

Aus dem Interfakultären Institut für Zellbiologie
der Universität Tübingen
Abteilung Immunologie
Abteilungsleiter Professor Dr. H.-G. Rammensee

**Expression der Eisenstoffwechselproteine
Divalent-Metal-Transporter-1, Ferroportin-1,
HFE und Transferrinrezeptor-1 humaner
Dendritischer Zellen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Martin Brinkmann
aus Köln
2006

Dekan: Professor Dr. C.D. Claussen

1.Berichterstatter: Professor Dr. H.-G. Rammensee

2.Berichterstatter: Professor Dr. H. Oßwald

Meinen Eltern gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
1.1	Das Immunsystem des Menschen	7
1.1.1	Die angeborene Immunität	8
1.1.2	Die adaptive Immunität	9
1.2	Eisen im Zellstoffwechsel	13
1.2.1	Die Bedeutung des Eisens	13
1.2.2	Eisen als infektionsassoziiertes Faktor	14
1.2.3	Der Eisenmetabolismus	15
1.2.4	Die Regulation der Eisenaufnahme	20
1.3	Dendritische Zellen und Eisen	21
1.4	Zielsetzung der Arbeit	22
2	Material und Methodik	23
2.1	Zellkultur der Dendritischen Zellen	23
2.1.1	Isolierung von monozytären Zellen aus Buffy-Coats	23
2.1.2	Stimulation mit GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating-Factor) und IL-4 (Interleukin-4)	25
2.1.3	Umbetten und Stimulation der Zellen am 6. Tag	25
2.2	ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) zum Nachweis der Ausreifung Dendritischer Zellen anhand der TNF- α -Sekretion (durchgeführt von Regina Teufel und Birgid Scheel, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen	26
2.3	RNA-Extraktion mittels Trizol (Invitrogen) und RNA-Analyse mittels qRT-PCR	27
2.3.1	RNA-Extraktion	27
2.3.2	Extinktionsmessung zur quantitativen Bestimmung der extrahierten RNA	28
2.3.3	Agarose-Gel zur Qualitätskontrolle der RNA	28

2.3.4	Dünndarm-RNA als Vergleich zu den Dendritischen Zellen . . .	29
2.3.5	Reverse Transkription	29
2.3.6	Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (quantitative Realtime-Polymerase-Chain-Reaction, qRT-PCR)	29
2.4	Analyse der Oberflächenrezeptoren mittels FACS	35
2.5	Konfokale Mikroskopie	36
2.5.1	Mikroskopie	37
3	Ergebnisse	38
3.1	Qualität der gewonnenen humanen Dendritischen Zellen	38
3.2	Ergebnisse der mRNA-Analysen mittels qRT-PCR	41
3.2.1	Vergleich der mRNA-Expression von DMT1, Fp1, HFE und Tfr1 zwischen Dendritischen Zellen und dem Dünndarm . . .	41
3.2.2	Veränderung der mRNA-Expression der Proteine DMT1, Fp1, HFE und Tfr1 während der Reifung Dendritischer Zellen . . .	42
3.3	Oberflächenexpression von Tfr1, HFE und MHC-II	46
3.4	Intrazelluläre Lokalisation von Tfr1, HFE, MHC-I und MHC-II . . .	48
4	Diskussion	50
4.1	Diskussion der qRT-PCR Analysen	50
4.1.1	Vergleich der mRNA-Expression von DMT1, Fp1, HFE und Tfr1 zwischen Dendritischen Zellen und dem Dünndarm . . .	50
4.1.2	Veränderung der mRNA-Spiegel der Proteine DMT1, Fp1, HFE und Tfr1 während der Reifung Dendritischer Zellen . . .	51
4.2	Proteinexpression von HFE und Tfr1 im Vergleich zu MHC-II	52
4.3	Aussichten	53
5	Zusammenfassung	55
6	Anhang	57
7	Literaturverzeichnis	62
8	Abkürzungsverzeichnis	74
9	Publikation	76
10	Danksagung	77
11	Lebenslauf	78

1 Einleitung

Vor über 30 Jahren wurden Dendritische Zellen als Teil des Immunsystems identifiziert. Durch ihre essentielle Funktion sind sie heute in der Forschung aktueller denn je, so z.B. als Zielpunkt neuer Behandlungsansätze in der Krebstherapie.

Als Baustein vieler Proteine und als wichtiges Atom für diverse zelluläre Prozesse ist Eisen für Zellen lebenswichtig. In den letzten Jahren wurden im Gebiet des Eisenmetabolismus weitreichende Entdeckungen gemacht. Therapeutische Eingriffe in den Eisenhaushalt werden im Rahmen sowohl neurodegenerativer Erkrankungen als auch chronischer Infektionen diskutiert, wobei der gleichzeitige Einfluss auf gesunde Zellen unklar ist.

Zum Verständnis dieser Arbeit soll sowohl auf das Immunsystem und die besondere Bedeutung der Dendritischen Zellen, als auch auf den momentanen Wissensstand über den Eisenmetabolismus näher eingegangen werden.

1.1 Das Immunsystem des Menschen

Umgeben von Bakterien, Viren und anderen pathogenen Erregern ist das Immunsystem wichtiger Bestandteil für das Überleben des Organismus. Ist einerseits die Bekämpfung bösartiger Krankheitserreger wie z.B. des Pestbakteriums *Yersinia pestis* oder des Erregers der Cholera, *Vibrio Cholerae*, Aufgabe der körpereigenen Abwehr, so unterliegen auch Symbiosen wie z.B. die Besiedlung des Darmtrakts mit einer bunt gemischten Mikroflora einer genauen Regulation. Eine Schwächung des Wirtes, in diesem Falle des Menschen, löst eine ungehemmte Vermehrung der sonst nützlichen Symbionten aus.

Doch nicht nur für die Abwehr pathogener Erreger ist das Immunsystem unabhängig, auch die körpereigenen Zellen bedürfen der ständigen Wachstumskontrolle. So können entartete Zellen mit gestörter Proliferationssteuerung gezielt durch das Immunsystem abgetötet werden, stellen sie doch eine Gefahr für den Gesamtorganismus dar. Bei der Immunschwächekrankheit AIDS (*Acquired-Immune-Deficiency-Syndrome*) findet sich z.B. gehäuft das Auftreten des Kaposi-Sarkoms [20], einer granulomatösen Knotenbildung vor allem an Händen und Füßen. Darüber hinaus

finden sich häufig bei HIV- (*Human-Immunodeficiency-Virus*) Patienten Lymphome. Diese Malignome sind ein Indiz dafür, dass hier die Immunkontrolle geschwächt ist. Die Forschung der letzten Jahrzehnte förderte eine fein regulierte, extrem komplexe Interaktion verschiedener Zellen, Enzyme, Zytokine und anderer Mechanismen zu Tage. An dieser kann man heute noch die phylogenetische Entwicklung ersehen, wobei die Verflechtung der älteren mit den jüngeren Anteilen meist sehr eng ist. Den entwicklungsgeschichtlich ältesten Teil des Immunsystems bildet die sogenannte angeborene Immunität. Hier unterscheidet man zwischen angeborenem mechanischem, humoralem und zellulärem System.

1.1.1 Die angeborene Immunität

Eine mechanische Barriere gegen eindringende Erreger bilden die Körperoberflächen, nach außen die Haut mit ihrer dichten Hornschicht, nach innen die Endothelien. Diese besitzen zusätzlichen Schutz, z.B. das respiratorische Endothel in der Lunge mit seinen Milliarden von Flimmerhaaren, die in eine Richtung schlagend eingedrungene Schadstoffe und Erreger nach außen befördern. Ist diese Koordination gestört, wie z.B. bei der primären ciliären Dyskinesie, einer auf Chromosom 5 vererbten Störung der Zilienfunktion [72], finden sich gehäuft pulmonale Infekte [106]. Sezerierte Sekrete wirken bakterizid, so zum Beispiel das im Speichel und im Darmsekret enthaltene Lysozym [39] [116].

Sind diese Barrieren überwunden, bieten das Komplementsystem, zur humoralen Immunität gehörend, und phagozytierende Zellen, zur zellulären Immunität gehörend, weiteren Schutz.

Das Komplementsystem besteht aus Faktoren, die in der Leber gebildet werden und im Blut zirkulieren. Über den alternativen Weg wird das Komplementsystem direkt durch Bakterien aktiviert, es setzt Entzündungsmediatoren frei, die Komplementfaktoren C3a und C5a, die phagozytierende Zellen anlocken und das lokale Entzündungsgeschehen wie Permeabilitätserhöhung der Gefäßwände und damit erhöhte Durchblutung auslösen. Mittels C3b-Ablagerung auf der Oberfläche markiert es die Bakterien zur Erkennung durch die phagozytierenden Zellen. Desweiteren kann das Komplementsystem die Zellwände der Bakterien mittels eines Lysekomplexes schädigen [37]. Durch die Entzündungsmediatoren werden weitere Entzündungsvorgänge induziert, so z.B. die Ausschüttung Akuter-Phase-Proteine wie C-reaktives Protein oder Serumamyloid-P-Protein [104], welche wiederum den Entzündungsvorgang verstärken.

Über den klassischen Weg wird das Komplementsystem durch Antikörper der Klasse IgG (Ig: Immunglobulin) und IgM aktiviert, ein Beispiel der Verflechtung des älteren

angeborenen mit dem jüngeren adaptiven System.

Makrophagen, Granulozyten, Dendritische Zellen und natürliche Killerzellen bilden Teile der angeborenen zellulären Immunität. Sie erkennen bakterielle Oberflächenantigene, z.B. die bakterielle Glykosidstruktur, und können diese phagozytieren.

Toll-ähnliche Rezeptoren (aus dem Englischen: *toll-like-receptors*, TLR) wurden jüngst auf natürlichen Killerzellen wie auf Dendritischen Zellen beschrieben. Sie binden unterschiedliche Pathogene. TLR4 erkennt z.B. Lipopolysaccharid als Bestandteil der Zellwand gram-negativer Zellen. Andere TLR erkennen virale RNA oder DNA und führen jeweils über eine intrazelluläre Signalkaskade zu unterschiedlichen Zellreaktionen, z.B. zur Ausreifung Dendritischer Zellen [115].

Dies bedeutet, dass auch der angeborene Teil des Immunsystems schon sehr zielgerichtet auf den Organismus bedrohende Pathogene reagiert.

Ausgereifte Dendritische Zellen wiederum sind in der Lage, T-Zellen zu aktivieren (siehe unten), und verbinden somit das angeborene mit dem adaptiven Immunsystem.

Die angeborene Immunität weist, soweit bekannt, keinerlei immunologisches Gedächtnis auf.

1.1.2 Die adaptive Immunität

Die adaptive Immunität zeichnet sich im wesentlichen dadurch aus, dass der Körper zielgerichtet gegen Antigene reagiert und ein immunologisches Gedächtnis aufbaut. Ein Zweitkontakt mit einem Antigen löst eine schnellere und stärkere Immunantwort aus und führt häufig nicht mehr zu Krankheitssymptomen. Beispiele hierfür sind virale Erkrankungen wie Mumps und Masern. Desweiteren kann das adaptive Immunsystem körpereigene geschädigte Zellen erkennen und eliminieren.

Zentrale Bestandteile der adaptiven Immunität sind B- und T-Lymphozyten. Sie treten in Interaktion mit phagozytierenden und für T-Zellen über MHC-Proteine (MHC: *Major-Histocompatibility-Complex*) Antigen-präsentierende Zellen wie Makrophagen und Dendritischen Zellen.

1.1.2.1 B- und T-Lymphozyten

Gebildet aus pluripotenten Stammzellen im Knochenmark reifen B- und T-Lymphozyten an unterschiedlichen Orten aus. B-Lymphozyten reifen im Knochenmark (B - ehemals Bursa fabricii), T-Lymphozytenvorgänger wandern in den Thymus aus.

Die in den Cortex des Thymus eingewanderten T-Lymphozytenvorgänger treten in

eine Phase ausgiebiger Proliferation ein und bilden über Zwischenstufen letztendlich $CD4^+CD8^-$ - oder $CD4^-CD8^+$ -Zellen (CD: *Cluster of Differentiation*), die zusammen den quantitativ größten Anteil der T-Lymphozyten ausmachen. Diese Zellen werden selektiert, MHC-Proteine nicht erkennende oder gegen körpereigene Antigene reagierende Zellen werden zur Apoptose stimuliert, so dass nur etwa 3-5% der reifen T-Zellen den Thymus über das Blut in die peripheren lymphatischen Gewebe verlassen [74].

$CD4^+$ -T-Zellen (T-Helfer-Zellen) erkennen an MHC-II gebundene Antigene und stehen damit in Interaktion mit Antigen-präsentierenden Zellen wie B-Zellen, Makrophagen und Dendritischen Zellen. $CD8^+$ -T-Zellen dagegen erkennen an MHC-I gebundene Antigene und erfüllen so eine wichtige Rolle in der Abtötung virenbefallener oder entarteter Zellen [42].

