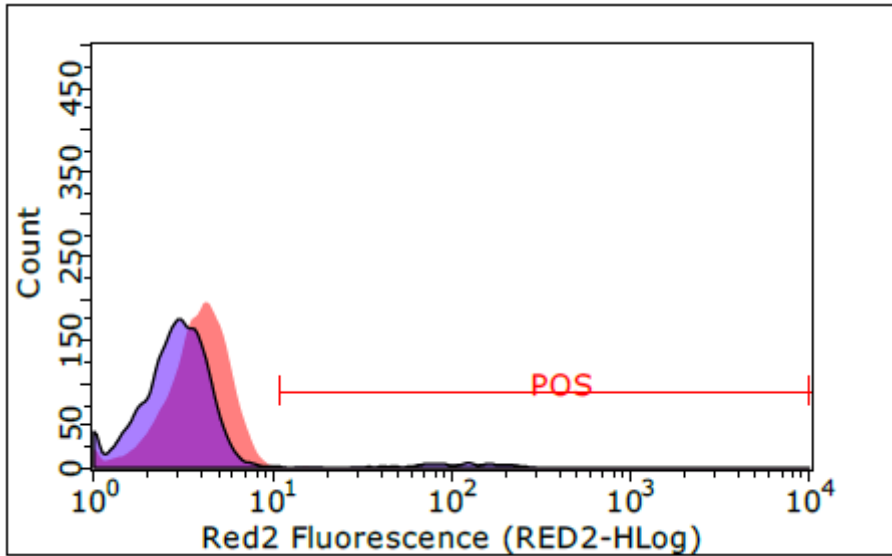


Abbildung 33: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Histogramm der Oberflächenexpression von CD83 bei Patient 3 im zweiten Versuch.

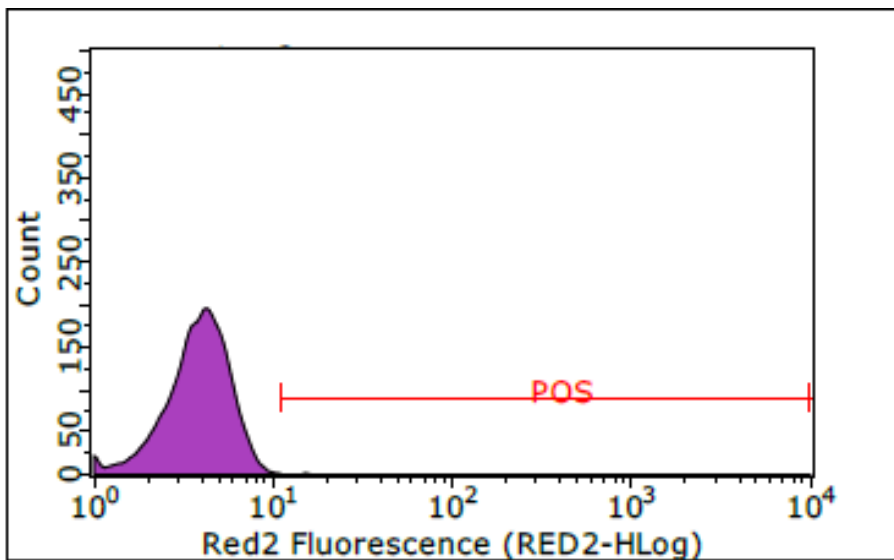


Abbildung 34: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Histogramm der Oberflächenexpression von CD83 bei Patient 3 im zweiten Versuch.

Oberflächenmarker CD86:

Dieser Marker ist vor allem auf dendritischen Zellen exprimiert. Schon bei den Versuchen zur Differenzierung zur dendritischen Zelle war zu erkennen, dass zwar die Mittelwerte kaum Unterschiede zeigen, die einzelnen Blutproben jedoch starke Schwankungen der Positivität zeigten. Mit einem Mittelwert von 38,2% ist die CD86 Expression in der Kokultur immer noch relativ hoch. Tabelle

27 zeigt die Anzahl der positiven Zellen in der Monokultur ohne JPCs. Allerdings ist Tabelle 28 zu entnehmen, dass die Anzahl der positiven Zellen von nur einer Blutprobe in drei identisch durchgeführten Versuchen sehr stark schwanken kann. Somit scheint auch die CD86 Expression extrem großen individuellen Schwankungen unterworfen zu sein.

	CD86
Patient 1	37,91
Patient 2	46,91
Patient 3	29,65
Mittelwert	38,2

Tabelle 26: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CD86 in %.

	CD86
Patient 1	19,63
Patient 2	51,55
Patient 3	17,75
Mittelwert	29,6

Tabelle 27: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von CD86 in %.

Patient 3	CD86
1. Versuch	45,26
2. Versuch	17,58
3. Versuch	26,12
Mittelwert	29,65

Tabelle 28: Mittelwert der CD86 Expression (in%) in Zellen von Patient 3.

Oberflächenmarker HLA-I:

Die Oberflächenexpression von HLA-I ist bei allen Versuchen und Patienten erwartungsgemäß hoch. HLA-I ist ein Marker, der auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden ist und dementsprechend sowohl in den Versuchen mit der Monokultur als auch bei den Kokultur-Versuchen immer exprimiert sein sollte. Als Beispiel hierfür sieht man in Tabelle 29 noch einmal die Mittelwerte aus

allen drei Versuchen der drei Patienten aus der Kokultur sowie in Tabelle 30 aus der Monokultur. Die Abbildung 35 und Abbildung 36 zeigen beispielhafte Histogramme zum Oberflächenmarker HLA-I. Die Werte liegen hier bei 97,6% (Kokultur) sowie bei 95,8% (Monokultur).

	HLA I
Patient 1	95,16
Patient 2	90,28
Patient 3	94,02
Mittelwert	93,2

Tabelle 29: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von HLA-I in %.

	HLA I
Patient 1	96,69
Patient 2	89,77
Patient 3	92,38
Mittelwert	92,9

Tabelle 30: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von HLA-I in %.

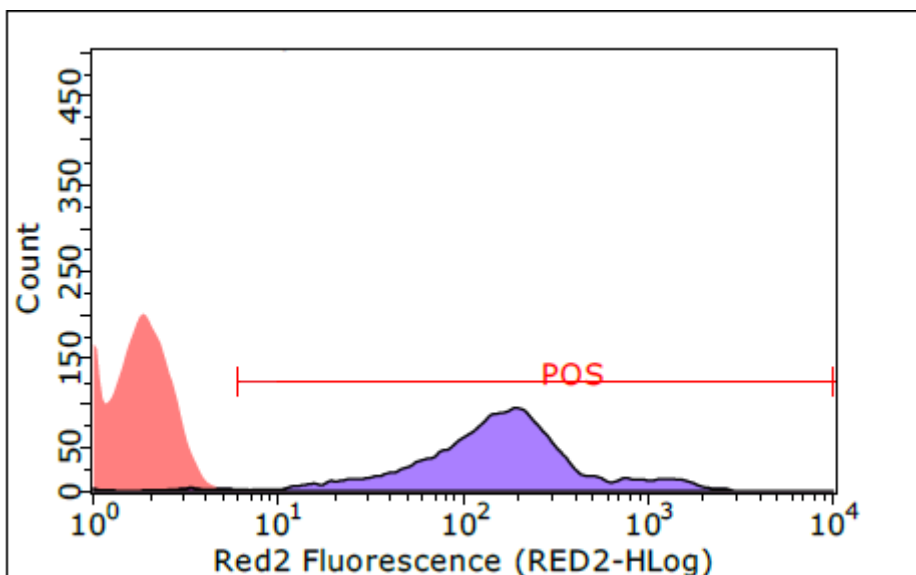


Abbildung 35: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Histogramm der Oberflächenexpression von HLA-I bei Patient 1 im zweiten Versuch.

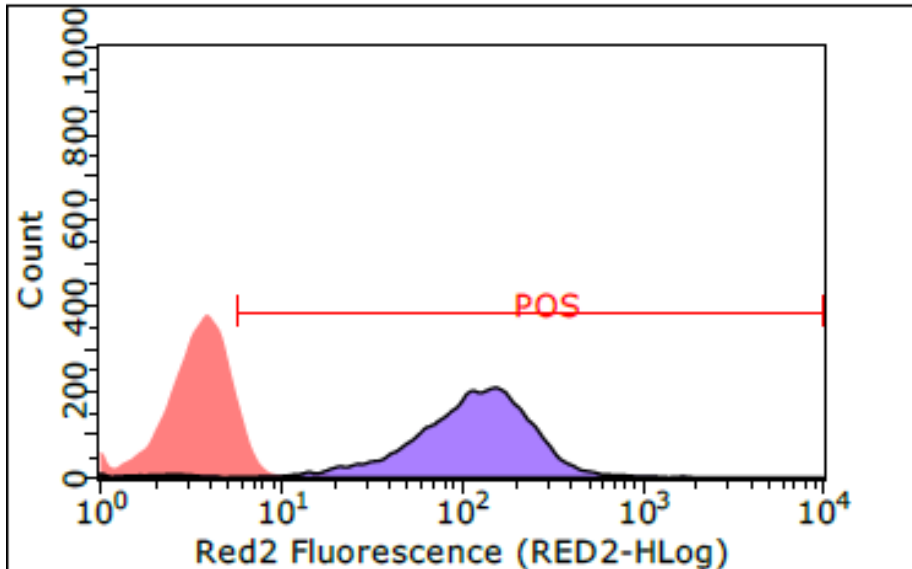


Abbildung 36: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Histogramm der Oberflächenexpression von HLA-I bei Patient 1 im ersten Versuch.

Oberflächenmarker HLA-DR:

Der Oberflächenmarker HLA-DR wird auf APCs exprimiert und sollte daher im Vergleich zur Monokultur negativ sein. In Tabelle 31 ist ein Mittelwert von 12,9% für die positiven Zellen zu erkennen. Tabelle 32 zeigt einen Mittelwert von 7,2% HLA-DR positiver Zellen. Abbildung 37 und Abbildung 38 zeigen exemplarisch das Histogramm der HLA-DR Expression in Zellen von Patient 1 im ersten Versuch. Der Anteil an positiven Zellen lag in der Kokultur bei 3,67% bzw. bei 6,3% in der Monokultur.

	HLA DR
Patient 1	11,22
Patient 2	16,65
Patient 3	10,98
Mittelwert	12,9

Tabelle 31: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von HLA-DR in %.

	HLA DR
Patient 1	13,61
Patient 2	-0,72
Patient 3	8,82
Mittelwert	7,2

Tabelle 32: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von HLA-DR in %.

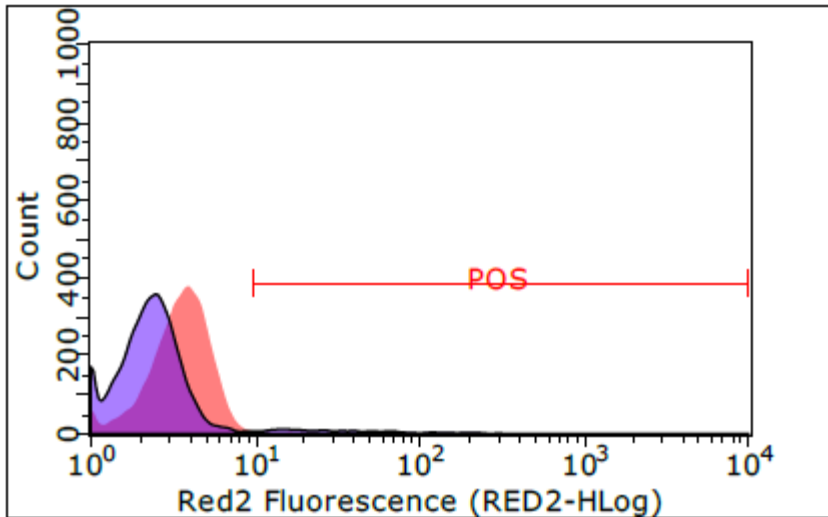


Abbildung 37: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Histogramm der Oberflächenexpression von HLA-DR bei Patient 1 im ersten Versuch.

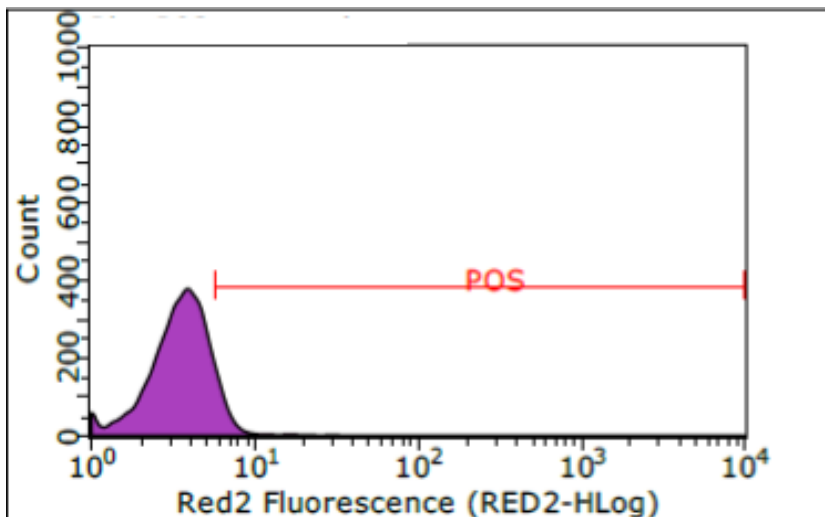


Abbildung 38: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Histogramm der Oberflächenexpression von HLA-DR bei Patient 1 im ersten Versuch.

Oberflächenmarker CD14:

Bei Betrachtung der CD14 Expression fallen ebenfalls starke individuelle Unterschiede zwischen den Patienten auf. CD14 ist ein Marker für Monozyten. Bei reifen dendritischen Zellen sollte dieser Marker weniger stark exprimiert sein als in unreifen Monozyten. Da wir annehmen, dass in der Kokultur die Ausreifung von dendritischen Zellen reduziert wird, sollte die Expression höher sein. In Tabelle 33 sind die einzelnen Werte der drei Versuche bei Patient 1 aufgeführt. Auch zwischen den drei Versuchen gibt es starke Schwankungen. Tabelle 34 und Tabelle 35 zeigen die Mittelwerte aller Versuche aus der Kokultur bzw. aus der Monokultur für CD14. Auch hier ist eine auffallende Schwankung der einzelnen Werte zu erkennen.

Patient 1	CD14
1. Versuch	61,8
2. Versuch	86,8
3. Versuch	32,3
Mittelwert	60,3

Tabelle 33: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CD14 in Zellen von Patient 1 in %.

	CD14
Patient 1	60,29
Patient 2	10,48
Patient 3	38,88
Mittelwert	36,6

Tabelle 34: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CD14 in %.

	CD14
Patient 1	11,00
Patient 2	24,47
Patient 3	33,01
Mittelwert	22,8

Tabelle 35: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von CD14 in %.

Oberflächenmarker CCR7:

Der Oberflächenmarker CCR 7 ist auf dendritischen Zellen, aber auch bei T- und B-Zellen exprimiert. In der Kokultur sollte der Wert an positiven Zellen abnehmen, falls die Theorie mit der immunsupprimierenden Wirkung von Kieferperiostzellen richtig sein sollte. In Tabelle 36 und Tabelle 37 erkennt man, dass die Werte aus der Kokultur und der Monokultur nahezu identisch sind. Dieses Ergebnis spricht für das Vorhandensein von T- und B-Zellen oder von dendritischen Zellen.