B-Lymphozyten unterliegen im Knochenmark ebenfalls der Selektion, auf ihrer Oberfläche wird der B-Zell-Rezeptor exprimiert, ein Immunglobulin bestehend aus zwei schweren und zwei leichten Ketten, welcher an die Zelloberfläche fixiert ist. Dabei ist die Variabilität des B-Zellrezeptors durch Genarrangement der Immunglobulinloci mittels V-, J- und D-Elementen extrem hoch, so dass geschätzt 10^{11} verschiedene Antigene durch B-Zellen spezifisch gebunden werden können [73]. Erkennt der B-Lymphozyt keine körpereigenen Antigene und unterliegt damit nicht der negativen Selektion, wandert er ebenfalls in die peripheren lymphatischen Gewebe aus. Die Bindung eines passenden Antigens an den Rezeptor aktiviert den B-Lymphozyten, dieser internalisiert das Antigen, prozessiert es und präsentiert es über MHC-II $CD4^+$ -T-Zellen. Diese Interaktion, vermittelt durch den T-Zell-Rezeptor und andere Rezeptoren wie CD40, führt zur Proliferation und Differenzierung des B-Lymphozyten, der sich entweder zur Plasmazelle differenziert und damit Immunglobuline sezerniert, oder als Gedächtniszelle überdauert [5].

Die produzierten Immunglobuline wiederum lagern sich an das fremde Antigen an, wirken komplementaktivierend (IgG und IgM) und markieren z.B. Bakterien für Makrophagen.

1.1.2.2 Dendritische Zellen

Die Hauptfunktion der Dendritischen Zellen liegt, soweit bis heute bekannt, in der Antigenaufnahme und -präsentation an T-Zellen [62] [13]. Sie gelten als potenteste Antigen-präsentierende Zellen, in der Stärke der T-Zellen-Stimulation noch effektiver als Makrophagen [3]. Damit bilden sie eine der Brücken zwischen angeborener und adaptiver Immunität. Mit B-Zellen interagieren Dendritische Zellen während der Umwandlung zur Plasmazelle [27].

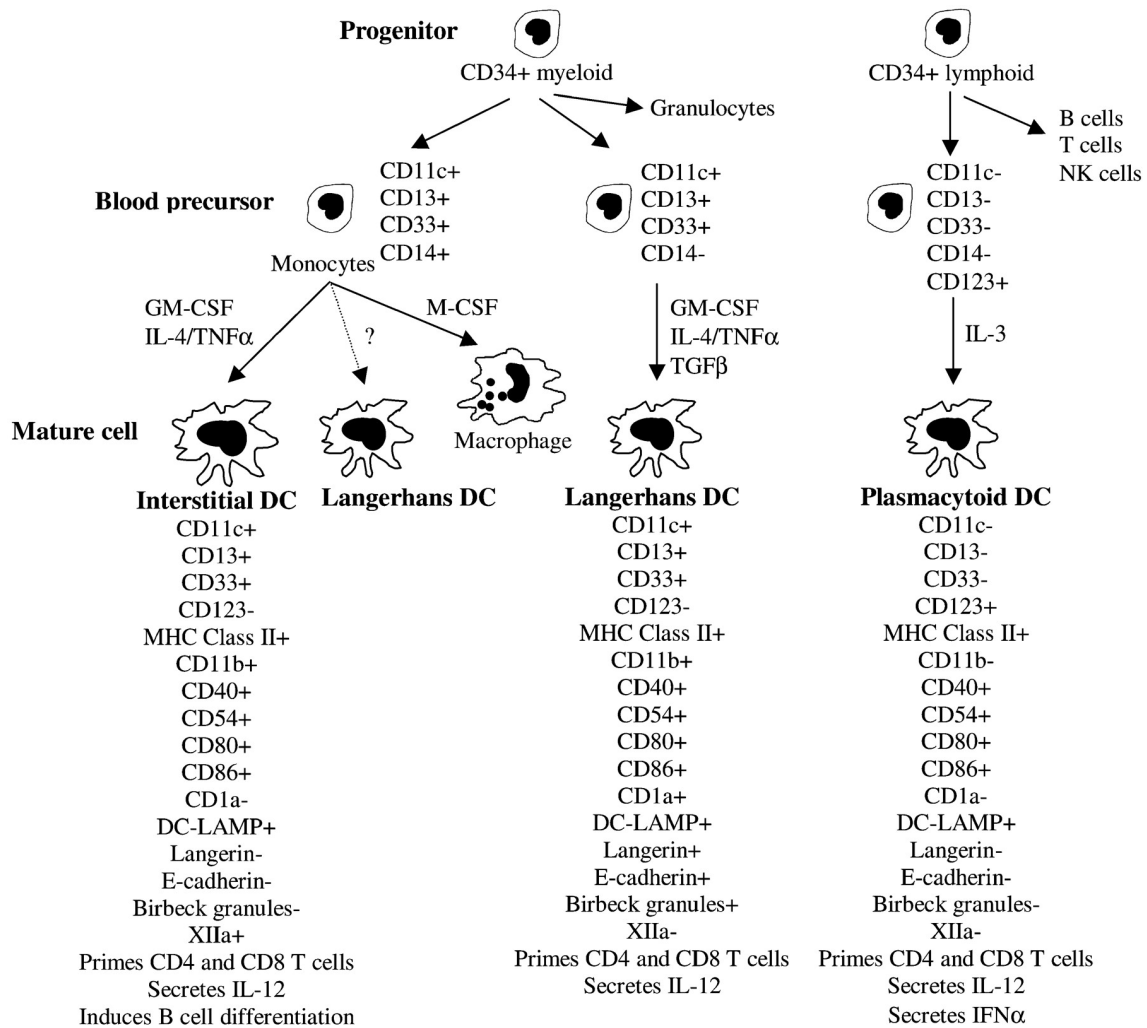


Abbildung 1.1: Übersicht über die Aufteilung Dendritischer Zellen, Quelle: Lipscomb und Masten [61].

Dendritische Zellen wurden das erste Mal Mitte der 70er Jahre von Ralph Steinman beschrieben [101] [102] [100], der sie in der Mäusemilz entdeckte und anhand ihres Phänotyps so benannte. Heute ist bekannt, dass Dendritische Zellen in einer Vielzahl von Geweben vorkommen, so z.B. in der Haut, in Epithelien und im Blut [14] [11] [88]. Im menschlichen Körper wurden inzwischen mehrere Subpopulationen Dendritischer Zellen charakterisiert (siehe dazu Abbildung 1.1). Von CD34⁺-Vorläuferzellen stammen interstitielle Dendritische Zellen (iDZ), im englischsprachigen Raum auch „dermal DCs“ genannt, Langerhanszellen (LHZ) und plasmazytoide Dendritische Zellen (pDZ) ab. Im Gegensatz zu iDZ und LHZ scheinen pDZ ihren Ursprung nicht im Knochenmark zu haben, sondern von einer Vorläuferzelle der lymphatischen Reihe abzustammen. Im Blut exprimieren die iDZ-Vorläuferzellen im Gegensatz zu den LHZ-Vorläuferzellen CD14, in ihrer weiteren Ausreifung sind iDZ CD1a negativ, wogegen LHZ CD1a exprimieren. Ausschließlich auf LHZ sind Lange-

rin, das Adhäsionsmolekül E-Cadherin und Birbeck-Granula nachweisbar. IDZ und LHZ sind in der Lage, T-Zellen zu stimulieren, iDZ besitzen im Gegensatz zu LHZ zusätzlich die Fähigkeit, B-Zellen zur Differenzierung in Plasmazellen zu stimulieren [26].

Plasmazytoide Dendritische Zellen wurden aufgrund ihrer strukturellen Ähnlichkeit mit Plasmazellen so benannt, gefunden werden sie vor allem in T-Zell-Arealen lymphatischer Organe, im Thymus und im Blut [41] [83] [96]. Sie zeichnen sich besonders durch ihre Fähigkeit aus, unter viraler Stimulation große Mengen Interferon zu produzieren [12] [53] [95].

Eine weitere Gruppe stellen die folliculären Dendritischen Zellen dar, welche vor allem in den Keimzentren sekundärer Lymphknoten zu finden sind. Sie stimulieren über sogenannte Ikkosomen, immunkomplexbeladene Körperchen, B-Zellen zur Immunglobulinproduktion [105].

Den Dendritischen Zellen wird eine Art Wächterfunktion zugesprochen, sind sie doch vor allem am Ort potentiell eindringender Erreger nachweisbar.

Anhand ihrer Oberflächenexpression und ihres Migrationsverhaltens werden die Dendritischen Zellen heute als reif oder unreif eingestuft. Die unreife Form liegt z.B. bei den in der Haut vorkommenden Langerhanszellen vor. Kommt eine Langerhanszelle mit einem Antigen in Kontakt, phagozytiert, prozessiert und präsentiert sie dieses. Die Zelle verliert ihre phagozytotische Aktivität [103] und beginnt aus dem peripheren Gewebe in lokale Lymphknoten zu wandern, um dort das Antigen T-Zellen zu präsentieren und diese zu stimulieren.

Dieser als Ausreifung benannte Vorgang ist mit einer Vielzahl immunhistochemischer Vorgänge verbunden, so verstärkt sich die Oberflächenexpression von MHC-II-Proteinen, die das Antigen präsentieren, der Korezeptoren CD80, CD83 und CD86 [82] [123] ebenso wie die Expression von Zytokinrezeptoren, die für die Migration verantwortlich sind [19] [93].

Unreife Dendritische Zellen exprimieren vorwiegend Chemorezeptoren für inflammatorische Chemokine wie CCR1, CCR2, CCR5 und CXCR1 und reagieren auf Chemokine wie MIP-1a (MIP: *Macrophage-Inflammatory-Protein*) und MCP-1 (MCP: *Monocyte-Chemotactic-Protein*) [25] [94] [97] [99] [113]. Während der Reifung vermindert sich der Rezeptorgehalt der inflammatorischen Chemokinrezeptoren, und es werden vermehrt Rezeptoren gebildet, die für die Migration in lymphoide Gewebe verantwortlich sind wie CCR4 und CCR7 [60] [97] [36]. Langerhanszellen zeigen als einzige Population der Dendritischen Zellen die Expression von CCR6 [23] [24] [98]. CCR6 ist ein Chemokinrezeptor für MIP-3a, das sowohl in entzündeten Lymphknoten als auch in den Peyerschen Plaques im Ileum gebildet wird. Damit wandern

Langerhanszellen nicht nur in entzündete Gebiete, sondern sie sammeln sich auch an Orten potentieller pathogener Keime an.

Nach Antigenaufnahme sind Dendritische Zellen in der Lage, prozessiertes Antigen sowohl über MHC-I als auch über MHC-II zu präsentieren.

Im MHC-I-Weg wird über Phagozytose und rezeptorvermittelte Endozytose aufgenommenes Antigen prozessiert. Durch Proteolyse aufgespaltene Antigenfragmente gelangen in das Cytosol und werden dort mittels eines Transporters in das endoplasmatische Retikulum transportiert. Dort erfolgt die Bindung an MHC-I-Moleküle, welche dann zur Zelloberfläche gelangen.

Im MHC-II-Weg wird phagozytiertes Antigen mittels Pinozytose in ein MHC-II-reiches Kompartiment überführt. Nach Kopplung erfolgt hier ebenfalls der Transport an die Zelloberfläche, wo das Antigen zusammen mit den kostimulierenden Proteinen der B7-Familie CD80 und CD86 präsentiert wird [109]. Dadurch sind sie fähig, sowohl CD4⁺- als auch CD8⁺-T-Zellen zu stimulieren.

Nicht nur in der Abwehr pathogener Keime, sondern auch in der Onkologie sind Dendritische Zellen als Teil der Körperabwehr von Bedeutung. Tumorzellen exprimieren Antigene, welche in normalen Zellen nicht vorhanden sind. Diesen Unterschied therapeutisch auszunutzen wäre der ideale Therapieansatz. Als Antigen-präsentierende Zellen können Dendritische Zellen gegen Tumorzellen eine Immunantwort bewirken. Tumorzellen aktivieren Dendritische Zellen jedoch nicht immer, sondern können sie sogar zur Apoptose stimulieren [30]. In der aktuellen Forschung wird versucht, über verschiedenste Methoden eine Immunantwort gegen den Tumor über Dendritische Zellen zu erreichen [42].

Desweiteren werden Dendritische Zellen mit Prionerkrankungen in Verbindung gebracht. So zeigte sich im Mausmodell, dass bei Mäusen, infiziert mit dem Erreger des Gerstmann-Straussler-Scheinker-Syndroms, Dendritische Zellen womöglich als Überträger der Prionen von der Peripherie ins zentrale Nervensystem dienen [89].

1.2 Eisen im Zellstoffwechsel

1.2.1 Die Bedeutung des Eisens

Als wichtiger Bestandteil und Kofaktor vieler Proteine, so zum Beispiel in Eisen-Schwefel-Clustern, ist Eisen in eukaryotischen Zellen in einer Vielzahl von Funktionen unerlässlich.