	CCR7
Patient 1	73,87
Patient 2	68,31
Patient 3	64,25
Mittelwert	68,8

Tabelle 36: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CCR7 in %.

	CCR7
Patient 1	70,44
Patient 2	71,58
Patient 3	63,59
Mittelwert	68,5

Tabelle 37: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von CCR7 in %.

Oberflächenmarker DC Sign:

Dieser Marker ist auf Makrophagen und dendritischen Zellen vorhanden. In der Kokultur mit Kieferperiostzellen ist ein niedriger Prozentsatz an positiven Zellen zu erwarten. Der Mittelwert aus der Monokultur liegt bei 40,2%, wie Tabelle 38 zu entnehmen ist. Die Kontrolle der Monokultur weist nur 26,7% positive Zellen auf (Tabelle 39).

	DC Sign
Patient 1	45,09
Patient 2	36,36
Patient 3	39,13
Mittelwert	40,2

Tabelle 38: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression des DC Signs in %.

	DC Sign
Patient 1	-3,59
Patient 2	45,91
Patient 3	37,93
Mittelwert	26,7

Tabelle 39: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression des DC Signs in %.

Oberflächenmarker CD3:

Der Marker CD3 ist auf T-Zellen vorhanden. Daher sind weder in der Monokultur noch in der Kokultur eine hohe Anzahl positiver Zellen zu erwarten. Tabelle 40 zeigt die Ergebnisse aus der Kokultur. Der Wert positiver Zellen lag hier bei 70,0%. Tabelle 41 ist ein nahezu identischer Wert mit 69,0% positiver Zellen aus der Monokultur zu entnehmen.

	CD 3
Patient 1	75,20
Patient 2	60,99
Patient 3	74,07
Mittelwert	70,1

Tabelle 40: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CD3 in %.

	CD 3
Patient 1	79,78
Patient 2	53,73
Patient 3	73,39
Mittelwert	69,0

Tabelle 41: Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von CD3 in %.

3.3.3 Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und den Überständen

Bevor mit den Versuchen zur Kokultur mit PBMCs und Kieferperiostzellen begonnen wurde, wurden Überstände hergestellt. Diese stammen aus der Zellkultur von Kieferperiostzellen und sollen dementsprechend lösliche Faktoren freisetzen, die für ein anti-inflammatorisches Milieu sorgen. Dieser Versuch soll also zeigen, ob die löslichen Faktoren, welche Kieferperiostzellen sezernieren, ausreichen um die Ausreifung von dendritischen Zellen wenigstens partiell einzudämmen.

	CD80	CD83	CD86	HLA I	HLA DR	CD14	CCR7	DC Sign	CD 3
Patient 1	8,7	4,5	17,0	94,5	6,7	7,1	68,3	3,5	75,8
Patient 2	50,2	46,3	40,5	89,7	24,8	47,8	60,2	46,9	51,7
Patient 3	20,1	2,1	29,0	93,9	39,6	38,2	63,4	46,7	75,4
Mittelwert	26,3	17,6	28,8	92,7	23,7	31,0	64,0	32,4	67,6

Tabelle 42: Mittelwerte der einzelnen Prozentzahlen an positiven Zellen (aus drei Donoren) für die aufgelisteten Oberflächenmarker. Versuchsaufbau: Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und Überständen.

	CD80	CD83	CD86	HLA I	HLA DR	CD14	CCR7	DC Sign	CD3
4 Mio. PBMCs und DMEM	23,4	1,5	29,6	92,9	7,2	22,8	68,5	26,7	69,0
4 Mio. PBMCs mit Überständen	26,3	17,6	28,8	92,7	23,7	31,0	64,0	32,4	67,6

Tabelle 43: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und den Überständen sowie aus der Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM.

In Tabelle 42 sind die Mittelwerte der Markerexpressionen der einzelnen Patienten aus der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und den Überständen

dargestellt. Tabelle 43 zeigt die Übersicht aus der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und den Überständen sowie der Monokultur aus 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium, welche auch hier als Kontrolle dient. Man erkennt, dass bei keinem der Oberflächenmarker bessere Ergebnisse als beim Versuch mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs erzielt werden konnten.

3.3.4 Vergleich der Kulturen mit 4 Millionen PBMCs

Tabelle 44 zeigt eine Übersicht über alle Ansätze mit 4 Millionen PBMCs. Die Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM dient als Kontrolle für die anderen beiden Kokulturen. Der Tabelle lässt sich entnehmen, dass in diesen Ansätzen die Ergebnisse nicht wie erhofft ausfallen. Die Marker CD80, CD83 und CD86 sollten im Vergleich zur Kontrolle weniger positive Zellen aufweisen. Dies ist bei beiden Kokulturen nicht der Fall. Ebenso erwartet man eine reduzierte Expression der Marker HLA-DR und CCR7 für den Fall, dass die JPCs für ein anti-inflammatorisches Milieu sorgen. Betrachtet man die Ergebnisse der Markerexpression des DC Signs, lässt sich der gewünschte Effekt ebenfalls nicht ablesen. Mit 40,2% positiven Zellen ist der Wert aus der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs im Vergleich zur Monokultur (26,7%) angestiegen. Etwas schwächer zeigt sich dies mit nur 32,4% positiven Zellen auch in der Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und den Überständen.

	CD80	CD83	CD86	HLA I	HLA DR	CD14	CCR7	DC Sign	CD3
Monokultur: 4 Mio. PBMCs und DMEM	23,4	1,5	29,6	92,9	7,2	22,8	68,5	26,7	69,0
Kokultur: 4 Mio. PBMCs und 20.000 JPCs	29,9	13,7	38,2	93,2	12,9	36,6	68,8	40,2	70,1
Kokultur: 4 Mio. PBMCs mit Überständen	26,3	17,6	28,8	92,7	23,7	31,0	64,0	32,4	67,6

Tabelle 44: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus der Monokultur mit 4 Millionen PBMCs und DMEM Medium, aus der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs sowie aus der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und den Überständen.

3.3.5 Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs

Aufgrund der unterschiedlichen Zelldichten an PBMCs in den Ansätzen, kann untersucht werden, inwiefern das Verhältnis von Periostzellen und PBMCs eine Rolle spielt. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Kokultur mit nur 1 Million PBMCs dargestellt. Das Verhältnis Periostzellen/PBMCs liegt also bei 1:50. Die Ergebnisse aus 3.3.2 beziehen sich auf ein Verhältnis von 1:200. In Tabelle 45 ist eine Übersicht über die Werte aus der Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 Kieferperiostzellen dargestellt. Tabelle 46 zeigt den Vergleich zwischen der Monokultur aus 1 Million PBMCs mit DMEM Medium und der Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs. Auch hier zeigt sich der erwünschte Effekt nicht.

	CD80	CD83	CD86	HLA I	HLA DR	CD14	DC Sign	CD 3
Patient 1	15,3	8,6	9,9	92,0	9,6	21,6	16,5	71,8
Patient 2	6,9	7,7	24,4	89,6	10,6	19,8	12,1	66,9
Mittelwert	11,1	8,1	17,1	90,8	10,1	20,7	14,3	69,3

Tabelle 45: Gemittelte Prozentzahlen der Markerexpression in Zellen von zwei Patienten aus drei Versuchsdurchgängen. Versuchsaufbau: Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 Kieferperiostzellen.

	CD80	CD83	CD86	HLA I	HLA DR	CD14	CCR7	DC Sign	CD3
1 Mio. PBMCs und DMEM	14,4	1,2	14,4	90,8	16,9	19,6	62,7	15,1	65,6
1 Mio. PBMCs und 20.000 JPCs	11,1	8,1	17,1	90,8	10,1	20,7	60,3	14,3	69,3

Tabelle 46: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus der Monokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium und aus der Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs.

Oberflächenmarker CD80 :

Der Marker CD80, der bei aktivierten dendritischen Zellen vorkommt, sollte in der Kokultur weniger exprimiert sein als in der Monokultur. Der Mittelwert in der Kokultur liegt bei 11,1% positiver Zellen und ist damit im Vergleich zur Monokultur nur leicht gesunken (14,4%). Betrachtet man die einzelnen Patienten und Versuche zeigen sich auch hier große Schwankungen aber auch

deutlichere Ergebnisse, wenn man einzelne Werte betrachtet. Tabelle 47 und Tabelle 48 zeigen die Oberflächenexpression des Markers CD80 bei allen drei Versuchen von Patient 2. Vor allem im zweiten Versuch zeigt sich eine Reduktion der positiven Zellen von 23,1% in der Monokultur auf 1,8% in der Kokultur. Abbildung 39 und Abbildung 40 zeigen die entsprechenden Histogramme.

Patient 2	CD80
1. Versuch	11,6
2. Versuch	23,1
3. Versuch	13,4
Mittelwert	16,0

Tabelle 47: Monokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM: Oberflächenexpression von CD80 in Zellen von Patient 2 in %.

Patient 2	CD80
1. Versuch	8,7
2. Versuch	1,8
3. Versuch	10,3
Mittelwert	6,9

Tabelle 48: Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von CD80 in Zellen von Patient 2 in %.

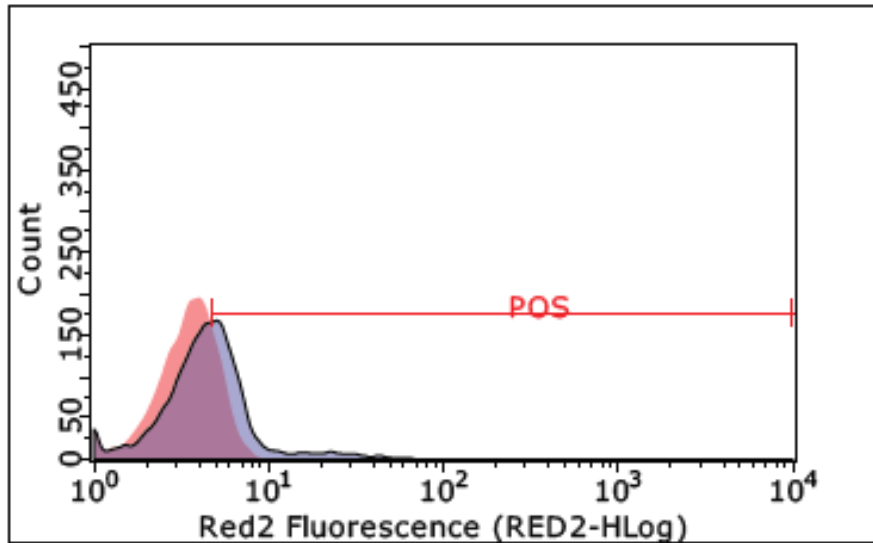


Abbildung 39: Monokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium: Histogramm der Oberflächenexpression von CD80 bei Patient 2 im zweiten Versuch.

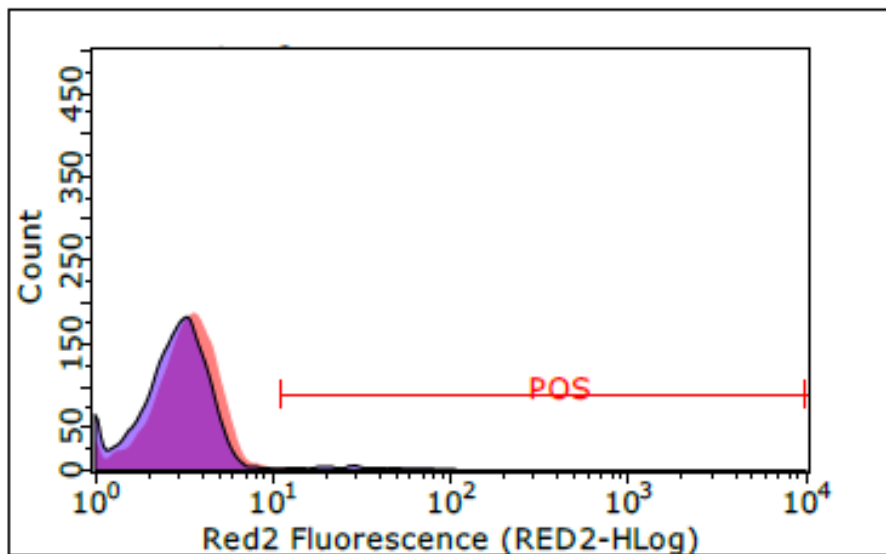


Abbildung 40: Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs: Histogramm der Oberflächenexpression von CD80 bei Patient 2 im zweiten Versuch.

Oberflächenmarker DC Sign:

Tabelle 49 und Tabelle 50 zeigen die Einzelwerte und den Mittelwert in Zellen von Patient 1 aus allen drei Versuchsdurchgängen jeweils in der Kokultur und in der Monokultur. Auch hier weichen die einzelnen Werte stark voneinander ab. Betrachtet man nur den ersten Versuch zeigt sich mit 35,8% in der Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs eine deutliche Zunahme der positiven Zellen

im Vergleich zur Kontrolle (Monokultur: 3,2%). Die Abbildung 41 und Abbildung 42 zeigen exemplarisch die entsprechenden Histogramme von Patient 1 im ersten Versuch.

Patient 1	DC Sign
1. Versuch	35,8
2. Versuch	9,1
3. Versuch	4,6
Mittelwert	16,5

Tabelle 49: Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs: Oberflächenexpression von DC Sign in Zellen von Patient 1 in %.

Patient 1	DC Sign
1. Versuch	4,5
2. Versuch	-1,8
3. Versuch	6,8
Mittelwert	3,2

Tabelle 50: Monokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium: Oberflächenexpression von DC Sign in Zellen von Patient 1 in %.

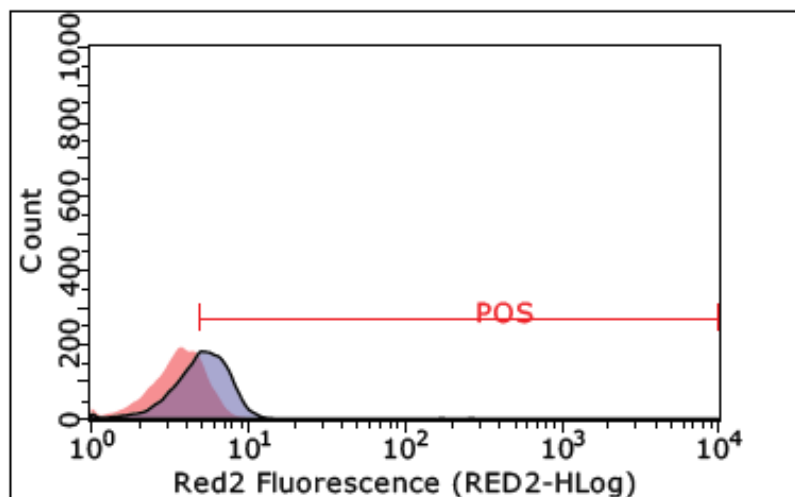


Abbildung 41: Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs: Histogramm der Oberflächenexpression des DC Signs bei Patient 1 im ersten Versuch.