Eisen-Schwefel-Proteine werden in Mitochondrien gebildet, Rli1p, ein mit Eisen-Schwefel-Clustern assoziiertes Protein, wurde als essentieller Baustein der Ribosomen identifiziert. Dies zeigt die Bedeutung des Eisens in der Proteinsynthese [52]

und darüber hinaus im Zellstoffwechsel und der Zellteilung.

Ebenfalls scheint Eisen als Sensor für oxidativen Stress in den Mitochondrien eine Rolle zu spielen [58].

In den roten Blutkörperchen ist Eisen als Baustein des Hämoglobins essentiell zum Transport von Sauerstoff im Blut.

Die Regulation des Eisenstoffwechsels des Menschen stellt sich immer mehr als äußerst komplex heraus, die genaue Regulation ist weiterhin Schwerpunkt vieler Untersuchungen. Wie fein die Regulation sein muss, zeigen Erkrankungen, die auf einer Eisendysregulation beruhen. Eisenmangel äußert sich beim Menschen schnell als mikrozytäre, hypochrome Anämie sowie in Symptomen wie Mundwinkelrhagaden, Müdigkeit und brüchigen Fingernägeln.

Übermäßige Eisenzufuhr, z.B. im Rahmen von Transfusionen, sowie hämatologische Erkrankungen mit hohem Umsatz von Erythrozyten, wie Formen der Thallasämie, führen zur Eisenüberladung. Schwerwiegende Folgen sind Leberzirrhose und Herzmuskelschädigung.

Defekte einzelner, am Eisenmetabolismus beteiligter Proteine führen zu ausgeprägten Krankheitsbildern, z.B. im Rahmen einer Hämochromatose.

Verschiedene neurodegenerative Erkrankungen wie die Friedreichsche Ataxie, der Morbus Parkinson sowie der Morbus Alzheimer werden mit Störungen des Eisenmetabolismus in Verbindung gebracht [120] [90], [38].

1.2.2 Eisen als infektionsassoziiertes Faktor

Infektionen sind eine häufige Todesursache des Menschen. Durch den weltweiten Einsatz von Antibiotika steigt die Zahl der auftretenden Resistenzen stetig. Die Entwicklung neuer, für den Menschen gut verträglicher Antibiotika ist schwierig und zeitaufwendig. Das Verstehen körpereigener Abwehrmechanismen gegen pathogene Bakterien führt dabei zur Entwicklung neuer Behandlungsstrategien. In den letzten Jahren ist dabei das Verständnis des Eisenhaushaltes in den Fokus des Interesses gerückt.

Eisen wird sowohl von den Wirtszellen als auch von pathogenen Erregern zum Wachstum benötigt. In Tierexperimenten wurde gezeigt, dass frei verfügbares Eisen die Pathogenität verschiedenster Erreger deutlich erhöht [6] [121].

Patienten mit akuter Leukämie weisen häufig erhöhte Eisenwerte und hochgesättigtes Transferrin auf. Sie erkranken häufig an Pilzinfektionen durch *Candida albicans*, wobei gezeigt wurde, dass normales Serum wachstumshemmend wirkt, Serum mit hochgesättigtem Transferrin aber ein Pilzwachstum ermöglicht [9].

Für die Tuberkulose, die häufigste Infektionskrankheit der Welt, wurde in mehreren

Studien der Zusammenhang mit erhöhten Eisenwerten aufgewiesen, eine Therapie mit Chelatoren zur Erniedrigung des freien Plasmaeisens wird diskutiert [17].

Auch für virale Infektionen wurde bereits eine Interaktion mit dem Eisenstoffwechsel gezeigt. Zytomegalievirus kann HFE (s.u.) als MHC-I ähnliches Protein degradieren und damit intrazellulär erhöhte Eisenspiegel erzielen, was wiederum die Virenreplikation beschleunigt [112].

Eisenzug verbessert den Verlauf der chronischen Hepatitis C unter Interferontherapie [22]. In vitro wurde gezeigt, dass sich unter Eisensubstitution das Hepatitis-C-Virus in humanen Hepatozyten deutlich verstärkt repliziert [48].

Der menschliche Körper scheint durch Herabregulation des frei verfügbaren Eisens auch auf Infektionen zu reagieren. So äußern sich chronische Infektionen in erniedrigtem verfügbarem Eisen bei erhöhten Eisenspeichern, die Utilisation des Eisens aus den Makrophagen ist hier verringert, Eisen wird vermehrt in Makrophagen gespeichert [31]. Das Akute-Phase-Protein Hefcidin als Faktor des Eisenmetabolismus ist bei Infektionen erhöht und bewirkt so eine geringere Eisenaufnahme über den Dünndarm (s.u.).

1.2.3 Der Eisenmetabolismus

Ein 70 kg schwerer Mensch besitzt durchschnittlich 4000 mg Eisen. Davon sind etwa 2500 mg im Hämoglobin gebunden, somit sind die Erythrozyten Haupteisenspeicher des menschlichen Körpers. Ungefähr 300 mg finden sich in anderen Proteinen, darunter vor allem im Myoglobin des Muskels. 1000 mg sind in Eisenspeicherproteinen wie Ferritin gespeichert (s.u.).

Die Hämoglobinsynthese benötigt etwa 20 mg Eisen täglich. Pro Tag wird etwa 1 mg Eisen über den Darm aufgenommen, die restlichen 19 mg stammen aus reutilisiertem Hämeisen, welches Makrophagen der Milz aus dem Abbau gealterter Erythrozyten gewinnen [16].

Die Eisenaufnahme des menschlichen Körpers erfolgt vor allem im Duodenum und oberen Jejunum. Über abgeschilferte Epithelzellen sowohl der Haut als auch des Darmes verliert der Körper eine geringe Menge Eisen. Ein spezieller Exkretionsmechanismus ist bisher nicht bekannt. Somit ist die einzige Kontrollmöglichkeit in der gesteuerten Aufnahme des Eisens gegeben, übermäßige Eisenaufnahme kann nicht durch verstärkte Exkretion wieder ausgeglichen werden.

1.2.3.1 Eisenaufnahme im Dünndarm

Im Dünndarm wurden bisher drei Aufnahmemechanismen für Eisen identifiziert (siehe Abbildung 1.2). Bei fleischkonsumierenden Lebewesen ist die Aufnahme von

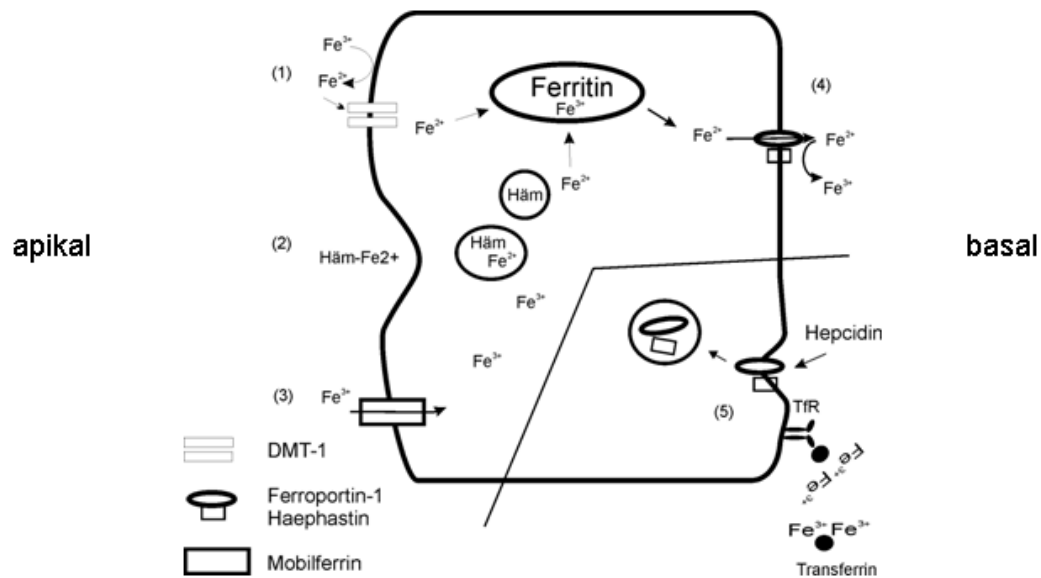


Abbildung 1.2: Eisenaufnahme im Dünndarm: Eisen kann apikal entweder durch eine Cytochrome-b ähnliche Ferrireduktase (Dcytb) in zweiwertige Form reduziert und mittels DMT1 in die Zelle transportiert (1), oder auch per Endozytose als Hämeisen aufgenommen werden (2). Ein dritter Weg der Eisenaufnahme über ein Mobilferrin wurde postuliert. Hier erfolgt die Aufnahme direkt in dreiwertiger Form (3). Basal wird Eisen mittels Ferroportin-1 in zweiwertiger Form aus der Zelle gefördert, das durch Ferroportin-1 reduzierte Eisen wird durch Haephastin reoxidiert (4). Die Steuerung der Eisenaufnahme der Endothelzellen erfolgt entweder durch Tfr1 oder mittels Hepcidin (5) (s.Text).

Hämeisen von großer Bedeutung. Hämeisen, welches hier ungefähr ein Drittel des gesamten Nahrungseisens ausmacht, stellt dabei zwei Drittel der aufgenommenen Eisenmenge [10]. Es wird die Aufnahme durch Endozytose postuliert [77] [122]. Aufgenommenes Hämeisen wird durch eine Hämoxygenase aus dem Komplex gelöst und

so als freies Eisen verfügbar [81].

Nicht hämgebundenes Eisen liegt bei physiologischem pH und unter Sauerstoffatmosphäre vor allem in der oxidierten, dreiwertigen Form vor, welche in Wasser hochunlösliche Komplexe bildet. Die löslichere, reduzierte zweiwertige Form ist dagegen sehr instabil und hat ein hohes oxidatives Potential, welches für die Zellen toxisch ist [29]. Eisen ist im Zellstoffwechsel in zweiwertiger Form fast nur an Proteine gebunden nachgewiesen worden. Das dreiwertige Eisen als Bestandteil der Nahrung wird im Darm durch Reduktasen, z.B. eine Cytochrome-b ähnliche Ferrireduktase (Dcytb), welche an die apikale Membran der Enterozyten gekoppelt ist, zur zweiwertigen Form reduziert [64]. In zweiwertiger Form wird Eisen durch DMT1 (Divalent-Metal-Transporter-1), auch genannt NRamp2 (Natural-resistance-associated-macrophage-protein-2) oder DCT1 (Divalent-Cation-Transporter-1), einen Transporter für zweiwertige Metallkationen, ins Cytoplasma transportiert [44].

Dreiwertiges Eisen kann auch direkt durch die Epithelzellen aufgenommen werden, ein Proteinkomplex, bestehend aus Mobilferrin und einem β -3-Integrin, wurde identifiziert [111]. Auch hier ist DMT1 als Bestandteil vorhanden [110].

1.2.3.2 Eisenspeicherung der Zelle

Die Eisenspeicherung in der Zelle erfolgt vor allem im Protein Ferritin, bestehend aus einer Hülle von 24 leichten (L) und schweren (H) Untereinheiten, die einen Kern von bis zu 4500 Eisenatomen umgeben [46]. Dabei besitzt die H-Untereinheit ein oxidierendes Zentrum, welches die Umwandlung von Fe^{2+} zu Fe^{3+} , als Form der Speicherung, ermöglicht [57].

Über IRPs (Iron-Responsive-Proteins) und IREs (Iron-Responsive-Elements) wird die Transskription der Ferritin-mRNA (mRNA: *messenger Ribonucleic-Acid*, Boten-Ribonukleinsäure) durch die Eisenkonzentration gesteuert [107]. Ferritin weist eine starke Variabilität der Zusammensetzung auf. TNF- α (*Tumor-Necrosis-Factor- α*) und Interleukin-1 als Entzündungsmediatoren induzieren im Gegensatz zu den IRPs nur die Transskription der H-Untereinheit, es werden H-reiche Proteinkomplexe gebildet, d.h. Entzündungsreaktionen wirken gezielt auf die Zusammensetzung des Ferritins [108].

Die Bedeutung der unterschiedlichen Zusammensetzungen des Ferritins ist indes noch nicht verstanden.

1.2.3.3 Eisenexport der Zelle

Ferroportin-1 (Fp1), auch genannt IREG1 (Iron-Regulated-Transporter-1), wurde bisher als einziger Bestandteil des Eisenexportmechanismus identifiziert [65]. Es be-

steht aus 12 Transmembrandomänen und besitzt eine Ferrireduktaseaktivität [63]. Der Eisenexport der Zelle ist verbunden mit einer Oxidation des initial zweiwertigen zu dreiwertigem Eisen. Haephestin oder Caeruloplasmin sollen hier eine Rolle spielen [45] [114].

Für eine Form der Hämochromatose, genannt HFE4-Hämochromatose, ist eine Mutation im Ferroportin-1 Gen gesichert. Die gestörte Proteinfunktion führt hier zur Eisenüberladung [66].

Die Oberflächenexpression von Ferroportin-1 wird durch Heparin gesteuert (s.u.).

1.2.3.4 Transport des Eisens im Blut, die Transferrine

Im Blutplasma liegt Eisen aufgrund seiner zelltoxischen Eigenschaften vorwiegend an Serumtransferrin gebunden vor. Unter die Gruppe der Transferrine fallen mehrere Proteine: Serumtransferrin, Ovotransferrin, Laktoferrin und Melanotransferrin. Die im menschlichen Blut vorkommende Form ist das Serumtransferrin, hier kurz als Transferrin bezeichnet. Transferrin besitzt eine hohe Affinität zu Eisen, was die Umgebung vor der Zelltoxizität des Metalls schützt, aber wiederum spezielle Mechanismen zur Eisenutilisation erfordert. Zwei dreiwertige Eisenatome können durch Transferrin gebunden werden [43]. Über einen komplizierten Mechanismus mittels zweier Segmente wird das Eisen inkorporiert. Bei niedrigem pH ändert sich die Konfiguration des Transferrins, Eisen dissoziiert vom Protein ab, dies geschieht zum Beispiel in Endosomen (s.u.) [1].

1.2.3.5 Eisenaufnahme in der Peripherie, der Transferrinrezeptorzyklus

Auf der Suche nach Rezeptoren für Transferrin wurden bisher 2 Proteine identifiziert: Transferrinrezeptor-1 (TfR1) und -2 (TfR2).

Die Bedeutung des TfR1 ist gut erfasst (siehe dazu Abbildung 1.3). Eisenbeladenes Transferrin bildet mit dem TfR1 einen Komplex, der über „Clathrin-coated-pits“ ins Zellinnere transportiert wird. Durch eine Protonenpumpe wird der pH-Wert des Vesikels erniedrigt, was eine Konformationsänderung des TfR1-Transferrin-Komplexes bewirkt und so zur Dissoziation des dreiwertigen Eisens führt [15]. Eine noch nicht identifizierte Reduktase überführt Eisen in die zweiwertige Form.

In zweiwertiger Form wird Eisen durch DMT1 ins Cytoplasma transportiert [35], wo es mittels endosomalem Transport ins Mitochondrium gelangt [124], dem Ort der Bildung unter anderem der Eisen-Schwefelcluster oder des Hämoglobins. Apo-Transferrin, d.h. unbeladenes Transferrin, und TfR1 werden an die Zelloberfläche zurücktransportiert und so reutilisiert [21].

HFE kann an TfR1 binden und steuert die Aufnahme Transferrins (s.u.).

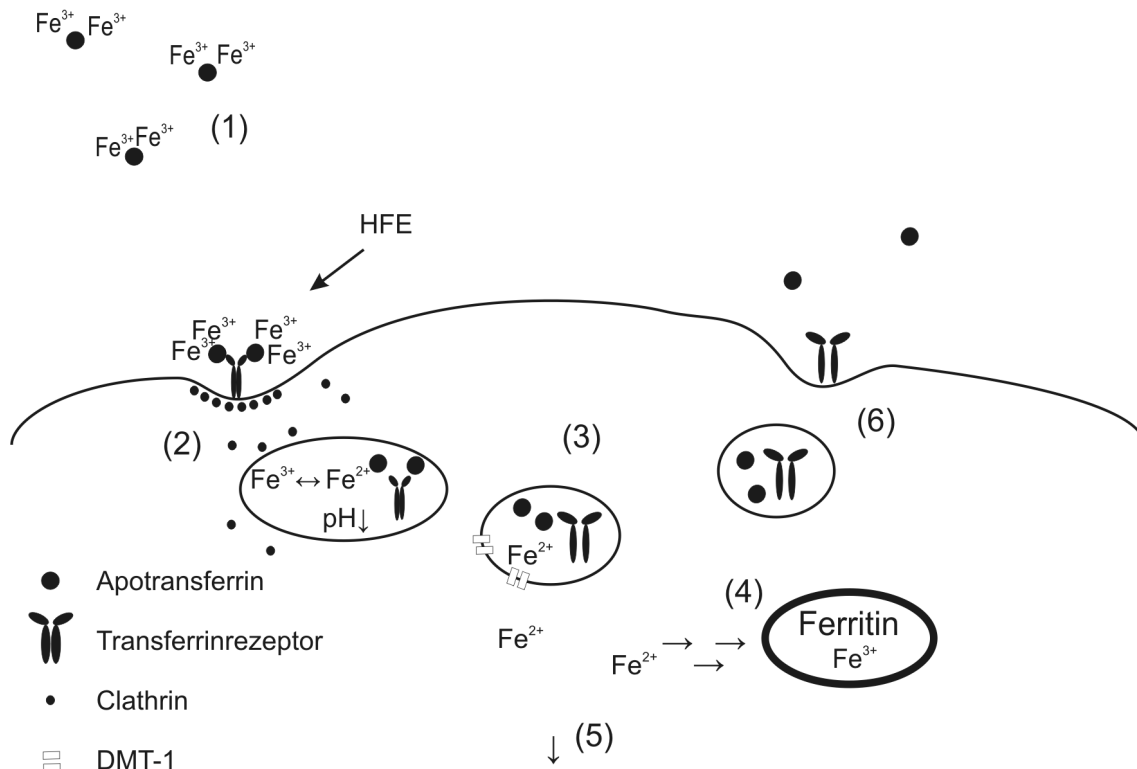


Abbildung 1.3: An Transferrin gebundenes, dreiwertiges Eisen wird unter Steuerung des Proteins HFE mittels TfR1 über „Clathrin-coated-pits“ in die Zelle aufgenommen (1). Unter pH-Erniedrigung dissoziieren die einzelnen Bestandteile, dreiwertiges Eisen wird zur zweiwertigen Form oxidiert (2) und verlässt das Endosom mittels DMT1 (3). Es wird entweder in Ferritin gespeichert (4) oder in der Zelle anderweitig verwandt (5). Apotransferrin und TfR1 werden an die Zelloberfläche zurücktransportiert und reutilisiert (6).

Die Regulation der Expression des TfR1 erfolgt ebenfalls über die zelluläre Eisenkonzentration. Zwei IRPs wurden hier identifiziert. Sie üben eine stabilisierende Wirkung auf die mRNA aus und erhöhen so die Translation des Proteins [47] [75]. Ist der TfR1 ubiquitär und vor allem auf Erythroblasten stark exprimiert, wurde der TfR2 vor allem auf Hepatozyten gefunden [50]. In den erythrozytären Reihen, den Zellen mit dem stärksten Eisenumsatz, konnte TfR2 nicht nachgewiesen werden [7]. Die Bindungsaffinität des TfR2 an Transferrin ist 25 mal geringer als die des TfR1. Ebenso zeigt es keine Interaktion mit HFE [119].

Obwohl die genaue Bedeutung des TfR2 noch nicht geklärt ist, muss auch diesem Protein eine wichtige Rolle im Eisenstoffwechsel zukommen. So weist eine Form der Hämochromatose, genannt HFE3-Hämochromatose, einen Defekt des TfR2 auf [8]. Die Bedeutung von DMT1 als Eisenexporteur aus den Endosomen zeigt sich darin, dass Defekte des Genes sich in einer schweren mikrozytären Anämie manifestieren

[35]. Eisen scheint hier die Endosomen nicht verlassen zu können.

1.2.3.6 HFE und Hämochromatose

Der Aufnahmeweg Transferrins mittels des TfR1 unterliegt der Steuerung HFEs, einem Protein der MHC-I-Gruppe.

HFE bildet mit TfR1 einen Komplex und mindert die Affinität des Rezeptors zum Liganden [33], so dass weniger Eisen in die Zelle aufgenommen wird.

Defekte dieses Proteins wurden als Ursache der hereditären, autosomal rezessiv vererbten Form der Hämochromatose identifiziert. Als Hämochromatose wird eine Eisenüberladung des Körpers bezeichnet, welche vor allem die Hepatozyten der Leber und die Herzmuskelzellen schädigt. So sind 83% der an hereditärer Hämochromatose erkrankten Patienten homozygot für die Mutation Cys260Tyr, einer Veränderung der Basensequenz von Cystein zur Base Tyrosin [32]. Diese Mutation stört die Interaktion von HFE mit β -2-Mikroglobulin, welches für den Transport an die Zelloberfläche unabdingbar ist. HFE kann nicht mehr an der Zelloberfläche nachgewiesen werden [34].

Im Tierexperiment konnte gezeigt werden, dass HFE-Knockoutmäuse deutliche Eisenüberladung entwickeln [125]. HFE als MHC-ähnliches Protein kann auch von T-Zellen erkannt werden [87], inwieweit das Immunsystem auf den Eisenstoffwechsel Einfluss nehmen kann ist indes noch nicht genau geklärt.

1.2.4 Die Regulation der Eisenaufnahme

Die exakte Regulation der Eisenaufnahme des Organismus, bei nicht vorhandenem Exkretionsmechanismus, war lange Streitpunkt und Fokus vieler Untersuchungen. Momentan konkurrieren hier zwei Theorien.

In den Lieberkuhnschen Krypten gebildete Enterozyten wandern entlang der Villi und differenzieren sich dabei zu ausgebildeten Endothelzellen, bevor sie nach 2-3 Tagen in das Darmlumen abgeschilfert werden.

Zum einen geht man davon aus, dass während des engen Kontakts der Kryptzellen zu Kapillargefäßen die Endothelzellen durch den Eisengehalt des Blutes programmiert werden. So soll der Eisengehalt des Blutes in der kurzen Phase des Verweilens der Zellen im Kryptenbereich darüber entscheiden, wie stark die Zelle später Eisen aus dem Darmlumen aufnehmen und an das Blutplasma abgeben wird.

Es wurde gezeigt, dass der Gehalt an TfR1-mRNA in den Kryptzellen am höchsten, an der Villusspitze am niedrigsten ist. TfR1 wird vor allem im Bereich der Basal-

membran der Kapillargefäße gefunden und bietet damit einen Weg, Transferrin in die ausreifenden Endothelzellen aufzunehmen [70] [71]. Zwischen Ereignissen, die einen Eisenverlust mit sich bringen, zum Beispiel einer größeren Blutung, und der gesteigerten Eisenaufnahme im Dünndarm liegt eine messbare Diskrepanz von 2-3 Tagen, dem Zeitraum der Wanderung der Endothelzellen.

Zum anderen sollen Plasmaproteine die Eisenaufnahme des Dünndarms steuern. Hepcidin (*hepatic-bactericidal-protein*) wurde initial als antimikrobielles Peptid im Urin und im Blut identifiziert [55] [76]. Auf der Suche nach überexprimierten Proteinen bei Eisenüberladung wurde Hepcidin gefunden und so mit dem Eisenstoffwechsel in Verbindung gebracht [80].

Inzwischen wurde in mehreren Versuchsansätzen die Rolle Hepcidins als potentieller Eisenregulator unterstützt. So zeigen transgene Mäuse mit Hepcidinüberexpression einen schweren Eisenmangel [69].

Mutationen Hepcidins, welche zur Infunktionalität führen, wurden bei Patienten mit juveniler Hämochromatose nachgewiesen [86].

Bei Patienten mit Leberadenomen und schwerer Anämie wurde eine Überexpression von Hepcidin-mRNA gefunden, nach Entfernung der Adenome normalisierte sich der Eisenmetabolismus [117].

Auch Patienten mit akuten Entzündungen zeigten stark erhöhte Hepcidin-Konzentrationen im Urin [68], eine mögliche Erklärung für die infekassozierte Eisenumverteilung. Durch Interleukin-6 wird die Transkription Hepcidins *in vitro* stimuliert, was die Rolle als Akutes-Phase-Protein unterstützt [67].

Hepcidin führt zur Internalisierung von Fp1 in Vesikeln und damit zur verminderten Konzentration von Fp1 an der Zelloberfläche [67]. Es wird postuliert, dass damit die Eisenkonzentration in den Enterozyten ansteigt und dieses wiederum über IRPs/IREs die Expression anderer beteiligter Proteine reduziert. So wird die Aufnahme Nichthämeisens im Darm reduziert.

1.3 Dendritische Zellen und Eisen

Die immer weitreichenderen Erkenntnisse über den Eisenmetabolismus bieten möglicherweise neue Ansatzpunkte für Therapien.

Eisen ist sowohl für die körpereigenen Zellen als auch für pathogene Keime essentiell (s.o.).

Neurodegenerative Erkrankungen werden mit einer Eisenakkumulation in Verbindung gebracht (s.o.). Metallchelatoren sind im Fokus der aktuellen Arzneimittelforschung

[17] [18] [85].

Auch in der Krebstherapie wird über die Bedeutung des Eisens und die therapeutischen Möglichkeiten diskutiert [84].

Die erkannten Proteine selbst könnten in Zukunft Ziel therapeutischer Intervention sein. So zeigten Kang et al., dass Vitamin C bei Melanomzellen über den Transferrinrezeptor zur Apoptose der Tumorzellen führen kann [49].

Über den Transferrinrezeptorzyklus sollen gezielt Therapeutika in die Zelle geschleust werden [59].

In der Krebstherapie wird über den Einsatz von Antikörpern gegen den Transferrinrezeptor nachgedacht [51].

Eingriffe in den Eisenstoffwechsel bergen aber immer das Potential, auch körpereigene Zellen in ihrem Wachstum und ihrer Funktion zu stören.