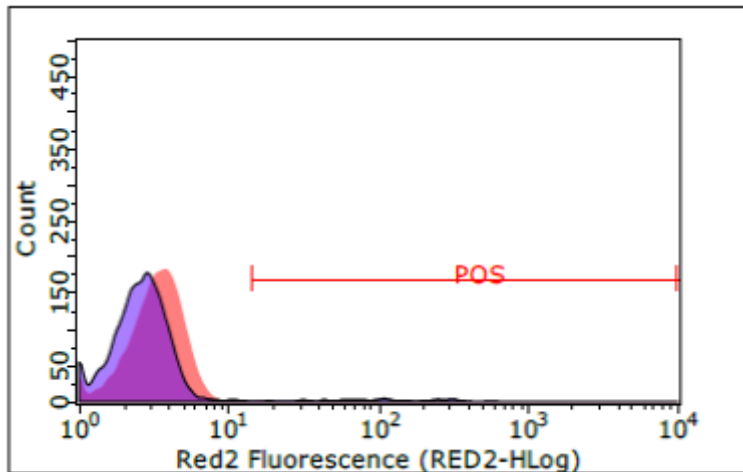


Abbildung 42: Monokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium: Histogramm der Oberflächenexpression des DC Signs bei Patient 1 im ersten Versuch.

3.3.6 Kokultur mit 1 Million PBMCs und den Überständen

In Tabelle 51 sind die Prozentzahlen der verschiedenen Markerexpressionen aus der Kokultur mit Überständen und 1 Million PBMCs von zwei Donoren aus drei Versuchsdurchgängen zu sehen. Der Versuchsaufbau eines Donors musste verworfen werden, weshalb hier nur zwei Donoren dargestellt sind. Tabelle 52 zeigt die Mittelwerte der genannten Kokultur mit den Werten der Monokultur aus 1 Million PBMCs und DMEM Medium im Vergleich. Leider lassen sich auch hier keine Rückschlüsse über eine mögliche anti-inflammatorische Wirkung durch JPCs bzw. deren löslichen Faktoren aus den Überständen ableiten. Die Marker CD80, CD83, CD86, DC Sign und HLA-DR sollten beispielsweise in der Kokultur weniger positive Zellen ergeben.

	CD80	CD83	CD86	HLA I	HLA DR	CD14	CCR7	DC Sign	CD 3
Patient 1	21,3	9,4	26,0	92,7	10,0	11,6	64,5	3,4	71,3
Patient 2	22,0	9,5	18,4	89,5	14,7	25,7	56,9	31,8	61,1
Mittelwert	21,6	9,5	22,2	91,1	12,4	18,6	60,7	17,6	66,2

Tabelle 51: Gemittelte Prozentzahlen der Markerexpression in Zellen von zwei Patienten aus drei Versuchsdurchgängen, Versuchsaufbau: Kokultur mit 1 Million PBMCs und Überständen.

	CD80	CD83	CD86	HLA I	HLA DR	CD14	CCR7	DC Sign	CD3
1 Mio. PBMCs und DMEM	14,4	1,2	14,4	90,8	16,9	19,6	62,7	15,1	65,6
1 Mio. PBMCs und Überstände	21,6	9,5	22,2	91,1	12,4	18,6	60,7	17,6	66,2

Tabelle 52: Übersicht der gemittelten Markerausdrückung (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus der Monokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium und aus der Kokultur mit 1 Million PBMCs und den Überständen.

3.3.7 Vergleich der Kulturen mit 1 Million PBMCs

Tabelle 53 zeigt sie Übersicht über alle Kulturen mit 1 Million PBMCs im Vergleich. Die Monokultur dient weiterhin als Kontrolle. Leider lässt sich wie bereits erläutert der gewünscht Effekt nicht darstellen. Einzig die Oberflächenexpression des Markes HLA-DR zeigt in der Kokultur mit 10,1% eine leichte Abnahme (16,9% in der Monokultur).

	CD80	CD83	CD86	HLA I	HLA DR	CD14	CCR7	DC Sign	CD3
Monokultur: 1 Mio. PBMCs und DMEM	14,4	1,2	14,4	90,8	16,9	19,6	62,7	15,1	65,6
Kokultur: 1 Mio. PBMCs und 20.000 JPCs	11,1	8,1	17,1	90,8	10,1	20,7	60,3	14,3	69,3
Kokultur: 1 Mio. PBMCs und Überstände	21,6	9,5	22,2	91,1	12,4	18,6	60,7	17,6	66,2

Tabelle 53: Übersicht der gemittelten Markerausdrückung (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus der Monokultur mit 1 Million PBMCs und DMEM Medium, aus der Kokultur mit 1 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs sowie aus der Kokultur mit 1 Million PBMCs und den Überständen.

3.3.8 Vergleich der Kokulturen mit JPCs und PBMCs in unterschiedlicher Zelldichte

Wie bereits erläutert wurden unterschiedlichen Zelldichten an PBMCs in den Ansätzen gewählt, um zu untersuchen, inwiefern das Verhältnis von Periozyten und PBMCs eine Rolle spielt. Im Folgenden sind die Ergebnisse der Kokultur mit nur 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs (Verhältnis 1:200) im Vergleich zur Kokultur mit nur 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs (Verhältnis 1:50) dargestellt.

	CD80	CD83	CD86	HLA I	HLA DR	CD14	CCR7	DC Sign	CD3
4 Mio. PBMCs und 20.000 JPCs	29,9	13,7	38,2	93,2	12,9	36,6	68,8	40,2	70,1
1 Mio. PBMCs und 20.000 JPCs	11,1	8,1	17,1	90,8	10,1	20,7	60,3	14,3	69,3

Tabelle 54: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs und aus der Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs.

Wie zuvor beschrieben zeigen die Ergebnisse der Kokulturen in Bezug auf die Monokultur als Kontrolle nicht die gewünschte Tendenz. Vergleicht man jedoch die Kokulturen, die unterschiedliche Zelldichten der PBMCs aufweisen, fällt auf, dass der Ansatz mit der höheren Zelldichte dennoch bessere Ergebnisse zeigt.

Als Marker von reifen dendritischen Zellen sollte die Prozentzahl an CD80 und CD86 positiver Zellen in der Kokultur geringer ausfallen. Es zeigt sich, dass beim Verhältnis 1:50 beide Marker weniger positive Zellen zeigen (CD80: 11,1%; CD86 17,1%) als beim Verhältnis 1:200 (CD80: 29,9%; CD86: 38,2%).

Ähnliche Tendenzen lassen sich beim Marker CD83 und CD14 erkennen. Die Oberflächenexpression des DC Signs ist beim Verhältnis 1:200 mit 40,2% positiven Zellen höher als beim Verhältnis 1:50 (14,3%). Also zeigt sich hier, dass das Verhältnis 1:50 ein besseres Ergebnis bringt.

3.3.9 Vergleich der Kokulturen mit den Versuchen zum Nachweis dendritischer Zellen

Die Monokultur mit den PBMCs und DMEM sollte dieselben Ergebnisse wie Versuche zum Nachweis dendritischer Zellen zeigen, da bei beiden Ansätzen eine nahezu identische Vorgehensweise erfolgte. Allein der Aufbau (6-Well-Platten bzw. Transwell-Platten) ist unterschiedlich.

Bisher erfolgte ein Vergleich der Ergebnisse aus den verschiedenen Ansätzen der Kokulturen mit der Monokultur. Letztere ist die korrekte Kontrolle, die als Vergleich herangezogen werden muss. Allerdings zeigt sich, dass sich die

Ergebnisse aus der Monokultur deutlich von denen aus den Versuchen zum Nachweis dendritischer Zellen unterscheiden.

Beim Vergleich der Ergebnisse der Monokultur mit den Kokulturen zeigt sich kein Hinweis auf eine Hemmung der Differenzierung zur dendritischen Zelle. Vergleicht man allerdings die Kokulturen mit den Versuchen zum Nachweis dendritischer Zellen, zeigt dies ein anderes Bild. Wie bereits erwähnt, zeigt die Kokultur mit der höheren Zelldichte bessere Ergebnisse. Beim Nachweis zur dendritischen Zelle war der Ansatz mit der Behandlung des Zytokincocktails an Tag 7 (GM-CSF, IL-4, IL-1 β , TNF- α , IL-6, PGE₂) am besten geeignet. In Tabelle 55 sind die Ergebnisse aus dem Nachweis der DC sowie den Kokulturen mit JPCs und 1 Million PBMCs dargestellt. Dies entspricht einem Verhältnis von 1:50.

	CD80	CD 83	CD86	HLA I	HLA-DR	CD14	CCR7	CD3	DC Sign
Nachweis DC mit Zytokincocktail	42,8	38,9	48,4	95,3	32,7	11,0	84,2	63,3	-
Kokultur: 1 Mio. PBMCs und 20.000 JPCs	11,1	8,1	17,1	90,8	10,1	20,7	60,3	69,3	14,3

Tabelle 55: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus den Versuchen zum Nachweis dendritischer Zellen und der Kokultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs.

Oberflächenmarker CD80, CD83, CD86

Diese Marker sind vor allem auf aktivierten dendritischen Zellen zu finden, aber zum Teil auch auf anderen Zellen (CD83 auch auf T-Zellen, CD86 auch auf Monozyten). Wenn die Annahme stimmt, dass in der Kokultur mit JPCs die Ausreifung dendritischer Zellen gehemmt wird, sollten weniger positive Zellen in der Kokultur vorhanden sein. Dies trifft sowohl auf CD80 mit 11,1% positiven Zellen (DC Nachweis: 42,8% positive Zellen) als auch auf CD83 mit 8,1% positiven Zellen (DC Nachweis: 38,9%) und auf CD86 mit 17,1% positive Zellen (DC Nachweis: 48,4% positive Zellen) zu.

Oberflächenmarker HLA-I

HLA-I ist auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden und damit auch erwartungsgemäß in beiden Ansätzen positiv.

Oberflächenmarker HLA-DR

HLA-DR entspricht MHC-II und ist u.a. auf aktivierten APCs vorhanden. Positive Zellen sind daher natürlich beim Nachweis zur dendritischen Zelle zu erwarten. In der Kokultur sollten weniger positive Zellen nachweisbar sein. Auch hier lässt sich dieser Effekt darstellen mit 32,7% positiver Zellen beim Nachweis von DCs und nur 10,1% positive Zellen in der Kokultur.

Oberflächenmarker CD14

CD14 befindet sich auf unreifen Monozyten. Beim Nachweis von DCs sollten daher wenige positive Zellen vorhanden sein. Da in der Kokultur eine Reifung von DCs verhindert werden soll und sich daher noch Monozyten in der Kultur befinden, erwarten man hier eine höhere Anzahl CD14-positiver Zellen. Man sieht einen leichten Anstieg positiver Zellen in der Kokultur mit 20,7% (DC Nachweis: 11,0% positive Zellen).

Oberflächenmarker CCR7

CCR7 ist auf dendritischen Zellen, aber auch auf T- und B-Zellen vorhanden. Dementsprechend ist von vielen CCR7-positiven Zellen beim Nachweis von DCs auszugehen und einer geringeren Anzahl in der Kokultur. Mit 84,2% positiven Zellen beim Nachweis der DCs ist dies zwar erfüllt, jedoch sinkt die Anzahl der positiven Zellen in der Kokultur auf nur 60,3%.

Oberflächenmarker CD3

Dieser Marker ist auf T-Zellen zu finden. Bei beiden Ansätzen sollten daher keine positiven Zellen vorhanden sein. Dies lässt sich mit 63,3% und 69,3% positiver Zellen jedoch hier nicht zeigen.

Tabelle 56 zeigt eine Übersicht über die Markerexpression aus der Kokultur mit 20.000 JPCs und 4 Millionen PBMCs, also ein Verhältnis von 1:200. Betrachtet man diese Werte, fällt auf, dass sich bei jedem Marker ebenso das gewünschte Ergebnis zeigt, allerdings bei allen weniger ausgeprägt. Der Marker CD80 beispielsweise fällt hier auf einen Wert von 29,9% positiven Zellen im Vergleich zu 11,1% positiven Zellen bei einem Verhältnis von 1:50.

	CD80	CD 83	CD86	HLA I	HLA-DR	CD14	CCR7	CD3	DC Sign
Nachweis DC mit Zytokincocktail	42,8	38,9	48,4	95,3	32,7	11,0	84,2	63,3	-
Kokultur: 4 Mio. PBMCs und 20.000 JPCs	29,9	13,7	38,2	93,2	12,9	36,6	68,8	40,2	70,1

Tabelle 56: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus den Versuchen zum Nachweis dendritischer Zellen und der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und 20.000 JPCs.

Tabelle 57 zeigt eine Übersicht der Marker der dendritischen Zellen aus den Versuchen zum Nachweis der dendritischen Zellen und den Kokulturen aus 1 Million PBMCs und den Überständen. In Tabelle 58 ist analog hierzu der Vergleich zwischen dem Nachweis der DCs und der Kokultur aus 4 Millionen PBMCs und den Überständen dargestellt.

	CD80	CD 83	CD86	HLA I	HLA-DR	CD14	CCR7	CD3	DC Sign
Nachweis DC mit Zytokincocktail	42,8	38,9	48,4	95,3	32,7	11,0	84,2	63,3	-
Kokultur: 1 Mio. PBMCs und Überstände	21,6	9,5	22,2	91,1	12,4	18,6	60,7	66,2	17,6

Tabelle 57: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus den Versuchen zum Nachweis dendritischer Zellen und der Kokultur mit 1 Million PBMCs und den Überständen.

	CD80	CD 83	CD86	HLA I	HLA-DR	CD14	CCR7	CD3	DC Sign
Nachweis DC mit Zytokincocktail	42,8	38,9	48,4	95,3	32,7	11,0	84,2	63,3	-
Kokultur: 4 Mio. PBMCs mit Überständen	26,3	17,6	28,8	92,7	23,7	31,0	64,0	67,6	32,4

Tabelle 58: Übersicht der gemittelten Markerexpression (in %) in dendritischen Zellen von allen Patienten aus den Versuchen zum Nachweis dendritischer Zellen und der Kokultur mit 4 Millionen PBMCs und den Überständen.

Auch hier sind bei allen Markern die erwarteten Ergebnisse zu sehen. Die Expression von CD80, CD83, CD86, HLA-DR und CCR7 nimmt ab. Es fällt auf, dass hier ebenfalls die Ergebnisse im Ansatz mit nur 1 Million PBMCs bei allen Markern bessere Ergebnisse zeigen.

3.4 Zytokin-Konzentrationen in den Überständen der Kokulturen

IL-12

Das Zytokin IL-12 wird u.a. von dendritischen Zellen gebildet und fördert ein proinflammatorisches Milieu, indem es vor allem die Antwort der T-Helferzellen induziert. In der Kokultur von Kieferperiostzellen und PBMCs erwartet man also weniger IL-12 Ausschüttung als in der Monokultur (Kokultur mit nur DMEM Medium im Insert). Die Überstände aus dem unteren Kompartiment wurden jeweils an Tag 2, Tag 7 und Tag 8 beim Medienwechsel abgenommen und bei -80°C konserviert. Tabelle 59 zeigt eine Übersicht der Konzentrationen des ELISAs aus den verschiedenen Ansätzen der Kokultur bei 1 Million PBMCs. Abbildung 43 zeigt das entsprechende Balkendiagramm. Tabelle 60 und Abbildung 44 zeigen die Werte aus den Versuchen mit 4 Millionen PBMCs. Aufgrund der sehr hohen Standardabweichung wurde diese nicht ins Diagramm eingefügt.