Dendritische Zellen als noch recht jung erkannte Zellen gelangen immer mehr in den Fokus medizinischer Forschungen. Als stärkste Antigen-präsentierende Zellen sind sie von großer Bedeutung in der körpereigenen Abwehr. Dies ist Zielpunkt neuer therapeutischer Ansätze, vor allem in der Krebstherapie. In vitro können Dendritische Zellen mit Fremdeiweißen, Fremd-DNA (DNA: *Deoxyribonucleic-Acid*, Desoxyribonukleinsäure) oder Fremd-RNA stimuliert werden und so über T-Zellen zu einer immunologischen Reaktion führen [42] [2].

Es wurde gezeigt, dass Dendritische Zellen wie viele andere Zellen von Eisen abhängig sind. Unter Eisenentzug wiesen die Dendritischen Zellen einen Verlust ihrer immunologischen Eigenschaften auf, phänotypisch waren sie undifferenziert [54].

Grundlagenwissen über den Eisenstoffwechsel ist somit von großer Bedeutung, z.B. um Komplikationen therapeutischer Intervention abschätzen zu können. So beinhaltet eine Eisensuppression möglicherweise auch eine Suppression der körpereigenen Abwehr.

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Es ist das Ziel dieser Dissertation, die Expression der Eisentransportproteine DMT1, Fp1, TfR1 sowie HFE in Dendritischen Zellen zu untersuchen. Neben der generellen Expression gilt besonderes Augenmerk dem Zeitpunkt der Reifung der Dendritischen Zellen, welche mit einer Vielzahl von Veränderungen des Zellstoffwechsels einhergeht.

2 Material und Methodik

2.1 Zellkultur der Dendritischen Zellen

Die direkte Isolierung Dendritischer Zellen aus dem Blut ist aufgrund der geringen Zellzahl sehr aufwendig. Etabliert ist die *in vitro* Erzeugung Dendritischer Zellen aus monozytären Vorstufen.

Isoliert man aus dem Blut monozytäre Zellen und stimuliert sie mit GM-CSF (*Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating-Factor*) und IL-4 (Interleukin-4), zeigen die erhaltenen Zellen die klassischen Merkmale unreifer Dendritischer Zellen. So verlieren die Zellen die Expression von CD14 (CD: *Cluster of Differentiation*) [91], ein Marker für monozytäre Zellen. CD11c wird exprimiert, ebenso wie MHC-I (MHC: *Major-Histocompatibility-Complex*) und MHC-II. CD80 und CD86 als kostimulierende Moleküle, welche zur Stimulation der T-Zellen notwendig sind [56], werden an der Zelloberfläche exprimiert. Nach Stimulation mit LPS (Lipopolysaccharid) produzieren die Zellen TNF- α (*Tumor-Necrosis-Factor- α*) und weisen eine erhöhte Expression von CD80 und CD86 auf.

Inkubiert mit einem Antigen sind die erhaltenen Zellen in der Lage, T-Zellen zu stimulieren [92].

2.1.1 Isolierung von monozytären Zellen aus Buffy-Coats

Buffy-Coats wurden von der Blutspendezentrale der Universitätsklinik Tübingen zur Verfügung gestellt. Aus diesem Gemisch bestehend aus Leukozyten, Thrombozyten und Erythrozyten wurden monozytäre Zellen durch eine Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen.

Dazu wurde der *Buffy-Coat* 1:1 mit DPBS (*Dulbecco's-Phosphate-Buffered-Saline*, eine Phosphat-gepufferte Salzlösung mit physiologischem pH und physiologischer Osmolarität) gemischt. In 50 ml-Falcon-Tubes wurden 25 ml „*Ficoll-Paque Density-Gradiation-Medium*“ gegeben und diese mit 20 ml des DPBS/*Buffy-Coat*-Gemisches unterschichtet. Die nachfolgende 20-minütige Zentrifugation erfolgte bei Raumtemperatur mit 2000 U/min ohne Bremsen.

Die nach der Zentrifugation deutlich im mittleren Drittel sichtbare, weißliche Zell-

schicht wurde isoliert und zwei mal mit DPBS gewaschen. Mit einer Neubauer-Kammer wurden die Zellen gezählt. Das Auszählen in dieser Zählkammer erfolgte über 4 Großquadrate, wobei der gemittelte Wert mit 10^5 multipliziert die Zellzahl pro ml ergibt. Aus einem *Buffy-Coat*, d. h. ca 50 ml, kann man etwa 600 Millionen monozytäre Zellen gewinnen.

Zur weiteren Aufreinigung der Zellen sind bisher mehrere Methoden beschrieben worden. Die hier angewandten Methoden waren zum einen die Selektion monozytärer Zellen durch Adhärenz, zum anderen die Selektion der Zellen anhand ihrer Immunhistochemie.

2.1.1.1 Adhärenzmethode

Jeweils 100 Millionen Zellen, gelöst in 15 ml Zellkulturmedium (RPMI1640-Medium ergänzt mit 10% Hitze-inaktiviertem FCS (*Fetal-Calf-Serum*, PAN), 100 U/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin und 2 mM Glutamin (alle Bio Whittaker)), wurden in Zellkulturflaschen gegeben und diese für eine halbe Stunde bei 37°C und 7,5% CO_2 inkubiert. Die nach dieser Zeit nicht adhärirten Zellen wurden verworfen, die Zellkulturflaschen mit 15 ml Zellkulturmedium aufgefüllt und die Zellen mit GM-CSF und IL-4 stimuliert (s.u.).

2.1.1.2 MACS CD14⁺ Sortierung

Das von Miltenyi Biotecs angebotene System MACS (*Magnetic-Cell-Sorting*) bedient sich des Prinzips der magnetischen Sortierung mittels eisenkomplexierter Antikörper. Diese können gegen jedes beliebige Oberflächenepitop gerichtet sein. Da interstitielle Dendritische Zellen ebenso wie Langerhanszellen von CD14⁺-Vorläuferzellen abstammen, wurden, wie schon durch Pickl beschrieben [79], CD14-Antikörper (Miltenyi Biotecs) zur magnetischen Sortierung benutzt.

10^7 Zellen wurden nach den 2 Waschschritten in 80 μl DPBS, ergänzt um 0,5% BSA (*Bovine-Serum-Albumin*) und 2 mM EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), resuspendiert. Dieser Puffer wurde während der kompletten MACS-Sortierung benutzt (nachfolgend MACS-Medium genannt). Dazu wurden nach Vorgaben der Firma Miltenyi 20 μl CD14-Antikörperreagenz pro 10^7 Zellen gegeben und die Zellen 15-20 Minuten unter gelegentlichem Schwenken bei 4°C inkubiert.

Nach der Inkubation, in welcher die Bindung der MACS-Antikörper an das CD14-Oberflächenepitop erfolgte, wurden die Zellen in einem Überschuss MACS-Medium gewaschen und in 500 μl , in einer Vakuumkammer entgastem MACS-Medium pro 10^8 Zellen resuspendiert.

Die mit 500 μl entgastem MACS-Medium angespülten und in einem starken Ma-

gnetfeld stehenden MACS-Säulen wurden nun mit der Zellsuspension befahren und mit 1,5 ml MACS-Medium nachgespült. Die antikörpermarkierten CD14⁺-Zellen verblieben dabei in der Säule, die negative Fraktion wurde herausgespült und verworfen. Die Elution der CD14⁺-Zellen erfolgte durch Entfernung der MACS-Säulen aus dem Magnetfeld und Spülen unter leichtem Druck mit MACS-Medium. Um eine möglichst hohe Reinheit der Zellen zu erzielen, wurde der Vorgang wiederholt.

Die erhaltenen Zellen waren mikroskopisch in ihrer Größe sehr homogen und neigten zu Zellclusterbildung, erklärbar durch die an der Oberfläche vorhandenen und die Zellen vernetzenden Antikörper.

Die Zellen wurden erneut gezählt, bei 1500 U/min zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Die im Pellet enthaltenen Zellen wurden in einer Dichte von $7,5 \times 10^5$ Zellen pro ml Zellkulturmedium in Zellkulturflaschen bei 37°C und 7,5% CO₂ 6 Tage unter Stimulation mit GM-CSF und IL-4 (s.u.) inkubiert.

2.1.2 Stimulation mit GM-CSF (Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating-Factor) und IL-4 (Interleukin-4)

Die durch die Ficoll-Dichte-Gradienten-Zentrifugation gewonnenen Zellen wurden mit 0,1 µg/ml GM-CSF (Novartis/Leucomax 400) und 0,24 µg/ml IL-4 (RD Systems) inkubiert.

2.1.3 Umbetten und Stimulation der Zellen am 6. Tag

Am sechsten Tag zeigten die Zellen mikroskopisch die typische Morphologie Dendritischer Zellen. Die nicht-adhärenenten Zellen wurden gewonnen, je nach Quantität der adhärenenten Zellen wurde Trypsin-EDTA (Bio Whittaker) genutzt, um die nur leicht adhärenenten Zellen zusätzlich zu lösen.

Nach Zentrifugation wurde der Überstand und damit das alte Zellkulturmedium entfernt und die Zellen in frischem Zellkulturmedium resuspendiert. Die Zellen wurden nun in zwei Fraktionen geteilt, eine Fraktion wurde als Kontrolle in frischem Zellkulturmedium belassen, die andere zusätzlich mit 2 µg/ml LPS (Lipopolysaccharid; *Salmonella Typhimurium*, Sigma) stimuliert. LPS führt als bakterieller Zellwandbestandteil zur Ausreifung der Dendritischen Zellen [28].

Für die Versuche mit dem Konfokalen Mikroskop wurden die Zellen auf runde Deckgläser in 12-Loch-Platten in einer Zelldichte von 2×10^5 Zellen pro ml Medium inkubiert.

Für die FACS- (*Fluorescence-Activated-Cell-Sorting*) und RNA- (*Ribonucleic-Acid*,

Ribonukleinsäure) Analysen wurden die Zellen in 96-Loch-Platten in einer Dichte von 150000 Zellen pro 200 μl Zellkulturmedium inkubiert.

Für die RNA-Analyse wurden am ersten, zweiten und dritten Tag nach der LPS-Stimulation Zellen jeweils der Kontrolle und der stimulierten Fraktion entnommen. Die Untersuchung mit dem Konfokalen Mikroskop fand am zweiten Tag, die FACS-Analyse am dritten Tag nach der Stimulation statt.

2.2 ELISA (Enzyme-Linked-Immunosorbent-Assay) zum Nachweis der Ausreifung Dendritischer Zellen anhand der TNF- α -Sekretion (durchgeführt von Regina Teufel und Birgid Scheel, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen

Um die erfolgte Reifung der Dendritischen Zellen auf den LPS-Stimulus zu dokumentieren, wurde die TNF- α -Sekretion der reifenden Zellen gemessen.

Die Überstände der Zellen wurden vorsichtig abgenommen und jeweils bei -20°C konserviert.

Maxi-Sorb-Platten der Firma Nalge Nunc International (Nalge, Dänemark) wurden über Nacht bei 4°C mit 50 μl Anti-Mensch-TNF- α -Antikörpern (BD Pharmingen) in einer Konzentration von 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in „Coating-Buffer“ (0,02% NaN_3 , 15 mM Na_2CO_3 , 15 mM NaHCO_3 , pH 9,6) inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit 200 μl „Blocking-Buffer“ (PBS-0,05% Tween 20, 1% BSA) 2 Stunden bei 37°C gesättigt und dann mit 100 μl des Zellkulturüberstandes für 5 Stunden bei 37°C inkubiert.

Es wurden 100 μl biotinierte anti-Mensch TNF- α Antikörper (0,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in „Blocking-Buffer“) pro Loch dazugegeben und eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Nach dreimaligem Waschen mit „Washing-Buffer“ wurden 100 μl einer 1/1000 Verdünnung Streptavidin-HRP (BD Pharmingen) pro Loch hinzugefügt.

Nach 30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurden 100 $\mu\text{l}/\text{Loch}$ ABTS (300mg/l 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) in 0,1 M Zitronensäure, pH 4,35) hinzugefügt.

Nach erneuter 15-30 minütiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Extinktion bei OD_{405} in einem *Sunrise-ELISA-Reader* der Firma Tecan (Crailsheim) gemessen und die Konzentration des TNF- α anhand einer Standardkurve bestimmt.

2.3 RNA-Extraktion mittels Trizol (Invitrogen) und RNA-Analyse mittels qRT-PCR

2.3.1 RNA-Extraktion

Für die RNA-Analyse wurden am ersten, zweiten und dritten Tag nach der Stimulation Zellen jeweils der stimulierten Gruppe und der Kontrollgruppe in Trizol eingefroren.

Auch hier wurde das Zellkulturmedium mittels ELISA auf seinen TNF- α -Gehalt analysiert.

Trizol ist ein monophasisches Gemisch aus Phenol und Guanidinisothiozyanat, welches die Zellen und Zellkomponenten zerstört, RNA aber vor Degradation schützt. Als RNA-Träger wurde Glycogen (Roche) verwendet. Dieses erhöht die Ausbeute der RNA bei der Fällung in Isopropanol (s.u.).

Alle folgenden Schritte wurden unter einem für RNA bestimmten und „RNase-freien“ Abzug durchgeführt. RNase ist ein auf allen Körperoberflächen und in Geweben vorkommendes, RNA zerstörendes Enzym. Es wurde besondere Sorgfalt auf RNase-Freiheit gelegt, um Degradation zu vermeiden. Dazu gehört stetes Arbeiten mit Handschuhen und das Verwenden von RNase-freien Materialien.

Zu 100000 Zellen wurden 200 μ l Trizol und 2,5 μ l Glycogen (Roche) gegeben und die Probe in Eppendorfbehälter überführt.

Nach 5 Minuten Inkubation wurden 40 μ l Chloroform dazugegeben, die Eppendorfbehälter wurden 15 Sekunden geschüttelt und 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend erfolgte die Zentrifugation in einer auf 6°C vorgekühlten Zentrifuge bei 13000 U/min für 15 Minuten.

Die obere wässrige, RNA enthaltende Phase wurde in ein neues Eppendorfgefäß überführt, die untere Phase verworfen. Zur weiteren Aufreinigung wurde ein weiterer Waschschrift mit Phenol-Chloroform durchgeführt. Dazu wurden 100 μ l Phenol-Chloroform zur Probe gegeben, die Eppendorfbehälter 2 Minuten geschüttelt und anschließend erneut bei 6°C und 13000 U/min für 10 Minuten zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde entnommen und in ein frisches Eppendorfröhrchen überführt.

Anschließend erfolgte die RNA-Fällung mittels Isopropylalkohol. Zur Probe wurden 100 μ l Isopropanol gegeben, diese geschüttelt und 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte die Zentrifugation bei 13000 U/min und 4°C für 10 Minuten.

Ein Pellet des die RNA-enthaltenden Glycogens war nach diesem Schritt sichtbar,

der Überstand wurde vorsichtig entfernt und zur Probe 200 μl 75% Ethanol gegeben. Nach Schütteln und erneuter Zentrifugation wurde der Überstand vorsichtig entfernt und das Pellet 15-20 Minuten bei Raumtemperatur luftgetrocknet. Die Resuspension erfolgte in 20 μl RNase-freiem Wasser bei 4°C über Nacht.

2.3.2 Extinktionsmessung zur quantitativen Bestimmung der extrahierten RNA

Die Menge der über Nacht inkubierten, resuspendierten RNA wurde am folgenden Tag mittels Extinktionsmessung bestimmt.

Dazu wurde ein *Pharmacia-Biotec-Ultrospec-3000*-Spektrometer verwendet. Das integrierte Programm zur Extinktionsmessung misst die Extinktion der Probe bei 260, 280 und 320nm und errechnet daraus die RNA-Konzentration. Desweiteren wird der Quotient der Extinktionen bei 260 und 280nm angegeben, ein Wert der um 2,0 für RNA liegen sollte.

1 μl der 20 μl wurde in einer Verdünnung von 1:100 für die Extinktionsmessung verwendet.

2.3.3 Agarose-Gel zur Qualitätskontrolle der RNA

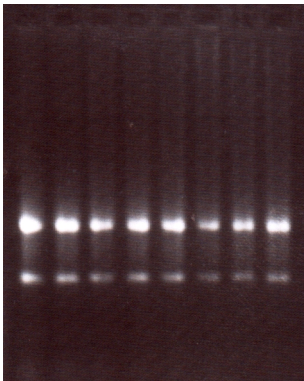


Abbildung 2.1: Agarose-Gel zur Auftrennung der RNA, Anfärbung mittels Ethidiumbromid.

Zur qualitativen Überprüfung auf Degradation wurde die RNA auf ein Agarose-Gel aufgetragen.

Dazu wurde ein 1,2%es Agarose-Gel hergestellt. 0,6 g Agarose wurden in 50 ml 1X-MOPS-Puffer (10X-MOPS: 0,5 M 3-(N-morpholino)-propansulfonsäure und 10 mM EDTA, pH 7,0) unter Aufkochen aufgelöst und auf 65°C abgekühlt.

Unter Zugabe von 1 ml 37%em Formaldehyd wurde das Gel in einer Gelkammer gegossen.

Als Laufpuffer wurden 250 ml 1X-MOPS-Puffer mit 0,74% Formaldehyd verwendet.

Das Gel wurde mit 0,5 μg RNA in 10 μl mit Ethidium Bromid versetztem „1X-RNA-Loading-Buffer“ (Peqlab) beladen und bei 60 V etwa 1 Stunde laufen gelassen.

Unter UV-Licht wurde die Bandenverteilung überprüft. Bei guter RNA-Qualität sind deutlich zwei klare Banden sichtbar, bei denen es sich um ribosomale 18S- und

28S-RNA handelt (siehe Abbildung 2.1).

Proben ohne Bandenbildung wurden verworfen.

2.3.4 Dünndarm-RNA als Vergleich zu den Dendritischen Zellen

Dünndarm-RNA wurde von Clontech bezogen. In der Produktbeschreibung wird die RNA als Extrakt aus normalen, gesamten Dünndärmen von 5 kaukasischen Patienten (Alter zwischen 20 und 61 Jahren) beschrieben, welche eines natürlichen Todes gestorben sind.

2.3.5 Reverse Transkription

Um die RNA der PCR zugänglich zu machen, muss die RNA in cDNA (*complementary Deoxyribonucleic-Acid*) revers transkribiert werden. Dazu wurde von Promega bezogene MMLRV (*Moloney-Murine-Leukemia Reverse-Transcriptase*), eine virale reverse Transkriptase, benutzt.

2 μg RNA (photometrisch bestimmt) wurden in in dem mitgelieferten Puffer (50 mM Tris-HCl (pH 8,3 bei 25°C), 75 mM KCl, 3 mM MgCl_2 und 10 mM DTT) verdünnt und „*Random-Hexamer-Primers*“ in einer Konzentration von 0,025 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ dazugegeben.

Die Proben wurden für 5 Minuten auf 65°C erhitzt, um die RNA zu entfalten, so dass bestmögliche Amplifikationsbedingungen gewährleistet waren. Danach erfolgte die Zugabe von Nukleinsäuren in einer Konzentration von jeweils 1mM.

Als RNAsen-Inhibitor wurde RNAsin (Promega) (1 unit/ μl) benutzt. Nach Zugabe des Enzyms (10 units/ μl) wurde die RNA 1 Stunde bei 37°C inkubiert.

Mit der von Clontech bezogenen Dünndarm-RNA wurde ebenso verfahren.

Negativkontrollen wurde anstatt der reversen Transkriptase Wasser zugesetzt, um die eventuelle Kontamination mit DNA abzuschätzen.

2.3.6 Quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion (quantitative Realtime-Polymerase-Chain-Reaction, qRT-PCR)

2.3.6.1 Einführung

Zur qualitativen und quantitativen Analyse von DNA-Proben wurde die Polymerase-Ketten-Reaktion (engl. *Polymerase-Chain-Reaction*, PCR) von Kary Mullis eingeführt.

Im Prinzip werden dabei durch spezifische Primer erkannte DNA-Sequenzen durch

eine hitzestabile DNA-Polymerase (sogenannte taq-Polymerase, taq: *Thermophilus aquaticus*) vervielfältigt. Die hier verwendeten Primer für die Gensequenzen zeigt Tabelle 2.1. Die Primer für TfR1 und HFE wurden anhand der NCBI-Gendatenbank

DMT1 <i>forward</i>	5'-GTG GTC AGC GTG GCT TAT CTG-3'
DMT1 <i>reverse</i>	5'-GAT GCT TAC CGT ATG CCA CAG-3'
Fp1 <i>forward</i>	5'-TGA CCA GGG CGG GAG A-3'
Fp1 <i>reverse</i>	5'-AGA GGT CAG GTA GTC GGC CA-3'
HFE <i>forward</i>	5'-ACC ACA GCA AGG AGT CCC AC-3'
HFE <i>reverse</i>	5'-AGC CCT CGG TAC TGT TGT CTT-3'
TfR1 <i>forward</i>	5'-GCA GAA GCA TTA TCT TTG CCA GT-3'
TfR1 <i>reverse</i>	5'-CAG GGA CGA AAG GTA TCC CTC-3'

Tabelle 2.1: Primersequenzen

mit Hilfe der Software Primer-Express erstellt, Fp1 und DMT1 wurden bereits von Zoller et al [126] beschrieben. 18S-Primer wurden von der Firma MWG Biotech AG erworben, die restlichen Primer wurden von der Firma Thermo Hybaid bezogen. Die aus der reversen Transkription gewonnene cDNA wird während der PCR zyklisch dupliziert nach der Formel:

$$X_n = X_0 \cdot (1 + E_x)^n$$

wobei X_0 = Ausgangszahl des DNA-Transkriptes

E_x = Amplifikationseffizienz der Sequenz X

Im Idealfall ist die Amplifikationseffizienz dabei 1, damit würde sich die Anzahl der Moleküle jeden Zyklus verdoppeln. In der Praxis werden allerdings meist Werte < 1 erreicht.

Zu Beginn der PCR werden die Proben für 10 Minuten auf 95°C erhitzt, um alle DNA-Doppelstränge zu denaturieren und somit für die Duplizierung verfügbar zu machen. Ein Zyklus besteht intermittierend aus einer 1-minütigen Phase bei 65°C , in der die DNA-Polymerase die Partnerstränge synthetisiert, und einer 15-sekündigen Phase bei 95°C zur erneuten Denaturierung. Insgesamt wurden jeweils 40 Zyklen programmiert.

Die Entwicklung der quantitativen Echtzeit-PCR hat das Analysieren von DNA- und cDNA-Proben in einer neuen Genauigkeit möglich gemacht. Entscheidend für die quantitative Analyse ist für die qRT-PCR nicht mehr die Summe des entstehenden Produkts wie zum Beispiel bei einer klassischen PCR, sondern das Überschreiten

der Produktkonzentration eines definierten Schwellenwertes nach einer bestimmten Anzahl von PCR-Zyklen (sogenannter *Threshold-Cycle*, C_T).

Vorteilhaft ist dabei die Möglichkeit, den Reaktionsverlauf über die Zeit detailliert zu beobachten. Desweiteren verringern sich die Unsicherheiten durch Faktoren, welche die Endkonzentration des Produkts beeinflussen und somit die Analyse verfälschen könnten, wie zum Beispiel nicht ausreichende Konzentrationen der an der Reaktion beteiligten Reagenzien, Wechselwirkungen des Produktes mit der Reaktion usw.

Bei der qRT-PCR benutzt man entweder sequenzspezifische Sonden oder einen Fluoreszenzfarbstoff, der die Eigenschaft hat, sich in doppelsträngige DNA einzulagern, und dessen Fluoreszenz sich dabei messbar erhöht. Dieser wird dann mit einem Laser zum Fluoreszieren angeregt. Erreicht die Fluoreszenz einen definierten Schwellenwert, wird dies mittels eines Sensors detektiert. Dieser Schwellenwert wird dabei umso eher erreicht, je mehr Kopien eines Gens ursprünglich vorhanden waren.

Der hier verwendete Fluoreszenzfarbstoff ist SYBR-Green. SYBR-Green lagert sich frequenzunspezifisch zwischen die cDNA-Stränge ein. Bei diesen frequenzunspezifischen Sonden muss jedoch besonders darauf geachtet werden, dass tatsächlich nur ein Produkt der erwarteten Schmelztemperatur nachzuweisen ist, da Nebenprodukte wie DNA-Stränge, entstanden durch Primer-Dimere, ebenso Fluoreszenz erzeugen und somit das Ergebnis verfälschen könnten. Deshalb wurde am Ende der PCR eine Schmelzpunktkurve erstellt, in der nur ein Produkt nachweisbar sein darf. Proben mit mehreren Schmelzpunkten wurden verworfen.

Anhand der erwarteten Länge des Produkts kann dessen Schmelztemperatur abgeschätzt und mit der gemessenen Schmelztemperatur verglichen werden. Der Vorteil SYBR-Greens ist, dass er für die Detektion beliebiger DNA-Produkte einsetzbar ist.

Anhand der Abbildung 2.2 soll hier ein typischer Verlauf einer qRT-PCR erklärt werden.