	Tag 2	Tag 7	Tag 8
JPCs	53,58	65,75	39,57
Überstände	58,29	73,24	33,29
DMEM	54,48	67,52	53,51

Tabelle 59: Mittelwerte der IL-12 Konzentrationen in pg/ml in der Kokultur bzw. Monokultur mit 1 Million PBMCs.

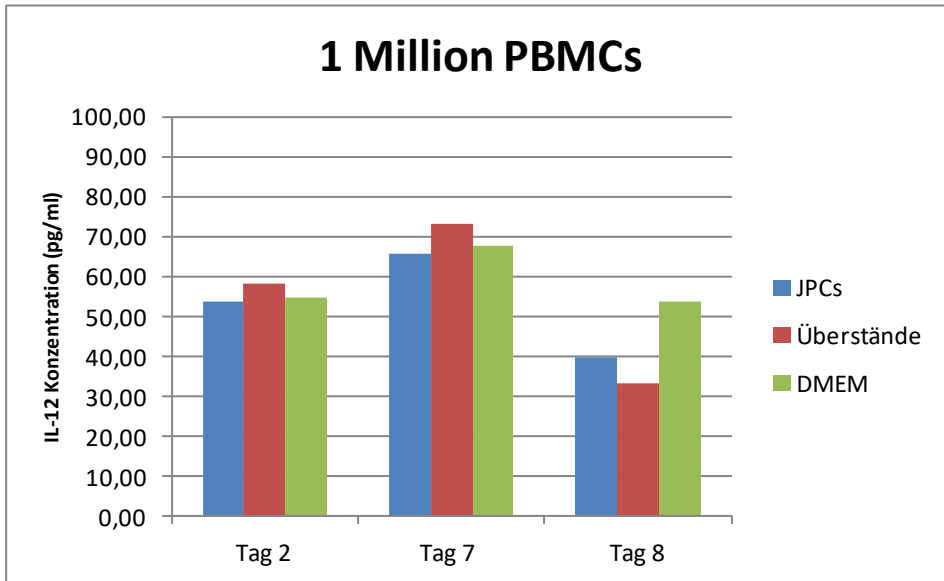


Abbildung 43: Balkendiagramm zur Konzentration von IL-12 an den verschiedenen Tagen und abhängig vom Aufbau der Kultur.

	Tag 2	Tag 7	Tag 8
JPCs	58,29	66,62	64,94
Überstände	67,89	49,40	40,34
DMEM	61,26	84,04	35,21

Tabelle 60: Mittelwerte der IL-12 Konzentrationen in pg/ml in der Kokultur bzw. Monokultur mit 4 Millionen PBMCs.

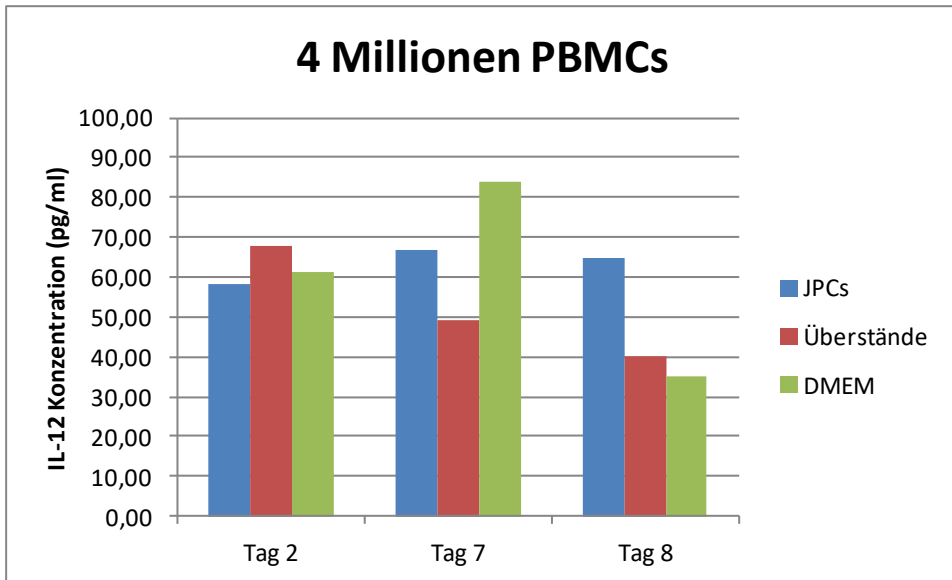


Abbildung 44: Balkendiagramm zur Konzentration von IL-12 an den verschiedenen Tagen und abhängig vom Aufbau der Kultur.

IL-6

Abbildung 45 und Abbildung 46 sowie Tabelle 61 und Tabelle 62 zeigen die Werte aus den ELISA-Tests zur Detektion des Zytokins IL-6 in den Überständen. Aufgrund der sehr hohen Standardabweichung wurde diese ebenfalls nicht ins Diagramm eingefügt.

	Tag 2	Tag 7	Tag 8
JPCs	4,67	136,60	279,64
Überstände	5,85	116,33	318,75
DMEM	1,39	0,04	285,01

Tabelle 61: Mittelwerte der IL-6 Konzentrationen in pg/ml in der Kokultur bzw. Monokultur mit 1 Million PBMCs.

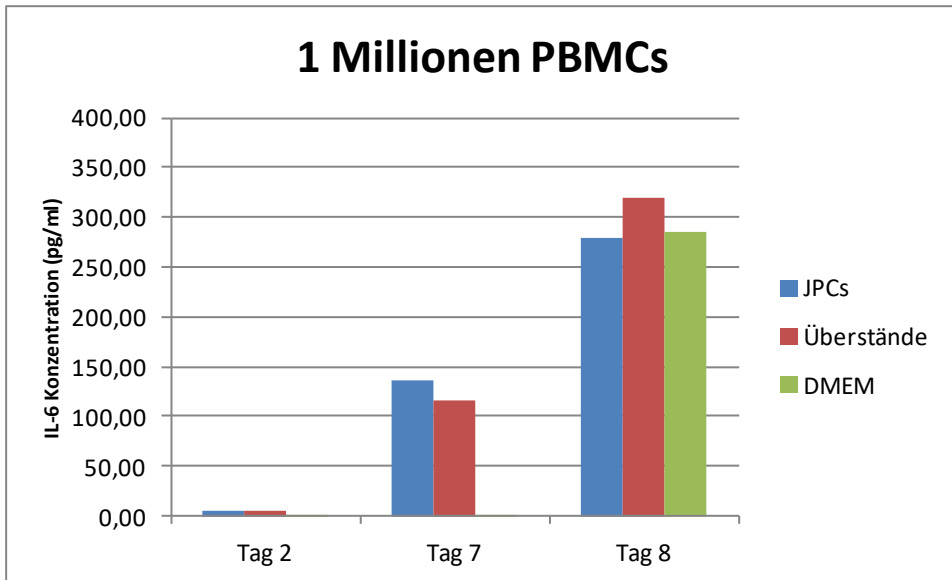


Abbildung 45: Balkendiagramm zur Konzentration von IL-6 an den verschiedenen Tagen und abhängig vom Aufbau der Kultur.

	Tag 2	Tag 7	Tag 8
JPCs	16,62	344,06	344,41
Überstände	2,63	316,87	347,08
DMEM	13,90	87,61	301,65

Tabelle 62: Mittelwerte der IL-6 Konzentrationen in pg/ml in der Kokultur bzw. Monokultur mit 4 Millionen PBMCs.

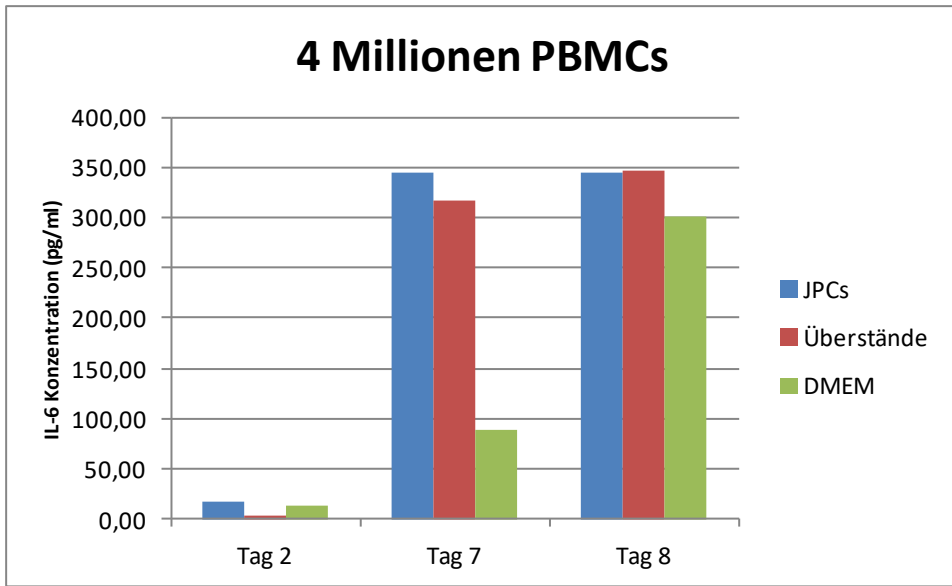


Abbildung 46: Balkendiagramm zur Konzentration von IL-6 an den verschiedenen Tagen und abhängig vom Aufbau der Kultur.

TNF- α

Analog zu den oben genannten Versuchen zeigen die folgenden Abbildungen die Ergebnisse bezüglich der TNF- α Konzentrationen in den abgenommenen PBMC/DC Überständen. Auch hier wurde aufgrund der sehr hohen Standardabweichung diese nicht dargestellt.

	Tag 2	Tag 7	Tag 8
JPCs	30,74	5,98	1335,63
Überstände	16,19	12,06	1422,96
DMEM	25,72	42,29	1391,89

Tabelle 63: Mittelwerte der TNF- α Konzentrationen in pg/ml in der Kokultur bzw. Monokultur mit 1 Million PBMCs.

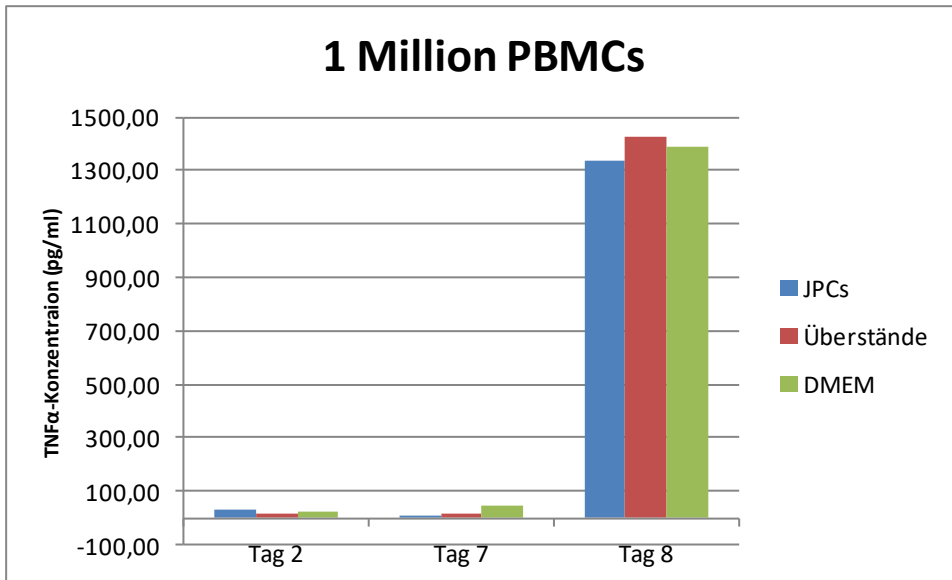


Abbildung 47: Balkendiagramm zur Konzentration von TNF- α an den verschiedenen Tagen und abhängig vom Aufbau der Kokultur.

	Tag 2	Tag 7	Tag 8
JPCs	27,94	18,22	1445,36
Überstände	67,30	32,95	1389,89
DMEM	22,49	15,03	1378,69

Tabelle 64: Mittelwerte der TNF- α Konzentrationen in pg/ml in der Kokultur bzw. Monokultur mit 4 Millionen PBMCs.

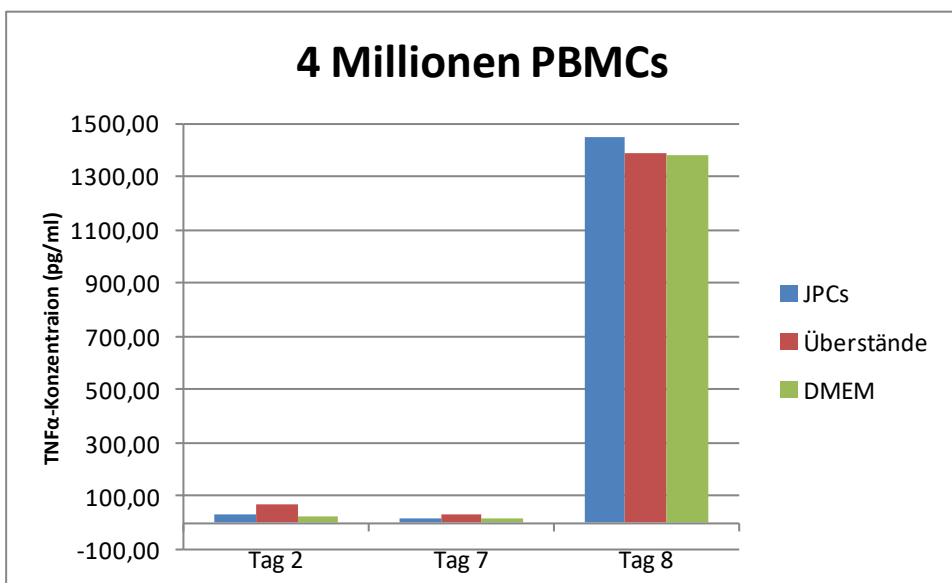


Abbildung 48: Balkendiagramm zur Konzentration von TNF- α an den verschiedenen Tagen und abhängig vom Aufbau der Kokultur.

4 Diskussion

Ziel dieser Arbeit war es, neue Erkenntnisse über den Einfluss von Zellen aus dem Kieferperiost auf die Differenzierung von peripheren Blutmonozyten zu dendritischen Zellen zu gewinnen. Basierend auf der Tatsache, dass Periostzellen als mesenchymale Stammzellen angesehen werden und von MSCs aus dem Knochenmark vielfältige immunsuppressive Effekte ausgehen, wird in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal untersucht, ob eine immunmodulatorische Funktion ebenfalls von Kieferperiostzellen ausgeht.

Zu diesem Zweck wurden zunächst Zellkulturen angelegt, bei denen die Kieferperiostzellen osteogen induziert wurden. Die Zellmineralisation wurde mithilfe von zwei Färbemethoden visualisiert. Die Alizarinfärbung machte die gebildeten Kalziumphosphatpräzipitate sichtbar, während mithilfe der zweiten Methode das Vorhandensein der knochenspezifischen alkalischen Phosphatase nachgewiesen werden konnte.

Es ist bekannt, dass die immunsuppressive Wirkung von MSCs auf verschiedene Immunzellen wenigstens partiellIDO- und Prostaglandin E₂ vermittelt ist (82). Aus diesem Grund wurden zunächst Überstände aus der Kultur der Kieferperiostzellen abgenommen, um herauszufinden an welchen Tagen der osteogenen Differenzierung die Ausschüttung vonIDO und PGE₂ am höchsten war.

Im nächsten Schritt wurde das Protokoll der dendritischen Zelldifferenzierung etabliert bzw. auf seine Effektivität, reife dendritische Zellen zu generieren, geprüft. Die anschließende Kokultur mit PBMCs und Kieferperiostzellen sollte dann anhand der durchflusszytometrischen Analyse die entscheidenden Erkenntnisse bezüglich der Effekte von Kieferperiostzellen auf dendritische Zelldifferenzierung liefern.

4.1 Osteogene Induktion der Kieferperiostzellen

Wie bereits von Jaiswal et al. nachgewiesen, lassen sich MSCs *in vitro* durch die Zugabe von osteogenen Stimulanzen in Richtung Knochen differenzieren. Anhand der Färbung der alkalischen Phosphatase und der Alizarinfärbung kann

die Bildung von Osteoblasten-ähnlichen Zellen nachgewiesen werden (83) (84). Abbildung 9 und Abbildung 10 zeigen jeweils die Alizarinfärbung der undifferenzierten Kontrolle und der osteogen induzierten Zellen. Die rot gefärbten Kalziumphosphatpräzipitate sind deutlich zu erkennen. In Abbildung 11 und Abbildung 12 ist die Färbung der alkalischen Phosphatase, eines Enzyms, das während des Mineralisationsprozesses eine wichtige Rolle spielt, zu erkennen. Auch hier ist bei den osteogen induzierten Zellen die rötliche Färbung, die die Enzymaktivität widerspiegelt, deutlich zu erkennen. Mithilfe beider Färbemethoden kann der Vorgang der Mineralisation nachgewiesen werden.

4.2 Verifizierung des Differenzierungsprotokolls zur dendritischen Zellreifung

In diesem Kapitel sollte zunächst die Ausreifung von dendritischen Zellen aus PBMCs induziert werden. Die Zellen wurden an Tag 2 und an Tag 8 mittels Durchflusszytometrie hinsichtlich spezifischer Oberflächenmarker analysiert, um sie so als Monozyten bzw. dendritische Zellen identifizieren zu können. Diese Durchführung war notwendig um eine geeignete Kokultur zwischen dendritischen Zellen und Kieferperiostzellen durchführen zu können.

Generell konnten sowohl zahlreiche inter- und intraindividuelle Abweichungen bei den Spendern beobachtet werden. Eine der möglichen Ursachen hierfür sind infektiöse Erkrankungen des Spenders. Hierbei könnte die Anzahl an Leukozyten / Lymphozyten sowie weiteren Zellen des Immunsystems erhöht sein und im aktivierten Zustand vorliegen und die Ergebnisse verfälschen.

Generell muss als Fehlerquelle der erste Schritt, also die Isolation der PBMCs aus dem Blut betrachtet werden. Bei einer nicht sauberen Abnahme der Interphase nach dem Zentrifugieren des Blut-Ficoll-Gemischs, kann es zu einer Kontamination mit Ficoll oder Plasma gekommen sein, was ebenso die Ergebnisse verfälschen kann. Hierzu eignet sich als Beispiel der Marker CD3. Dieser ist zusammen mit dem TCR auf T-Zellen vorhanden und für ihre Aktivierung notwendig (85). Der Marker ist jedoch in allen Versuchen durchweg

positiv. Dies lässt auf das Vorhandensein von T-Zellen schließen und damit auf einen nicht korrekt vollzogenen Trennungsschritt an Tag 2.

Die Marker CD80 und CD86 sollten auf reifen bzw. aktivierten dendritischen Zellen vorhanden sein. Bei den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit zeigt sich vor allem bei der Platte, die mit GM-CSF, IL-4, IL-1 β , TNF- α , IL-6 und PGE₂ behandelt wurde, eine Zunahme der positiven Zellen. Dies ist vor allem, wenn man die einzelnen Blutproben betrachtet, individuell schwächer oder stärker ausgeprägt. Zu berücksichtigen ist allerdings, dass für eine vollständige Reifung zur dendritischen Zelle und Aktivierung eine Antigenaufnahme und Präsentation notwendig ist. Fujii et al. haben gezeigt, dass mit α -Galaktosylceramid, einem Glykolipid, das anhand CD1d mit dem TCR von NK-Zellen interagiert, eine Aktivierung von NK-Zellen und folglich die Reifung der dendritischen Zellen mit Hochregulierung von CD80 und CD86 in Gang gesetzt wurde (86). Möglicherweise sind die Zellen, die hier untersucht wurden, in noch keinem ausgereiften Stadium und weisen daher die erwartete Oberflächenstruktur noch nicht vollständig auf. Dasselbe Problem könnte bei der Untersuchung des Oberflächenmarkers HLA-DR, der MHC-II entspricht, festgestellt werden. Diese Oberflächenantigene sollten ebenfalls nach der Aktivierung hochreguliert werden.

Der Marker CD83 konnte bereits in früheren Studien auf dendritischen Zellen nach Stimulation *in vitro* mit GM-CSF, IL-4 und TNF- α nachgewiesen werden (87). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ebenso ein Anstieg von CD83 wenn die Expression an Tag 2 vor der Stimulation mit der an Tag 8 nach der Differenzierung verglichen wird. Für diesen Marker zeigt sich jedoch ein deutlicherer Anstieg an positiven Zellen nach Stimulation mit LPS.

Auf der reifen dendritischen Zelle ist ebenfalls der Marker CCR7 vorhanden (88). In der vorliegenden Arbeit zeigt sich jedoch, dass die Zellen bereits an Tag 2 vor der Differenzierung positiv sind. Man kann jedoch auch bezüglich dieser Markerexpression an Tag 8 nach der zweiten Stimulation einen deutlichen Anstieg an positiven Zellen erkennen, was darauf schließen lässt, dass die Anzahl an reifen dendritischen Zellen zunimmt. Die bereits an Tag 2

nachgewiesene Positivität lässt sich durch das eventuelle Vorhandensein von T- und B-Zellen erklären. Der Marker CCR7 ist ebenfalls auf der Oberfläche von B- und T-Zell Subpopulationen exprimiert (89). Wie bereits oben erwähnt ist der Marker CD3, der vor allem auf T-Zellen vorhanden ist, auf allen Platten positiv.

CD14 ist auf Monozyten, aber nicht auf reifen dendritischen Zellen exprimiert (69) (87). Die durchflusszytometrischen Analysen zeigen wieder individuelle Schwankungen zwischen den einzelnen Patienten bzw. Blutproben. Dennoch zeigen die Werte vor allem wenn man einzelne Blutproben betrachtet ein deutliches Abfallen der positiven Zellen.

Zusammenfassend zeigt sich bei fast allen Werten eine deutliche Schwankung beim Betrachten der unterschiedlichen Blutproben. Um die Reproduzierbarkeit und Zuverlässigkeit der Versuche zu steigern, sollte die Anzahl der analysierten Blutproben erhöht werden.

Leider wurde der Oberflächenmarker DC-Sign (CD209) erst bei den Kokultur-Versuchen verwendet. Bei den Versuchen zur DC Differenzierung hätte dieser Marker vermutlich ebenfalls Erkenntnisse gezeigt.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die Expression von CD80, CD83, CD86, CD14 sowie HLA-DR die zu erwartende Änderung nach der Zugabe beider Differenzierungs-Cocktails gezeigt hat.

4.3 Nachweis der PGE₂ undIDO Konzentration in den Überständen von Kieferperiostzellen

Bei den Versuchen zur osteogenen Differenzierung von Kieferperiostzellen wurden diese bei jedem Medienwechsel konserviert und dann zum Nachweis von PGE₂ und IDO mittels ELISA herangezogen. Ziel dieser Versuchsreihe war es, für die Kokultur von PBMCs und Kieferperiostzellen den Zeitpunkt herauszufinden, an dem die höchsten PGE₂ und IDO Konzentrationen, die anti-inflammatorisch wirken, von den Kieferperiostzellen sezerniert werden, um optimale Bedingungen für die Kokultur-Versuche zu schaffen. Hierzu wurde mittels ELISA die Konzentration von PGE₂ und IDO an den Tagen 7, 14 und 21 der osteogenen Stimulation von Kieferperiostzellen zu untersuchen. Diese

Zytokine sind wie bereits erwähnt wichtige Faktoren, die für die immunsuppressive Wirkung von MSCs verantwortlich sind (90) (91) (92).

Tabelle

4

und

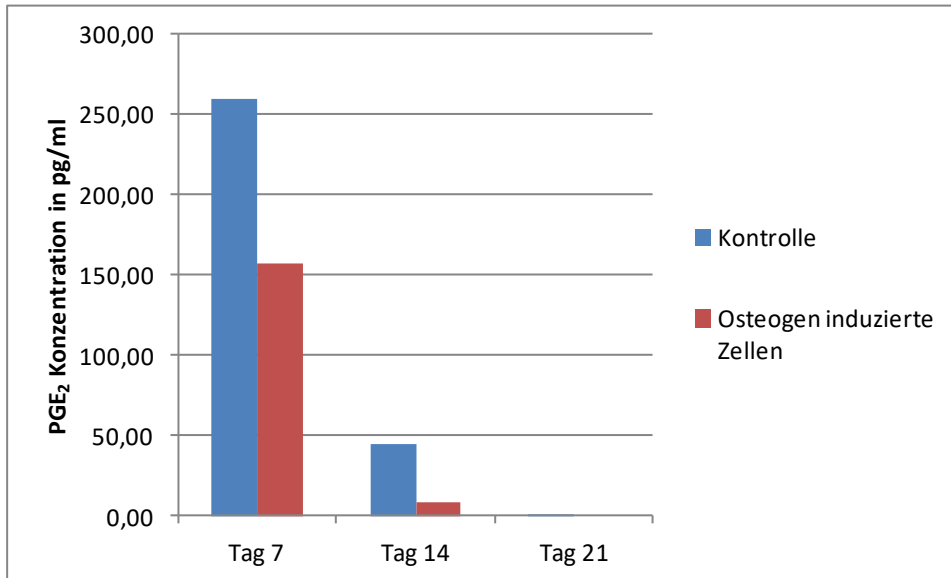


Abbildung 13 zeigen die PGE₂ Konzentrationen, die vor allem zu Beginn an Tag 7 hoch sind. An Tag 21 sind nur noch geringfügige PGE₂ Konzentrationen nachzuweisen. Bei IDO zeigen

Tabelle 5 und Abbildung 14 ein anderes Bild. Insgesamt ist kein relevanter Unterschied an den einzelnen Untersuchungstagen zu erkennen, die Konzentrationen blieben konstant hoch. Wenn die Zunahme der Zelldichte im Laufe der osteogenen Differenzierung berücksichtigt wird, ist ebenfalls eine Abnahme der IDO Konzentrationen zu verzeichnen, die jedoch aufgrund der höheren Zellzahl kompensiert wurde. Bei dennoch deutlicher Abnahme der PGE₂-Konzentration wurde für diese Arbeit ein Zeitraum bis zu 8 Tagen bei den Kokultur-Versuchen gewählt.

4.4 Einfluss von Kieferperiostzellen auf die dendritische Zellreifung

4.4.1 Monokultur mit JPCs und DMEM Medium

Dieser Versuch diente als Kontrolle zu den Kokultur-Versuchen mit Überständen und mit den MSCs. Ein Oberflächenprofil analog zu dem Vorversuch zur Verifizierung des Protokolls der DC Differenzierung war zu erwarten, jedoch zeigte sich die für reife DCs typische Oberflächenexpression nicht so stark ausgeprägt.

Die wichtigen Marker der dendritischen Zelle CD80, CD83 und CD86 (93) beispielsweise zeigten sich deutlich weniger positiv als in den Vorversuchen (Verifizierung der DC Differenzierung). Dies lässt darauf schließen, dass aus den isolierten Monozyten keine vollständig aktivierten dendritischen Zellen generiert werden konnten. Auch der Marker HLA-DR ist nicht wie erwartet ausgeprägt und deutlich niedriger. Der Marker CCR7 bleibt positiv, ist aber im Vergleich zu den Ergebnissen aus dem Vorversuch (Verifizierung der DC Differenzierung) nicht so stark ausgeprägt. Betrachtet man CD14, so erkennt man bei diesem Versuch eine deutlich höhere Anzahl positiver Zellen. Der Marker CD14 ist wie bereits erwähnt v.a. auf Monozyten zu finden. Dies lässt erneut auf einen fehlenden Trennungsschritt zu Beginn des Versuchs bzw. auf eine nicht vollzogene Reifung der dendritischen Zellen schließen. Vergleicht man den Versuchsaufbau der Vorversuche zur Verifizierung der DC Differenzierung und die Kokultur- bzw. Monokultur-Versuche, fällt auf, dass bei den Vorversuchen ausschließlich DC-Medium verwendet wurde und bei den Kokulturen im Insert DMEM Medium vorhanden war. Dies kann einerseits einen Verdünnungseffekt zur Folge haben, was die schlechteren Ergebnisse in der Monokultur beeinflusst haben könnte. Andererseits ist zu beachten, dass DMEM-Medium FCS (fetales Kälber-Serum) zugefügt wurde. Dies kann die Ausreifung der DCs negativ beeinflussen und somit zu dem schlechteren Ergebnis in der Monokultur führen (94) (95).

Betrachtet man die unterschiedliche Anzahl an PBMCs zu Beginn des Ansatzes der Monokultur, so fällt auf, dass bei den Versuchen kein wesentlicher

Unterschied zwischen 4 Millionen PBMCs und 1 Million PBMCs besteht. Abschließend konnte in der Monokultur eine Differenzierung zu dendritischen Zellen nicht bewiesen werden. Aus dem Grund wurden die Ergebnisse der Kokultur-Versuche, die mit JPCs durchgeführt wurden, im Ergebnisteil mit den Ergebnissen aus den Vorversuchen zur Differenzierung zur dendritischen Zelle in Relation gesetzt.

4.4.2 Kokulturen aus PBMCs und JPCs

Bei diesem Versuch wurden JPCs und PBMCs in Transwell-Platten kokultiviert. Das Ziel war es immunsuppressive Effekte von JPCs in ihrer Eigenschaft als MSCs aufzuzeigen (96). Hierbei wurde das Verhältnis JPCs/PBMCs von 1:50 ($2 \times 10^4 / 1 \times 10^6$) versus 1:200 ($2 \times 10^4 / 4 \times 10^6$) verglichen.

Dies war notwendig um herauszufinden, bei welchem Verhältnis der PBMCs zu den JPCs der beste immunsuppressive Effekt erzielt werden kann.