In den ersten Zyklen der qRT-PCR liegt die Fluoreszenz unterhalb des gesetzten Detektionsminimums (Schwellenwert), eine gewisse messbare Grundfluoreszenz bildet die sogenannte Nulllinie. In diesem Beispiel wird die Schwelle am Punkt C_T überschritten. Im ansteigenden Teil der Kurve befindet sich das Produkt in einer exponentiellen Vervielfältigungsphase, hier sind alle Reagenzien im Überschuss vorhanden. Flacht die Kurve ab, ist z.B. ein Reagens nicht mehr genügend vorhanden, die Vervielfältigung stagniert. Gerade hier kommt die Überlegenheit der qRT-PCR zum Tragen, da die Faktoren, welche die Endpunktbestimmung einer normalen PCR beeinflussen können, minimiert werden (ΔF : Normale Messung der Konzentrations-

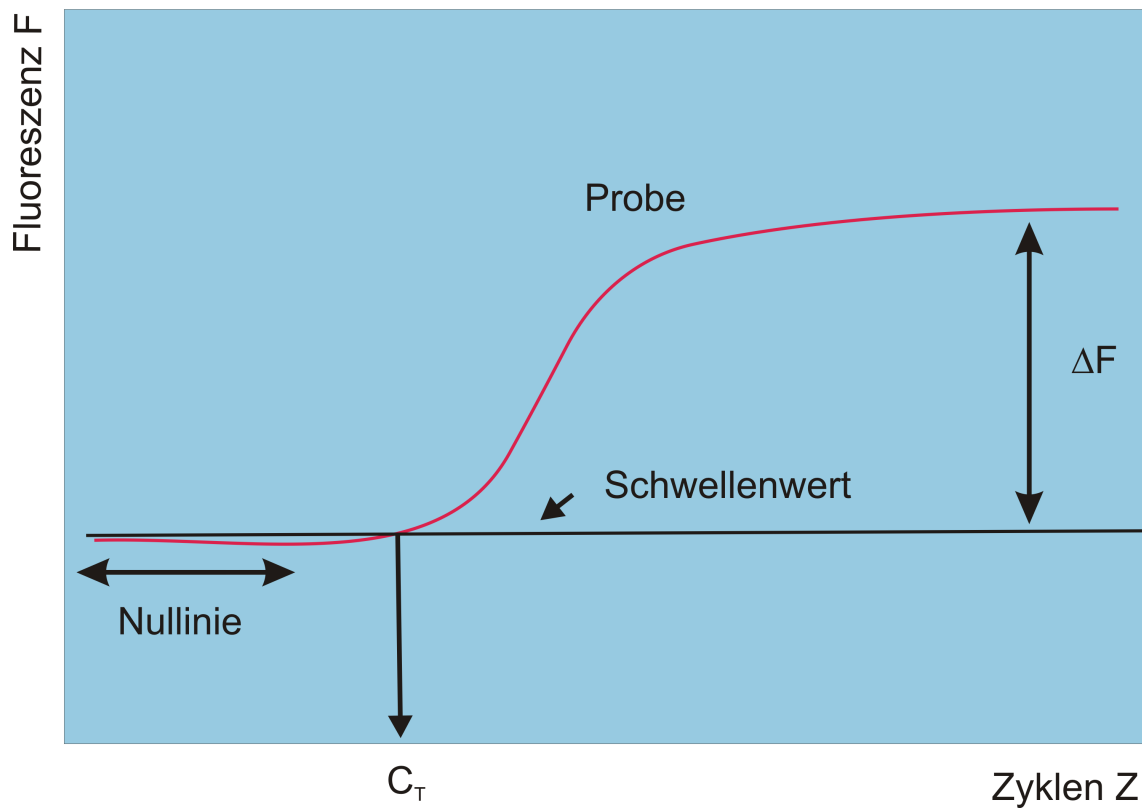


Abbildung 2.2: Skizze einer qRT-PCR Kurve, X-Achse: Zyklen der PCR, C_T Zyklus bei Überschreitung des Schwellenwertes, Y-Achse: Fluoreszenz, ΔF : Messung mit klassischer PCR, rote Kurve: Beispielkurve, weitere Erklärung siehe Text.

differenz in einer klassischen PCR).

Für die Analyse der erhaltenen Ergebnisse werden vor allem zwei Methoden eingesetzt, die Standardkurvenmethode und die vergleichende C_T -Methode.

2.3.6.2 Standardkurvenmethode

Besitzt man Kopien des zu untersuchenden Gens in einer bekannten Konzentration, kann man diese in einer Verdünnungsreihe als Kalibrator zur absoluten Quantifizierung benutzen. Die C_T -Werte der Probe müssen dabei nur im Bereich der Kalibratorkurve liegen.

2.3.6.3 Vergleichende C_T -Methode

Da häufig eine Synthese des fraglichen Gens für die Standardkurvenmethode schwierig und zeitaufwendig ist, bietet sich die vergleichende C_T -Methode als einfachere relative Quantifizierung an. Dabei wird nicht der absolute Gehalt an cDNA bestimmt, sondern es werden verschiedene Proben auf ihren cDNA-Gehalt der gesuchten Sequenz verglichen. Man erhält somit nur eine relative Quantifizierung, die für viele Fragestellungen aber durchaus ausreichend sein kann.

Betrachtet wurden in dieser Arbeit die relative Konzentrationsvermehrung oder -verminderung verschiedener cDNA-Sequenzen stimulierter Dendritischer Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle. Eine Probe wird dabei als 1 definiert. Andere Proben werden dann als Vielfaches dargestellt.

Dabei müssen allerdings besondere Faktoren beachtet werden.

Da in den Ausgangsproben trotz aller vorangegangenen Quantifizierungen durchaus Schwankungen im Gesamtgehalt der untersuchten DNA bestehen, bedingt zum einen durch eine unterschiedliche Ausgangszellzahl oder zum Beispiel durch Schwankungen in der Transkriptionseffizienz, muss hier normalisiert werden.

Als Kalibrator verwendet man in der Echtzeit-PCR ein sogenanntes Kalibratorgen, welches in möglichst jedem Gewebe und in jeder Zelle gleich stark exprimiert sein sollte. Diese natürlich schwer einzuhaltende Bedingung erfüllen am ehesten die ribosomalen RNAs wie zum Beispiel die 18S-RNA. In der Literatur findet sich ebenfalls Verwendung von Beta-Actin-RNA oder Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase-RNA, 18S-RNA ist jedoch betreffend der stabilen Expression den anderen als Kalibrator überlegen [40].

Die ermittelten C_T -Werte der Proben werden dann auf das Kalibratorgen, in diesem Falle 18S-cDNA, kalibriert, in dem der C_T -Wert der 18S-cDNA vom C_T -Wert der Probe, was einer Division der ermittelten cDNA-Mengen entspricht, abgezogen wird. Damit wird der Gehalt der zu untersuchenden cDNA immer in Relation

zum Gesamt-DNA-Gehalt der Probe gesetzt. So können Schwankungen des DNA-Gehaltes neutralisiert werden.

Ebenso wichtig bei der vergleichenden C_T -Methode ist die Unabhängigkeit der Amplifikationseffizienz von der Konzentration der zu analysierenden cDNA. Sonst könnten Schwankungen des Gesamt-DNA-Gehaltes der Probe Auswirkungen auf die Quantifizierung haben.

Um dieses auszuschließen ist in einem separaten Experiment die Erstellung einer Verdünnungsreihe einer Probe mit der zu untersuchenden DNA erforderlich. Dabei werden sowohl das Kalibratorgen als auch die Zielsequenz mittels qRT-PCR in den verschiedenen Verdünnungsstufen quantifiziert.

Trägt man nun die Differenz der zu untersuchenden cDNA zum Kalibratorgen (ΔC_T) gegen den Logarithmus der Verdünnungsstufen auf, so sollte sich eine Gerade durch die Messpunkte ergeben mit einer Steigung 0. Dies würde bedeuten, dass die Amplifikationseffizienzen der Primer sowohl des Kalibrators als auch der Zielgene auch bei unterschiedlichen Konzentrationen gleichbleiben. Dies ist jedoch nur im Idealfall erfüllt. Ist die Steigung nicht 0, so liegt eine Veränderung der Amplifikationseffizienz in Abhängigkeit der Verdünnung vor, die das Ergebnis beeinflusst.

Positive Steigungen bedeuten, dass die Amplifikationseffizienz des zu untersuchenden Gens im Vergleich zum Kalibratorgen bei zunehmender Verdünnung abnimmt, die Konzentration des zu untersuchenden Gens wird so bei stärker verdünnten Proben unterschätzt.

Negative Steigungen führen zu einer Überschätzung der Konzentration der stärker verdünnten Proben.

Liegt die Steigung unter $\pm 0,1$, ist ein Fehler bei einer zehnfachen Verdünnung, das bedeutet einen Unterschied des Überschreitens des Schwellenwertes von $\frac{1}{\log(2)} = 3,32$ Zyklen, unter 1% zu erwarten. Dies ist nach den üblichen Auswertungsmethoden der qRT-PCR vernachlässigbar. DMT1 mit einer Steigung von $+0,068$ und HFE mit einer Steigung von $+0,05$ erfüllten die Bedingungen mit Steigungen unter $0,1$, TfR1 lag mit einer Steigung von $+0,203$ leicht darüber. Dies bedeutet einen geschätzten Fehler des ΔC_T -Werts von 2%. Fp1 mit einem Steigungskoeffizienten von $+0,6975$ bringt hier einen Fehler von 7% ein. Dieser wurde bei der Auswertung anhand der Standardkurven interpoliert.

2.3.6.4 Versuchsansatz

Für die Experimente dieser Arbeit wurde *SYBR-green PCR-Master-Mix* verwendet. Die Primer für DMT1, Fp1, HFE und TfR1 wurden jeweils in einer Konzentration

von 0,3 μM für *Reverse-* und *Forward-Primer*, der 18S *Forward-Primer* in einer Konzentration von 0,3 μM , der *Reverse-Primer* von 0,05 μM eingesetzt. Die aus der reversen Transkription gewonnene cDNA wurde 1:400 verdünnt. Der Reaktionsansatz bestand aus 20 μl , die Proben wurden für jeden Primer doppelt bestimmt, Negativkontrollen zum Abschätzen der Kontamination mit Fremd-DNA einfach. Ebenso wurde mit der erworbenen Dünndarm-RNA (Clontech) verfahren.

Alle Analysen fanden auf einem Taqman-7000-System statt.

2.3.6.5 Statistische Auswertung

Generell erfolgte die Berechnung der Fehlerfortpflanzung nach Gauss, der mit der Verdünnung der Proben durch die veränderte Amplifikationseffizienz einhergehende Fehler der Primer Tfr1 und Fp1 wurde in der Auswertung mittels der erstellten Standardkurven interpoliert.

2.4 Analyse der Oberflächenrezeptoren mittels FACS

Um die erfolgreiche Ausreifung der Dendritischen Zellen zu dokumentieren und die Oberflächenexpression von Tfr1, HFE und MHC-II zu untersuchen, wurden am dritten Tag nach der Stimulation der Zellen mit LPS die Zellen mit einem FACS-Gerät (*Fluorescence-Activated-Cell-Sorter*) untersucht.

Ein FACS-Gerät separiert in einer Probe die einzelnen Zellen und kann mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern beladene Zellen detektieren. Analytisch werden die Zellen anhand ihrer Granularität (SSC: *Side-Scatter*) und Größe (FSC: *Forward-Scatter*) aufgetrennt. Darüberhinaus können die fluoreszenzmarkierten Antikörper mit den ihnen typischen Wellenlängen detektiert werden.

Ein typischer Marker für Dendritische Zellen ist CD11c, Marker für die Ausreifung Dendritischer Zellen ist die vermehrte Expression der kostimulierenden Proteine CD80 und CD86, welche zusammen mit MHC-II an der Oberfläche präsentiert werden (siehe dazu Einleitung).

Die für die FACS-Analyse in 96-Loch-Platten inkubierten Zellen wurden mit dem Gerät FACSCalibur analysiert.

Nach Entfernen des Zellkulturmediums und Spülen mit DPBS wurden die Zellen resuspendiert und mit den Antikörpern inkubiert. Die Inkubation der direkt markierten Antikörper CD11c-PE, CD80-PE und CD86-PE (PE: Phycoerythrin) (BD Pharmingen; 2 μl für 100.000 Zellen, in DPBS) erfolgte jeweils eine halbe Stunde auf Eis, die Zellen wurden danach 2 mal gespült und anschließend in 1% Formaldehyd fixiert.

Mit den CD71 (TfR1), 2F5 (anti-HFE) und MHC-II (TU39) Antikörpern inkubierten Zellen wurde wie oben verfahren (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in DPBS), anstatt der Fixierung in Formaldehyd wurden die Zellen eine halbe Stunde in PBS/10% FCS auf Eis inkubiert, anschließend erneut zwei mal gespült und danach mit dem Sekundärantikörper inkubiert. Als Sekundärantikörper wurde ein Ziege-anti-Maus-FITC-Antikörper verwendet (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ in DPBS). Nach erneutem doppelten Spülen wurden die Zellen ebenfalls in 1% Formaldehyd fixiert.

Zum Ausschluss unspezifischer Bindung wurden immer spezifische Isotypkontrollen integriert.

Zur Bestimmung der Grundfluoreszenz wurden unmarkierte Zellen verwendet.

2.5 Konfokale Mikroskopie

Die konfokale Mikroskopie bietet die Möglichkeit, durch schichtweise Bildgebung Geschehnisse sowohl an der Oberfläche als auch im Innern der Zelle zu beobachten. Mittels fluoreszenzfarbstoffmarkierter Antikörper können Epitope auf der Zelloberfläche sowie in anderen Kompartimenten, z.B. im Zytosol oder in Vesikeln, sichtbar gemacht werden.