Betrachtet man die für die dendritische Zelle typischen Marker CD80 und CD83 fällt zunächst auf, dass die Werte an positiven Zellen im Vergleich zum Vorversuch zur DC Differenzierung deutlich sinken. Bezüglich CD80 scheint die Reduktion von positiven Zellen beim 1:50 Verhältnis deutlicher ausgeprägt zu sein. Während bei diesem Verhältnis 11,1% positive Zellen detektiert wurden, zeigten sich beim Verhältnis 1:200 noch 29,9% positiv. Das Ergebnis beim Verhältnis 1:50 entspricht mit 11,1% damit dann nahezu dem Wert der Vorversuche an Tag 2 vor der Stimulation zur DC Differenzierung. Ähnlich verhält es sich bezüglich des CD83 Markers. Mit 8,1% beim Verhältnis 1:50 sind weniger positive Zellen als beim Verhältnis 1:200 mit 13,7% vorhanden. Während der Differenzierung zur dendritischen Zelle zeigten sich 38,9% positive Zellen. Ein weiterer wichtiger Oberflächenmarker der dendritischen Zelle ist CD86. Hierbei zeigt sich ebenso ein besseres Ergebnis beim Verhältnis 1:50. Bei der Differenzierung zur dendritischen Zelle konnten 48,4% positive Zellen gemessen werden, während sich in der Kokultur mit JPCs nur noch 17,1% positive Zellen zeigten. Beim Verhältnis der JPCs zu den PBMCs von 1:200 war mit 38,2% Positivität ein geringer ausgeprägter Effekt zu sehen. Bei

allen drei Markern sind in der jeweiligen Monokultur schon bereits weniger positive Zellen enthalten als in der Kokultur.

Ein weiterer Marker, der auf der reifen dendritischen Zelle vorhanden sein sollte ist HLA-DR. Hier zeigte sich bereits in den Differenzierungsversuchen ein geringer Effekt bei nahezu identischen Werten an Tag 2 und Tag 8. In der Kokultur mit JPCs zeigt sich ein Absinken der HLA-DR+ Zellen. Hier sind die Prozentzahlen mit 12,9% (1:200) versus 10,1% (1:50) jedoch nicht nennenswert unterschiedlich.

Der Marker CCR7, der ebenfalls im Vergleich zu den Versuchen zur Differenzierung negativer werden sollte, zeigt diesen Effekt nur leicht ausgeprägt. Auch hier ist er allerdings beim Verhältnis 1:50 in den Kokulturen mit 60,3% im Vergleich zu 68,8% beim Verhältnis 1:200 etwas stärker ausgeprägt. Die dennoch hohe Anzahl positiver CCR7+ Zellen lässt jedoch darauf schließen, dass in den Kokulturen weiterhin aktivierte dendritische Zellen vorhanden sind. Andererseits ist wie auch bereits zuvor diskutiert davon auszugehen, dass sich weiterhin B- bzw. T-Zellen in der Kultur befinden, die ebenfalls den Marker CCR7 tragen. Dies ist vermutlich einem nicht korrekt vollzogenen Trennschritt zu Beginn oder der individuellen Bandbreite der Blutproben im Rahmen möglicher Infektionen geschuldet.

Marker CD14 ist wie oben beschrieben v.a. auf unreifen Monozyten exprimiert. Dieser sollte erwartungsgemäß im Vergleich zu den Vorversuchen zur DC Differenzierung in der Kokultur positiver sein. Bereits bei den Vorversuchen zeigte sich kein eindeutiger Effekt, da an Tag 2 24,7% Zellen positiv waren. Bis an Tag 8 der DC Differenzierung waren allerdings nur noch 11% CD14+ Zellen vorhanden. In der Kokultur mit JPCs stieg der Wert auf 36,6% (1:200) bzw. 20,7 (Verhältnis 1:50) an. Dies ist der einzige Marker, der bei dem Verhältnis von 1:200 ein besseres Ergebnis zeigt. Allerdings ist die Aussagekraft bei auch schon zuvor nicht eindeutigen Ergebnissen kritisch zu betrachten.

DC-Sign wurde erst bei den Kokultur-Versuchen als Marker hinzugenommen. Daher lässt sich kein Vergleich zu den Versuchen zur DC Differenzierung

ziehen. Allerdings fällt auch hier ein Unterschied zwischen den Verhältnissen auf. Das Verhältnis 1:50 zeigt mit 14,3% Positivität eine stärkere Reduktion und somit ein besseres Ergebnis als beim Verhältnis 1:200 mit 40,2%.

Zusammenfassend muss erneut kritisch betrachtet werden, dass es sich bei den Prozentzahlen um Mittelwerte handelt. Sowohl die Werte der Blutproben als auch die Ergebnisse einer Blutprobe bei den drei Durchführungen der Versuche zeigen erhebliche Schwankungen. Diese führen zu einer mehr oder weniger starken Verschiebung des Mittelwertes und verfälschen somit das Ergebnis. Um die Aussagefähigkeit der Versuche zu steigern, ist zur weiteren Untersuchung des Einflusses von Kieferperiozyten auf dendritische Zellen beim Versuchsaufbau eine erhöhte Anzahl von Versuchspersonen notwendig.

Dennoch sollte nicht außer Acht gelassen werden, dass sich bei den Kokulturen mit JPCs deutliche Unterschiede in Abhängigkeit von dem Verhältnis zu PBMCs zeigen. Nahezu alle Marker zeigen den erwarteten Effekt, der sich mit Ausnahme von CD14 in einer Reduktion der Positivität widerspiegelt, deutlicher bei einem JPCs/PBMCs Verhältnis von 1:50. Es sollte ebenso für weitere Untersuchungen bedacht werden, dass hier weitere Varianten, z.B. ein Verhältnis von 1:20 untersucht werden sollten.

4.4.3 Kokulturen aus PBMCs und Überständen

Wie bereits erläutert, sorgen JPCs für die Ausschüttung verschiedenster immunmodulatorischer Faktoren. Für diesen Kokultur-Versuch wurden Überstände aus der Zellkultur mit JPCs gesammelt. Diese wurden analog zu den eigentlichen Kokultur-Versuchen hergestellt und sollten die anti-inflammatorischen Zytokine enthalten, die Einfluss auf die dendritische Zellreifung nehmen sollten.

Betrachtet man die einzelnen Oberflächenmarker erkennt man, dass sich zu den Werten aus der Kokultur mit den JPCs bis auf wenige Ausnahmen nur sehr geringe Unterschiede zeigen. Die Marker CD83, HLA-I, CD14, CCR7 und CD3 zeigen keine wesentlichen Unterschiede. Beim Marker HLA-DR, der in der Kokultur weniger positive Zellen enthalten sollte, ist in der Kokultur mit 4

Millionen PBMCs und den JPC-Überständen mit 23,7% positiven Zellen dieser Effekt weniger stark ausgeprägt als in der Kultur mit 20.000 JPCs und 4 Millionen PBMCs (12,9% positive Zellen). Der Vergleichswert aus den Versuchen zum Nachweis der dendritischen Zelle lag hier bei 32,7% positiver Zellen. Ähnlich verhält sich dies beim Marker CD80. Hier sind in der Kokultur mit den Überständen und 1 Million PBMCs mit 21,6% positiven Zellen mehr vorhanden als in der Kultur mit 1 Million PBMCs und 20.000 JPCs (11,1% positive Zellen). Der Vergleichswert aus dem DC-Nachweis lag hier bei 42,8%.

Anders verhält es sich beim Marker CD86, der in der Kokultur negativ sein sollte. Bei einem Vergleichswert von 48,4% positiver Zellen im DC-Nachweis ergibt sich mit 28,8% positiver Zellen ein besseres Ergebnis in der Kokultur mit Überständen und 4 Millionen PBMCs als in der Kokultur mit 20.000 JPCs und 4 Millionen PBMCs (38,8% positive Zellen).

Abschließend ergibt sich bei den Kokulturen mit den Überständen lediglich bezüglich weniger Marker ein schlechteres Ergebnis als bei den Versuchen mit den JPCs. Die Unterschiede sind meist nur sehr gering, so dass in Zukunft weitere Versuchsdurchführungen mit JPC-Überständen durchaus in Betracht gezogen werden können. Man muss hierbei allerdings bedenken, dass die Überstände bei -80°C eingefroren und zum entsprechenden Zeitpunkt wieder aufgetaut wurden. Dieser Schritt kann durchaus zum Abbau der enthaltenen Zytokine führen.

Kritisch betrachtet werden sollte außerdem die Tatsache, dass in den Ansätzen der Monokultur offensichtlich bereits angezweifelt werden muss, dass hier dendritische Zellen zur Reifung angeregt werden konnten. Daher bleibt unsicher, ob die Werte aus den Kokulturen mit JPCs und JPC-Überständen letztendlich zuverlässig zu beurteilen sind.

4.5 Nachweis von proinflammatorischen Zytokinen aus den Überständen der Kokulturen

Im Rahmen der Kokulturen wurde an den Tagen 2, 7 und 8 jeweils das Medium des unteren Kompartiments, in dem sich PBMCs/DCs befanden, abgenommen

und bei -80°C eingefroren. Diese Überstände wurden hinsichtlich der pro-inflammatorischen Zytokine IL-12, IL-6 und TNF- α untersucht. Ziel war es herauszufinden ob sich diese durch die Kokultur und den erhofften anti-inflammatorischen Effekt durch die JPCs bzw. die JPC-Überstände vermindern.

Das Zytokin IL-12 wird unter anderem von dendritischen Zellen produziert. Es wirkt auf NK-Zellen und $T_{\text{H}}1$ -Zellen und fördert die pro-inflammatorische Immunantwort. Die IL-12 Produktion aus dendritischen Zellen wird durch die Bindung an CD40 oder MHC-II aktiviert (97).

Bei den Kokultur-Versuchen ist an Tag 8 eine verminderte Anzahl an dendritischen Zellen und daher auch weniger Produktion von IL-12 zu erwarten.

Abbildung 43 und Abbildung 44 zeigen die Ergebnisse aus der Kokultur mit 1 Million PBMCs und JPCs in einem Verhältnis von 1:50 sowie mit den Überständen und DMEM-Medium. Hierbei zeigte sich, dass bei der Monokultur mit DMEM die Konzentration von IL-12 annähernd auf einem gleichen Niveau bleibt. Sowohl bei der Kokultur mit JPC Überständen als auch mit den JPCs zeigte sich eine Abnahme der IL-12 Konzentrationen.

Betrachtet man die Ergebnisse aus der Kokultur mit JPCs in einem Verhältnis von 1:200 zeigte sich, dass die IL-12 Konzentrationen sich noch erhöhen. Die Werte aus den Kulturen mit DMEM bzw. den JPC Überständen zeigten in diesem Ansatz ein annähernd ähnliches Ergebnis wie beim Ansatz im Verhältnis 1:50. Der einzige Unterschied im Aufbau ist die Anzahl der PBMCs. Diese liegen hier bei 4×10^6 anstatt bei 1×10^6 . Es muss berücksichtigt werden, dass IL-12 außer von dendritischen Zellen noch von Monozyten und Makrophagen ausgeschüttet wird (97). An allen Untersuchungstagen finden sich in der Zellkultur, ob Mono- oder Kokultur, Monozyten, die IL-12 produzieren können. An Tag 8 soll in der Kokultur mit JPCs die Monozyten-Anzahl höher sein, da durch das immunsuppressive Milieu durch die JPCs eine Ausreifung zu dendritischen Zellen verhindert werden soll. Abschließend ist also die Untersuchung von IL-12 nur eingeschränkt geeignet, um die Entstehung des immunsuppressiven Milieus zu bestätigen. Dennoch zeigt sich wie beschrieben bereits ein Effekt in der Kokultur mit 20.000 JPCs und 1×10^6 PBMCs (Verhältnis

1:50). Dies bestätigt die Ergebnisse aus den bereits diskutierten Ergebnissen der Markerepression der dendritischen Zelle aus der Kokultur mit JPCs und 1×10^6 PBMCs.

Das Zytokin IL-6 zeigt viele Eigenschaften und Funktionen und wird von vielen verschiedenen Zellen ausgeschüttet. IL-6 wirkt sich einerseits auf das Wachstum und die Proliferation von Immunzellen aus, z.B. auf die Differenzierung der B-Zelle und der Produktion von Antikörpern und kann andererseits aber auch die Reifung und Proliferation von Immunzellen zu Makrophagen verhindern. Damit besitzt IL-6 sowohl pro- als auch anti-inflammatorische Funktionen (98) (99).

Im Rahmen der Versuche zur Differenzierung zur dendritischen Zelle wurde an Tag 7, nachdem die Stimulation durch GM-CSF und IL-4 erfolgte, ein Cocktail an Zytokinen hinzugegeben, der dafür sorgen sollte, dass sich die eventuell noch adhärennten dendritischen Zellen ablösen und in den Überstand übergehen, und so für die FACS-Messungen zur Verfügung standen. Dieser Zytokin-Mix enthielt u.a. IL-6.

Betrachtet man die Messungen des ELISAs fällt auf, dass an Tag 8 sowohl beim Verhältnis 1:50 als auch 1:200 die IL-6 Konzentrationen ansteigen. Dies ist natürlich auf die Zugabe im Medium zurückzuführen. An Tag 7 jedoch wurde noch kein IL-6 hinzugefügt. Beim Versuch mit 1×10^6 PBMCs ist die Konzentration deutlich geringer als in der Kokultur mit 4×10^6 PBMCs. Außerdem fällt auf, dass in der Monokultur mit DMEM geringere Level an IL-6 als in den Kokulturen mit den JPCs oder den Überständen vorhanden sind. Dies lässt darauf schließen, dass JPCs durchaus in der Kokultur IL-6 sezernieren und der inhibierende Effekt der JPCs hier nicht nachgewiesen werden kann.

Die Bestimmung der TNF- α Konzentration war ebenfalls nur eingeschränkt möglich, da es mit dem Zytokin-Mix an Tag 7 in das untere Kompartiment der Transwell-Platte dazugegeben wurde. TNF- α ist, wie bereits erwähnt, ein pro-inflammatorischer Faktor zur Immunregulation und -modulation (100) (101). In der Kokultur mit JPCs bzw. den Überständen wäre erwartungsgemäß ein

Absinken der TNF- α Konzentration zu verzeichnen gewesen. Auch bei diesen Ergebnissen müssen, aufgrund der Zugaben von TNF- α zum Medium, die Ergebnisse von Tag 8 außer Acht gelassen werden. An Tag 2 und Tag 7 sind keine detektierbaren Levels an TNF- α messbar. Dies lässt dementsprechend auch keine Rückschlüsse auf die Ergebnisse bezüglich der unterschiedlichen Konzentrationen von PBMCs schließen.

Abschließend ist bei diesen letzten Versuchen der Arbeit v.a. die Untersuchung von IL-12 aussagekräftig. Durch die Zugabe von IL-6 und TNF- α sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen nur eingeschränkt zu beurteilen. Es bleibt weiterhin zu bedenken, dass für die Versuche, die alle dreimal unter identischen Bedingungen durchgeführt wurden, das Medium mit den Zytokinen aufgetaut, aliquotiert, eingefroren und für den Versuch wieder aufgetaut wurde. Es ist unklar inwiefern diese Maßnahmen zu einem Zytokinabbau, der sich letztendlich auf die zu detektierende Konzentration auswirken könnte, geführt haben.

Nach Betrachtung und Interpretation der Ergebnisse zeigen sich zunächst die Grenzen der Arbeit. Eine Problemstellung, die sich komplett durch die Arbeit zieht sind die individuell stark schwankenden Werte. Bei drei unterschiedlichen Blutspendern zeigen sich bei fast allen Versuchen teilweise so große Schwankungen, dass die Mittelwerte bei einer Patientenzahl von $n=3$ nur begrenzt beurteilbar sind, da ein einzelner Wert den Mittelwert erheblich verfälschen kann. Hierbei sollte für eine Weiterführung der Versuche mit einer deutlich erhöhten Anzahl an Versuchspersonen und Blutproben gearbeitet werden. Auch bei den einzelnen identisch durchgeführten Versuchen mit einer Blutprobe ergaben sich Schwankungen der Werte. Daher ist ein erneutes kritisches Betrachten der Methode und Durchführung mit möglichen Fehlerquellen notwendig.

Einige Versuche haben nicht das gewünscht Ergebnis gezeigt. So ist z.B. im Rahmen der Monokultur die Differenzierung zur dendritischen Zelle nicht gelungen. Dies ist bei der analogen Durchführung ohne Transwell-Platten im

Versuch zuvor, wenn man einige Werte der Oberflächenmarker der dendritischen Zelle betrachtet, gelungen.

5 Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von Kieferperiostzellen in ihrer Eigenschaft als mesenchymale Stromazellen auf die Differenzierung von peripheren Blutmonozyten zu dendritischen Zellen untersucht werden. Die Hypothese, ob Kieferperiostzellen für ein anti-inflammatorisches Milieu sorgen und somit die Differenzierung bzw. Ausreifung der dendritischen Zelle eindämmen, soll im Rahmen der vorliegenden Arbeit geklärt werden.

Zunächst erfolgte die osteogene Induktion von Kieferperiostzellen. Anhand von histologischen Färbungen des Enzyms alkalische Phosphatase und der Alizarinfärbung als Nachweis der Zellmineralisierung, konnte im Anschluss die Bildung von Osteoblasten-ähnlichen Zellen nachgewiesen werden. Um den optimalen Zeitpunkt für die späteren Kokulturen zu ermitteln, wurden die Überstände von osteogen-induzierten Kieferperiostzellen zu verschiedenen Zeitpunkten, bezüglich der immunsuppressiven Faktoren PGE2 undIDO untersucht.

Im nächsten Schritt erfolgte die in vitro Differenzierung von dendritischen Zellen aus peripheren Blutmonozyten (PBMCs). In den verschiedenen Ansätzen ließ sich erkennen, dass der Zytokincocktail, der die Faktoren GM-CSF, IL-4, IL-1 β , TNF- α , IL-6 und PGE2 enthielt, die besten Ergebnisse zeigte. Unter Berücksichtigung individueller Schwankungen der einzelnen Proben, ließen sich für dendritische Zellen definierte Oberflächenmarker wie CD80, CD83 und CD86 nachweisen.

Die Kokultur-Versuche mit Kieferperiostzellen bzw. deren Überständen und den stimulierten PBMCs, als wichtigster Teil der vorliegenden Arbeit, zeigten vielversprechende durchflusszytometrische Ergebnisse. In der Kokultur mit JPCs und PBMCs in einem Verhältnis von 1:50, zeigte sich eine deutliche Abnahme der Positivität für die oben genannten dendritischen Markern. Tendenziell zeigte sich weiterhin eine Abnahme der CCR7, DC Sign und HLA-DR Expression in Anwesenheit der Kieferperiostzellen. Mittels ELISA konnten tendenziell niedrigere IL-12 Levels in Überständen der DCs in Anwesenheit der JPCs detektiert werden. Diese Ergebnisse weisen auf eine Unterdrückung der

DC Differenzierung durch die Wirkung von JPCs hin. Weitere Untersuchungen erscheinen demnach erfolgversprechend und sinnvoll zu sein.

Für eine Fortsetzung der Versuche sollte die Anzahl der Spender erhöht werden, um eine bessere Aussagekraft der Ergebnisse zu gewährleisten. Im Rahmen dieser Arbeit war eine Erhöhung der Patientenzahl nicht realisierbar. Außerdem erscheinen bei Betrachtung der Ergebnisse der Kokulturen, insbesondere der unterschiedlichen Verhältnisse von PBMCs und JPCs, weitere Versuche mit unterschiedlicher Anzahl von PBMCs sinnvoll.

Abschließend ist mit der vorliegenden Arbeit ein erster Schritt zur Untersuchung potenzieller, immunmodulatorischer Funktionen von JPCs gelungen. In weiteren Studien sollten schrittweise Testsysteme etabliert werden, mithilfe derer die Effekte von Tissue Engineering Konstrukten auf unterschiedliche Immunzellen zuverlässig evaluiert werden können. Dadurch können Tissue Engineering Konstrukte optimiert werden, bevor diese in den Patienten implantiert werden, um auf diese Weise eine Abstoßung zu vermeiden.

6 Literaturverzeichnis

1. **Janeway C.A., Murphy K., Travers P., Walport M.** *Immunologie*. 7. Auflage. Heidelberg : Spektrum Verlag, 2009. S. 4-6.
2. **Vollmar A., Zündorf I., Dingermann T.** *Immunologie*. 2. Auflage. München, Frankfurt am Main : Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart, 2013. S. 3-4.
3. **Janeway C.A., Medzhitov R.** Innate immune recognition. *Annual review of immunology*. 20(1), 2002, S. 196-216.
4. **Aumüller G., Aust G., Doll A., et al.** *Duale Reihe Anatomie*. 1. Auflage. s.l. : Thieme, 2006. S. 149-156.
5. **Van Furth R., Cohn Z.A., Hirsch J.G., Humphrey J.H., Spector W.G., Langevoort H.L.** The mononuclear phagocyte system: a new classification of macrophages, monocytes, and their precursor cells. *Bulletin of the World Health Organization*. 1972, 46(6), S. 845–852.
6. **Trinchieri, G.** Biology of natural killer cells. *Advances in immunology*. 1989, 47, S. 187-376.
7. **Janeway C.A., Murphy K., Travers P., Walport M.** *Immunologie*. 7. Auflage. Heidelberg : Spektrum Verlag, 2009. S. 49-55.
8. **Ryan J.M., Barry F.P., Murphy J.M., Mahon B.P.** Mesenchymal stem cells avoid allogeneic rejection. *Journal fo Inflammation*. 2008, 2, S. 8.
9. **Janeway C.A., Murphy K., Travers P., Walport M.** *Immunologie*. 7. Auflage. Heidelberg : Spektrum Verlag, 2009. S. 60-87.
10. **Ozinsky A., Underhill D.M., Fontenot J.D., Hajjar A.M., Smith K.D., Wilson C.B., Aderem A.** The repertoire for pattern recognition of pathogens by the innate immune system is defined by cooperation between toll-like receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 97(25), 2000, S. 13766-13771.
11. **Steinmann, R.M.** The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual review of immunology*. 1991, Bd. 9. Jg., Nr. 1, S. S. 271-296.

12. **Salusto F., Lanzavecchia A.,** Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor. *Journal of Experimental Medicine*. 1994, Bd. Nr. 4, 179. Jg., S. S. 1109-1118.
13. **Ezekowitz R.A., et al.** Molecular characterization of the human macrophage mannose receptor: demonstration of multiple carbohydrate recognition-like domains and phagocytosis of yeasts in Cos-1 cells. *Journal of Experimental Medicine*. 1990, Bd. 172, 6, S. 1785-1794.
14. **Janeway C.A., Murphy K., Travers P., Walport M.** *Immunologie*. 7. Auflage. Heidelberg : Spektrum Verlag, 2009. S. 18.
15. **Turner M.W., Hamvas R.M.** Mannose-binding lectin: structure, function, genetics and disease associations. *Reviews in immunogenetics*. 1999, Bd. 2, 3, S. 305-322.
16. **Lemaitre B., Nicolas E., Michaut L., Reichhart J.-M., Hoffmann J.A.** The dorsoventral regulatory gene cassette spätzle/Toll/cactus controls the potent antifungal response in Drosophila adults. *Cell*. 1996, 86:973.
17. **Takeda K., Akira S.** Toll-like receptors in innate immunity. *International immunology*. 2005, Bd. 17, 1, S. 1-14.
18. **Poltorak A., et al.** Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutation in Tlr4 gene. *Science*. 1998, 282:2085.
19. **Wright S.D., et al.** CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protei. *Science*. 1990, Bd. 249, 4975, S. 1431-1434.
20. **Sallusto F., Lanzavecchia A.** Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *Journal of Experimental Medicine*. 1994, 4, S. 1109-1118.
21. **Pandey, J.P.** Major histocompatibility complex. *Medical Immunology*,6. 2007, S. 23-34.

22. **Janeway C.A., Murphy K., Travers P., Walport M.** *Immunologie*. 7. Auflage. Heidelberg : Spektrum Verlag, 2009. S. 106-117.
23. —. *Immunologie*. 7. Auflage. Heidelberg : Spektrum Verlag, 2009. S. 1008-1013.
24. **Mosmann T.R., Subash S.** The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology today*. 17(3), 1996, S. 138-146.
25. **Gabay C., Kushner I.** Acute-phase proteins and other systemic responses to inflammation. *New England Journal of Medicine*. 340(6), 1999, S. 448-454.
26. **Hehlgans T., Pfeffer K.** The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 115(1), 2005, S. 1-20.
27. **Rahmann M.M., McFadden G.,** Modulation of Tumor Necrosis Factor by Microbial Pathogens. *PLoS Pathogens*. 2(2), 2006, S. e4.
28. **Poli G., Kinter A., Justement J.S., Kehrl J.H., Bressler P., Stanley S., Fauci A.S.** Tumor necrosis factor alpha functions in an autocrine manner in the induction of human immunodeficiency virus expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87(2), 1990, Bde. Poli G., Kinter A., Justement J.S., Kehrl J.H., Bressler P., Stanley S., Fauci A.S., S. 782-785.
29. **Mosmann T.R., Coffman R.L.** TH1 and TH2 Cells: Different Patterns of Lymphokine Secretion Lead to Different Functional Properties. *Annual Review of Immunology*. 7(1), 1989, S. 145-173.
30. **Coffmann, R.L.** Origins of the TH1-TH2 model: a personal perspective. *Nature*. 7(6), 2006, S. 539-541.
31. **Sotiropoulou P.A., Papamichail M.** Immune Properties of Mesenchymal Stem Cells,. [Hrsg.] Humana Press. *Methods in Molecula Biology*. 407, S. 225-243.
32. **Jiang X.X., Zhang Y., Liu B., Zhang S.X., Wu Y., Yu X.D., Mao N.** Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation and function of human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005, 105, S. 4120-4126.

33. **Steinmann, R.M.** The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annual review of immunology*. 9, 1991, 1, S. 271-296.
34. **Mellmann I., Steinmann R.M.** Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell*. 106, S. 255-258.
35. **Romani N., Gruner S., Brang D., Kämpgen E., Lenz A., Trockenbacher B., Konwalinka G., Fritsch P.O., Steinman R.M., Schuler G.** Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *Journal of Experimental Medicine*. 1995, 1, S. 83-93.
36. **Fadilah S.A.W., Cheong S.K.** Dendritic cell immunobiology and potential roles in immunotherapy. *Malaysian Journal of Pathology*. 29(1), 2007, S. 1-18.
37. **O'doherty U., Peng M., Gezelter S., Swiggard W. J., Betjes M., Bhardwaj N., Steinman R.M.** Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology*. 82(3), 1994, S. 487.
38. **Janeway C.A., Murphy K., Travers P., Walport M.** *Immunologie*. Heidelberg : Spektrum Verlag, 2009. S. 409-427. Bd. 7. Auflage.
39. **Bolon, B.** Cellular and molecular mechanisms of autoimmune disease. *Toxicologic pathology*. 40(2), 2012, S. 216-229.
40. **Smith D.A., Germolec D.R.** Introduction to immunology and autoimmunity. *Environmental health perspectives*. 1999, Bd. 197(Suppl 5), S. 661.
41. **Baron F., Storb R.** Mesenchymal stromal cells: a new tool against graft-versus-host disease? *Biology of Blood and Marrow Transplantation*. 2012, Bd. 18(6), S. 822-840.
42. **Aggarwal S., Pittenger M.F.** Human mesenchymal stem cells modulate allogeneic immune cell responses. *Blood*. 2005, 105, S. 1815-1822.
43. **Van den Brink M.R., Burakoff S.J.** Cytolytic pathways in haematopoietic stem-cell transplantation. *Nature Reviews Immunology*. 2002, 2, S. 273-281.
44. **Socié G., Blazar B.R.** Acute graft-versus-host disease: from the bench to the bedside. *Blood*. 114(20), 2009, S. 4327-4336.

45. **Zeiser R., Dreger P., Finke J., Greinix H., Holler E., Luft T, Mielke S., Scheid C., Wolff D.** Leitlinien zur allogenen Stammzelltransplantation. 9. *GVHD-Prophylaxe und Therapie*. [Online] November 2016. [Zitat vom: 21. Oktober 2019.] https://www.dag-kbt.de/files/downloads/Leitlinien_Kap-09_GvHD-Prophylaxe%20und%20Therapie.pdf.
46. **De Bari C., Dell'Accio F., Vanlauwe J., Eyckmans J., Khan I. M., et. al.** Mesenchymal Multipotency of Adult Human Periosteal Cells Demonstrated by Single-Cell-Lineage Analysis. *American College of Rheumatology*. 2006, 4, S. 1209-1221.
47. **Pittenger M.F., Mackay A.M., Beck S.C., Jaiswal R.K., Douglas R., Mosca J.D., Moorman M.A., Simonetti D.W, Craig S., Marshak D.R.** Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 1999, 284, S. 143-147.
48. **Castro-Manreza M.E., Montesinos J.J.** Immunoregulation by mesenchymal stem cells: biological aspects and clinical applications. *Journal of immunology research*, 2015.
49. **Karagöz E., Demircan P.C., Erman G., Güngörürler E., Eker A.** Comparative Analyses of Immune-Suppressive Characteristics of Bone-Marrow, Wharton's Jelly and Adipose-Tissue Derived Human MSCs. [Hrsg.] Hospital - Center for Regenerative Medicine and Stem Cell Research and Manufacturing. *Liv*. 2016.
50. **Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S. E., & Ringden, O.** Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scandinavian journal of immunology*. 57, 2003, 1, S. 11-20.
51. **Djouad F., Charbonnier L.M., Bouffi C., Louis-Pence P., Bony C., Apparailly F., Noel, D.** Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Differentiation of Dendritic Cells Through an Interleukin-6-Dependent Mechanism. *Stem cells*. 25(8), 2007, S. 2025-2032.

52. **Le Blanc K, Mougiakakos D.** Multipotent mesenchymal stromal cells and the innate immune system. *Nature Reviews Immunology*. 2012, 5, S. 383-396.
53. **Dominici M., Le Blanc K., Mueller I., Slaper-Cortenbach I., Marini F., Krause D., Deans R., Keating A., Prockop D., Horwitz E.** Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 2006, 4, S. 315-317.
54. **Cognet P.A., Minguell J.J.** Phenotypical and functional properties of human bone marrow mesenchymal progenitor cells. *J. Cell. Physiol.* 1999, 181, S. 67-73.
55. **Majumdar M.K., Thiede M.A., Mosca J.D., Moormann M., Gerson S.L.** Phenotypic and functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J.Cell.Physiol.* 1998, 176, S. 57-66.
56. **Haynesworth S.E., Baber M.A., Caplan A.I.** Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 α . *J.Cell.Physiol.* 1996, 166, S. 585-592.
57. **Di Nicola M., Carlo-Stella C., Magni M., Milanesi M., Longoni P.D.,** Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood*. 2002, 99, S. 3838-3842.
58. **Chen W., Liang X., Peterson A.J., Munn D.H., Blazar B.R.** The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *J Immunol.* 181(8), 2008, S. 5396–5404.
59. **Munn D.H., Shafizadeh E., Attwood J.T., Bondarev I., Pashine A., Mellor A.L.** Inhibition of T Cell Proliferation by Macrophage Tryptophan Catabolism . *J Exp Med.* 189(9), 1999, S. 1363–1372.
60. **Frumento G., Rotond R., Tonetti M., Damonte G., Benatti U., Ferrara G.B.** Tryptophan-derived Catabolites Are Responsible for Inhibition of T and Natural Killer Cell Proliferation Induced by Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *Journal of Experimental Medicine.* 2002, 196, S. 459-468.

61. **Svobodova E., Krulova M., Zajicova A., Pokorna K., Prochazkova J., Trosan P., Holan V.** The Role of Mouse Mesenchymal Stem Cells in Differentiation of Naive T-Cells into Anti-Inflammatory Regulatory T-Cell or Proinflammatory Helper T-Cell 17 Population. *Stem Cells and Development*. 2012, 6, S. 901-910.
62. **Krampera M., et al.** Role for Interferon-gamma in the Immunomodulatory Activity of Human Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells. *Stem Cells*. 2006, 24, S. 386-398.
63. **Ren G., Zhang L., Zhao X., Xu G., Zhang Y., Roberts A.I., Zhao R.C., Shi Y.** Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell stem cell*. 2008, 2, S. 141-150.
64. **Nasef A., Mathieu N., Chapel A., Frick J., François S., Mazurier C., Boutarfa A., Bouchet S., Gorin N.-C., Thierry D., Fouillard L.** Immunosuppressive effects of mesenchymal stem cells: involvement of HLA-G. *Transplantation*. 2007, 84, S. 231-237.
65. **Maccario R., Podesta M., Moretta A., Cometa A., Comoli P., Montagna D., Daudt L., Idaticci, A. Piaggio G., Pozzi S., Frassoni F, Locatelli F.** Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica*. 2005, 90, S. 516-525.
66. **Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringden O.** HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells. *Exp.Hematol*. 2003, 31, S. 890-896.
67. **Ljunggren H.G., Kärre K.** In search of the 'missing self': MHC molecules and NK cell recognition. *Immunology today*. 11, 1990, S. 237-244.
68. **Liu H., Kemeny D.M., Heng B.C., Ouyang H.W., Melendez A.J., Cao T.** The immunogenicity and immunomodulatory function of osteogenic cells differentiated from mesenchymal stem cells. *The Journal of Immunology*. 2006, 176, S. 2864-2871.

69. **Jiang X.X., Zhang Y., Liu V., Zhang S-X., Wu Y., Yu X-D., Mao N.** Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2005, 105, S. 4120-4126.
70. **Nauta A.J., Kruisselbrink A.B., Lurvink E., Willemze R., Fibbe W.E.** Mesenchymal stem cells inhibit generation and function of both CD34+-derived and monocyte-derived dendritic cells. *The Journal of Immunology*. 2006, 177, S. 2080-2087.
71. **Beyth S., Borovsky Z., Mevorach D., Liebergall M., Gazit Z., Aslan H., Galun E., Rachmilewitz J.** Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 2005, 99, S. 2214-2219.
72. **Abe K., Yarovinsky F.O., Murakami T., Shakhov A.N., Tumanov A.V., Ito D., Drutskaya L.N., Pfeffer K., Kuprash D.V., Komschlies K.L., Nedospasov S.A.** Distinct contributions of TNF and LT cytokines to the development of dendritic cells in vitro and their recruitment in vivo. 2003, 101, S. 1477-1483.
73. **Ringe J., Leinhase I., Stich S., Neumann K., Haisch A., Häup R., Manz R., Kaps C., Sittlinger M.** Human mastoid periosteum-derived stem cells: promising candidates for skeletal tissue engineering. *Journal of Tissue engineering and Regenerative Medicine*. 2008, 2, S. 136-146.
74. **Trento C., Dazzi F.** Mesenchymal stem cells and innate tolerance: biology and clinical applications. *Swiss Med Wkly*. 2010, 140, S. E1-E8. Nr13121.
75. **Ringdén O, Uzunel M, Sundberg B, Lönnies L, Nava S, Gustafsson J, Henningsohn L, Le Blanc K.** Tissue repair using allogeneic mesenchymal stem cells for hemorrhagic cystitis, pneumomediastinum and perforated colon. *Leukemia*. 2007, 21, S. 2271-2276.
76. **Beyth S., Borovsky Z., Mevorach D., Liebergall M., Gazit Z., Aslan H., Rachmilewitz J.** Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood*. 105(5), 2005, S. 2214-2219.

77. **Le Blanc K., Rasmusson I., Sundberg B., Götherström C., Hassan M., Uzunel M., Ringdén O.** Treatment of severe acute graft-versus-host disease with third party haploidentical mesenchymal stem cells. *The Lancet*. 2004, 636, S. 1439-1441.
78. **Ringdén O., Uzunel M., Rasmusson I., Remberger M., Sundberg B., Lönnies H., Omazic B.** Mesenchymal stem cells for treatment of therapy-resistant graft-versus-host disease. *Transplantation*. 81(10), 2008, S. Transplantation.
79. **Le Blanc K, Frassoni F, Ball L, et al.** Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *Lancet*. 2008, 371, S. 1579-1568.
80. **Baron F, Storb R.** Mesenchymal stromal cells: a new tool against graft-versus-host disease? 2012, 18(6) , S. 822-840.
81. **Zappia E., Casazza S., Pedemonte E., Benvenuto F., Bonanni I., Gerdoni E., Giunti D., Ceravolo A., Cazzanti F., Frassoni F., Mancardi G., Uccelli A.** Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood*. 2005, 5, S. 1755-1761.
82. **Chen K., Wang D., Du W. T., Han Z. B., Ren H., Chi Y. & Han, Z. C.** Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clinical Immunology*. 135(3), 2010, S. 448-458.
83. **Jaiswal N., Haynesworth S.E., Caplan A.I., Bruder S.P.** Osteogenic differentiation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells in vitro. *Journal of cellular biochemistry*. 64(2), 1997, S. 295-312.
84. **Eskildsen T., Taipaleenmäki H., Stenvang J., Abdallah B.M., Ditzel N., Nossent A.Y., Kassem M.** MicroRNA-138 regulates osteogenic differentiation of human stromal (mesenchymal) stem cells in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 108(15), 2011, S. 6139-6144.

85. **Clevers H., Alarcon B., Wileman T., Terhorst C.** The T cell receptor/CD3 complex: a dynamic protein ensemble. *Annual review of immunology*. 6(1), 1988, S. 629-662.
86. **Fujii S.I., Liu K., Smith C., Bonito A.J., Steinman R.M.** The linkage of innate to adaptive immunity via maturing dendritic cells in vivo requires CD40 ligation in addition to antigen presentation and CD80/86 costimulation. *Journal of Experimental Medicine*. 199(12), 2004, S. 1607-1618.
87. **Zhou L.J., Tedder T.F.** CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 93(6), 1996, S. 2588-2592.
88. **Parlato S., Santini S.M., Lapenta C., Di Pucchio T., Logozzi M., Spada F.M., Belardelli F.** Expression of CCR-7, MIP-3 β , and Th-1 chemokines in type I IFN-induced monocyte-derived dendritic cells: importance for the rapid acquisition of potent migratory and functional activities. *Blood*. 98(10), 2001, S. 3022-3029.
89. **Förster R., Davalos-Miszlitz A.C., Rot A.** CCR7 and its ligands: balancing immunity and tolerance. *Nature Reviews Immunology*. 8(5), 2008, S. 362.
90. **Bouffi C., Bony C., Courties G., Jorgensen C., Noel D.** IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PloS one*. 5(12), 2010, S. e14247.
91. **Spaggiari G.M., Capobianco A., Abdelrazik H., Becchetti F., Mingari M.C., Moretta L.** Mesenchymal stem cells inhibit natural killer–cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2, 3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood*. 111(3), 2008, S. 1327-1333.
92. **Meisel R., Zibert A., Laryea M., Göbel U., Däubener W., Dilloo D.** Human bone marrow stromal cells inhibit allogeneic T-cell responses by indoleamine 2, 3-dioxygenase–mediated tryptophan degradation. *Blood*. 103(12), 2004, S. 4619-4621.

93. **Banchereau J., Briere F., Caux C., Davoust J., Lebecque S., Liu Y. J. & Palucka K.** Immunobiology of dendritic cells. *Annual review of immunology*. 18(1), 2000, S. 767-811.
94. **Eggert A. O., Becker J. C., Ammon M., McLellan A. D., Renner G., Merkel A., & Kämpgen E.** Specific peptide-mediated immunity against established melanoma tumors with dendritic cells requires IL-2 and fetal calf serum-free cell culture. *European journal of immunology*. 32(1), 2002, Bde. 122-127.
95. **Siena S., Di M. N., Bregni M., Mortarini R., Anichini A., Lombardi L. & Gianni A. M.** Massive ex vivo generation of functional dendritic cells from mobilized CD34+ blood progenitors for anticancer therapy. *Experimental hematology*. 23(14), 1995, S. 1463-1471.
96. **Uccelli A., Moretta L., Pistoia V.** Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nature reviews immunology*. 8(9), 2008, S. 726.
97. **Koch N.F., Stanzl U., Jennewein P., Janke K., Heufler C., Kämpgen E., Schuler G.** High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *Journal of Experimental Medicine*. 184(2), 1996, S. 741-746.
98. **Tilg H., Dinarello C.A., Mier J.W.** IL-6 and APPs: anti-inflammatory and immunosuppressive mediators. *Immunology today*. 18(9), 1997, S. 428-432.
99. **Jego G., Palucka A.K., Blanck J.P., Chalouni C., Pascual V. Banchereau J.** Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity*. 19(2), 2003, S. 225-234.
100. **Caux C., Vanbervliet B., Massacrier C., Dezutter-Dambuyant C., de Saint-Vis B., Jacquet C., Banchereau J.** CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. *Journal of Experimental Medicine*. 184(2), 1996, S. 695-706.
101. **Pasparakis M., Alexopoulou L., Episkopou V., Kollias G.** Immune and inflammatory responses in TNF alpha-deficient mice: a critical requirement for

TNF alpha in the formation of primary B cell follicles, follicular dendritic cell networks and germinal centers, and in the maturation of the humoral immune response. *Journal of Experimental Medicine*,. 184(4), 1996, S. 1397-1411.

102. **Dai J., Rottau D., Kohler F., Reinert S., Alexander D.** Effects of jaw periosteal cells on dendritic cell maturation. *Journal of Clininca Medicine*. 7 (10), 2018, S. 312.

7 Erklärung zum Eigenanteil

Erklärung zum Eigenanteil der Dissertationsschrift

Die Arbeit wurde im Labor der Klinik und Poliklinik für Mund-Kiefer- und Gesichtschirurgie unter Betreuung von Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich und Prof. Dr. Dr. Siegm. Reinert durchgeführt.

Die Konzeption der Studie erfolgte in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich.

Die Versuche wurden nach Einarbeitung durch die technische Assistentin Melanie Rieger, Dipl. biol. Annika Henrich und Dipl. biol. Julia Huth eigenständig von mir durchgeführt.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Beratung und Anleitung von Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich durch mich.

Korrigiert wurde die Arbeit durch die Laborleiterin Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich.

Ich versichere, das Manuskript verfasst zu haben und keine weiteren als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

Tübingen, den 26.02.2020

Im Rahmen der Arbeit entstandene Publikation:

Dai J., Rottau D., Kohler F., Reinert S., Alexander D. Effects of Jaw Periosteal Cells on Dendritic Cell Maturation. *Journal of Clinical Medicine*. 7(10), 2018, S. 312

Folgende Teile der Dissertation wurden in der Publikation weiterverwendet:

- Methode: Isolation von PBMCs, Differenzierung von PBMCs zu dendritischen Zellen
- Methode: Kokulturen von JPCs und PBMCs

8 Veröffentlichungen

Teile der vorliegenden Dissertationsschrift wurden bereits in folgender Publikation veröffentlicht:

Dai J., Rottau D., Kohler F., Reinert S., Alexander D. Effects of Jaw Periosteal Cells on Dendritic Cell Maturation. *Journal of Clinical Medicine*. 7(10), 2018, S. 312

Danksagung

Mein größter Dank geht an Herrn Prof. Dr. Dr. Siegmar Reinert, den ärztlichen Direktor der Klinik und Poliklinik für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie, für die freundliche Überlassung der Dissertation. Ich durfte in einem von ihm geprägten gleichwohl professionellen und familiären Umfeld lernen und arbeiten und bedanke mich für das entgegengebrachte Vertrauen.

Mein ganz besonderer Dank gilt Prof. Dr. Dorothea Alexander-Friedrich, die es mir ermöglichte unter ihrer Anleitung meine Dissertation durchzuführen. Ich danke ihr für die kontinuierliche Begleitung der Arbeit, die Einführung in wissenschaftliches Arbeiten, den regelmäßigen Austausch sowie das stetige Voranbringen meiner Arbeit mit neuen Denkanstößen.

Mein besonderer Dank geht an Melanie Rieger, die mich mit unermüdlicher Motivation in alle Arbeiten im Labor eingeführt hat, meine „ersten Schritte“ begleitete und mir dabei auch die Freude an der Arbeit Tag für Tag näher gebracht hat. Ganz besonders danke ich ihr für die Anleitung zur Arbeit am FACS-Gerät sowie ihr immer offenes Ohr und die vielen Ratschläge während der Versuchsdurchführungen.

Weiterhin möchte ich Annika Henrich für die wissenschaftliche Unterstützung und Diskussion während der Arbeit im Labor und für ihr stets offenes Ohr im Labor und darüber hinaus danken.

Ich danke Julia Huth, Adelheid Munz, Liane Schuster herzlichst für die geduldige Anleitung, die zuverlässige Hilfe und die konstruktiven Diskussionen.

Mein besonderer Dank gilt meinem Mann David Leitenberger. Er motivierte mich Tag für Tag, mein Ziel nicht aus den Augen zu verlieren und sorgte dafür, dass ich auch in größter Hektik des Alltags Zeit für das Schreiben dieser Arbeit finden konnte. Du und unsere Töchter Hannah und Marie, ihr seid mein Leben.

Zuletzt gilt mein besonderer Dank meinen Eltern für ihre bedingungslose Liebe und dafür, dass sie mir Alles ermöglichen und immer an mich glauben.