Dafür geeignete Antikörper sind zum Beispiel an Fluoreszenzfarbstoffe wie FITC (*Fluorescein-isothiocyanate*) oder Alexa gekoppelt. Prinzipiell unterscheidet man zwei Methoden: Entweder ist der Erstantikörper, der gegen das Epitop von Interesse gerichtet ist, direkt an den Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt, oder es wird ein fluoreszenzmarkierter Zweitantikörper benutzt, der mit dem Erstantikörper reagiert. Dieser richtet sich dann typischerweise gegen die Spezies und den Isotyp des Erstantikörpers. Die zweite Methode fand in dieser Arbeit Anwendung.

Die hier verwendeten Erstantikörper waren alle aus Mäusen gewonnene IgG-Antikörper, die gegen menschliche Epitope gerichtet waren. Als Zweitantikörper wurde ein aus Ziegen gewonnener Antikörper genutzt, der gegen murine Epitope gerichtet war. Um eine unspezifische Bindung des Erst- und Zweitantikörpers auszuschließen, wurden Kontrollen in das Experiment implementiert. So diente der Zweitantikörper alleine als Kontrolle für seine unspezifische Bindungsfähigkeit. Zur Kontrolle der unspezifischen Bindungsfähigkeit der Erstantikörper dienten Antikörper desselben Isotyps, welche gegen auf humanen Zellen nicht vorkommende Epitope gerichtet waren. Zu diesen wurde ebenfalls der Zweitantikörper gegeben.

Zur Überprüfung der Ausreifung der stimulierten Dendritischen Zellen wurde das alte Medium isoliert und mittels ELISA auf seinen Gehalt an TNF- α überprüft (s.o.). Die auf den Deckgläschen in 12-Loch-Platten adhärenen Zellen wurden in 1%er

Formaldehydlösung 20 Minuten bei Raumtemperatur fixiert. Anschließend wurden die Deckgläschen 3 Mal mit 50 mM Glyzin/PBS-Puffer gewaschen, um überschüssiges Formaldehyd zu binden. Jeder Waschschrift beinhaltet eine 5 minütige Inkubation.

Auf die Deckgläschen wurde zur Permeabilisation der Zellen 200 μ l 0,3% Triton-DPBS gegeben. Die Permeabilisation ermöglicht die Penetration der Antikörper ins Zellinnere, so dass auch die dortigen Epitope erkannt werden können. Nach 2 Minuten Inkubation wurde TBS (*Tris-buffered-saline*, 10 mM TrisCl/PBS, pH 7,6) im Überschuss dazugegeben und die Zellen drei mal mit TBS gewaschen.

Darauf folgte eine einstündige Inkubation mit 1%em BSA zum Block unspezifischer Bindungsstellen.

Die mit DPBS gespülten Zellen wurden nun mit den Antikörpern inkubiert. Die Inkubation sowohl der Erst- als auch der Zweitantikörper erfolgte jeweils eine Stunde bei Raumtemperatur, dazwischen wurden die Zellen mit DPBS gewaschen.

Als Erstantikörper wurden folgende Antikörper eingesetzt:

- W6/32 (Anti-MHC-I, Maus, Isotyp: IgG2a, Tübingen)
- Tü39 (Anti-MHC-II, Maus, Isotypen: IgG2a + IgG2b, Tübingen)
- CD71 (Anti-Transferrinrezeptor, Maus, Isotyp: IgG1, BD Pharmingen)
- 2F5 (Anti-HFE, Maus, Isotyp: IgG1, Rachel Ehrlich, Israel)
- IgG1, IgG2a, IgG2b Isotypkontrollen, Maus, BD Pharmingen

Als Zweitantikörper wurde benutzt

- Ziege-anti-Maus Alexa 546 (Molecular Probes)

Die Erstantikörper wurden in einer Konzentration von 5 μ g/ml eingesetzt, der Zweitantikörper in einer Konzentration von 1,25 μ g/ml.

Nach der Antikörperinkubation wurden die Deckgläschen mit DBPS gewaschen und invers auf Objektträger aufgetragen. Zum Schutz der Fluoreszenz wurde *VectaShield-Mounting-Medium* (Vector Laboratories) verwendet.

2.5.1 Mikroskopie

Verwendet wurde ein Zeiss-LSM510-Mikroskop. Die Fluoreszenzfarbstoffe wurden mit den für sie typischen Frequenzen angeregt. Die Negativkontrollen wurden zuerst betrachtet und die Laserstärke so eingestellt, dass gerade keine Fluoreszenz mehr sichtbar war. Mit diesen Einstellungen erfolgte die Untersuchung der Positivobjekte.

3 Ergebnisse

3.1 Qualität der gewonnenen humanen Dendritischen Zellen

Die Präparation durch die Adhärenzmethodete brachte nur einen Anteil von 30 bis 40% Dendritischer Zellen im FACS. Viele andere Zellen wie Lymphozyten und Erythrozyten kontaminierten hier die Probe. Da jedoch in die RNA-Analyse durch die Methodik die gesamte RNA aller Zellen eingeht, ist die Reinheit der Zellen hier besonders wichtig. Sonst haben die anderen Zellen als Hintergrund einen großen Einfluss auf das Analyseergebnis.

Um den Hintergrund zu minimieren, bietet die Methode der CD14⁺-Sortierung eine Möglichkeit, hochreine Kulturen Dendritischer Zellen herzustellen. Reinheiten über 90% können hiermit erzielt werden. Die Selektion der Zellen mit Antikörpern stellt zwar einen invasiven Eingriff in die Zellkultur dar und könnte so Einfluss auf die Dendritischen Zellen haben, dies wurde jedoch im FACS nicht beobachtet. Die Methode gilt als etablierte Methode zur Gewinnung Dendritischer Zellen in vitro.

Abbildung 3.1 zeigt die Unterschiede der jeweiligen Präparationsmethoden. Im FACS werden die Zellen auf ihre Granularität (SSC) und Zellgröße (FSC) analysiert und in einem Punktediagramm aufgeteilt dargestellt. Homogene Gruppen erscheinen so als Punktwolke, die Prozentzahlen geben den Anteil der selektierten Zellen im Rahmen der Gesamtanzahl der detektierten Zellen wieder.

Mithilfe der MACS-CD14⁺-Sortierung konnten so sehr reine Kulturen Dendritischer Zellen gewonnen werden. Nach einer Woche Inkubation mit GM-CSF und IL-4 zeigten sich unter dem Mikroskop phänotypisch homogene Zellen mit der typischen dendritischen Struktur.

Auffallend war jedoch ein erhöhter Anteil an toten Zellen in einzelnen Gruppen. Dies ist womöglich durch Apoptose bedingt. So zeigte die FACS-Analyse hier im Beispiel in einer der drei mit der CD14-Methode gewonnenen Zellkulturen (Abbildung 3.2) in den unstimulierten Zellen eine Reinheit von über 90%, bei den mit LPS stimulierten Zellen nur um 60%. In Versuchen mit LPS und Interferon- γ (hier nicht gezeigt) lag die Quote der toten Zellen teils noch deutlich höher. Aufgrund

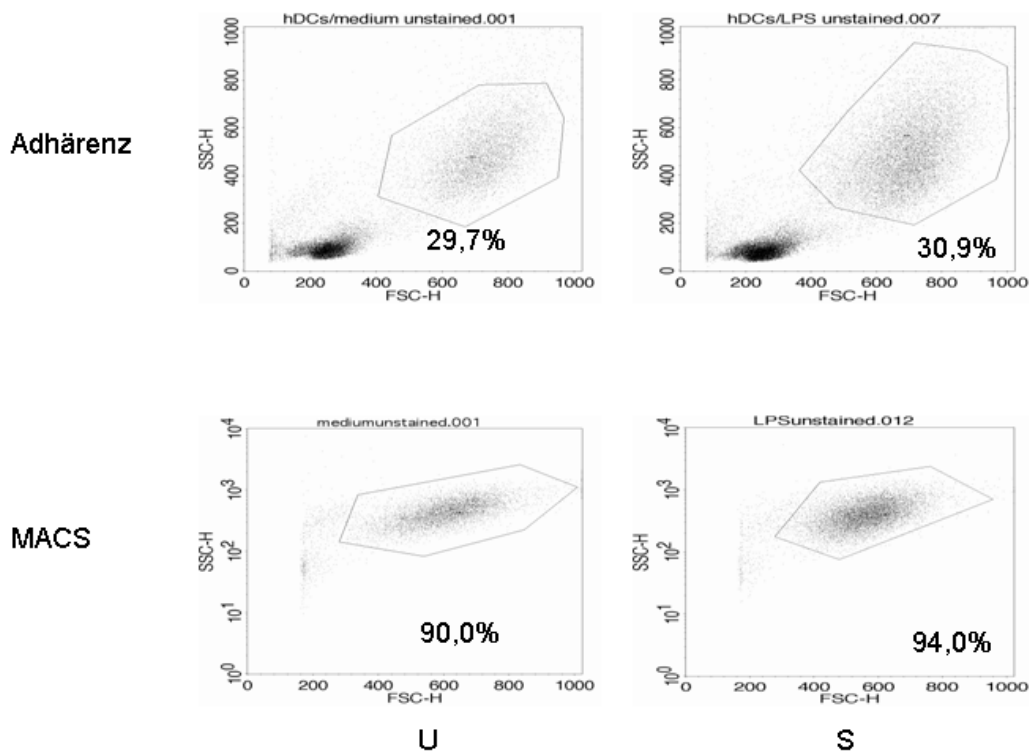


Abbildung 3.1: Vergleich der Adhärenzmethode mit der CD14-Sortierung. Mit der Adhärenzmethode konnten nur Reinheiten von etwa 30% erzielt werden (hier 29,7% in der unstimulierten und 30,7% in der stimulierten Gruppe). Dagegen sind die Kulturen nach der CD14-Selektion hoch angereichert, hier im besten Fall mit über 90% (90,0% in der unstimulierten und 94,0% in der stimulierten Gruppe). U: unstimulierte, S: mit LPS stimulierte Zellen, Diagramme: Y-Achse: SSC: Granularität, X-Achse: FSC: Zellgröße.

der Degeneration der freigesetzten RNA außerhalb der Zelle sollten diese Zellen das Ergebnis der RNA-Analysen jedoch nicht stören.

Alle Zellen zeigten eine deutliche Expression von CD11c im FACS, ein typischer Marker für Dendritische Zellen. Am dritten Tag nach der Stimulation der Zellen mit LPS zeigte die stimulierte Gruppe eine deutlich verstärkte Expression der kostimulierenden Oberflächenproteine CD80 und CD86, welche zusammen mit MHC-II während der Reifung präsentiert werden. Ebenso konnte eine deutliche TNF- α Sekretion der stimulierten Zellen mittels ELISA nachgewiesen werden (durchgeführt von Regina Teufel und Birgid Scheel, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen). Diese Ergebnisse zeigen, dass in vitro erfolgreich sehr reine Kulturen Dendritischer Zellen erzeugt wurden. Durch die Stimulation mit LPS sind

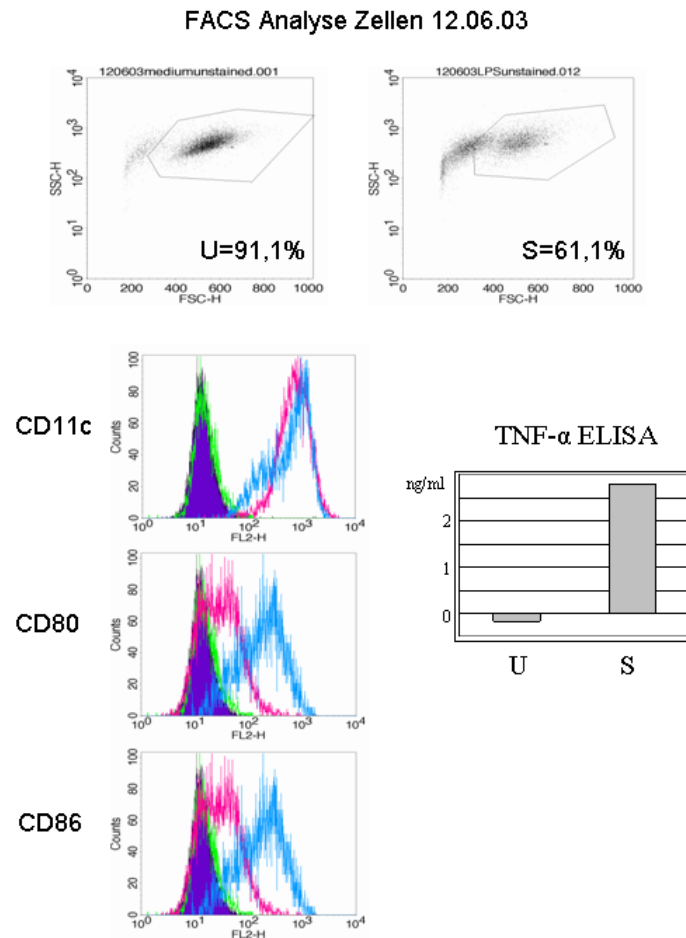


Abbildung 3.2: FACS-Ergebnisse eines Einzelexperimentes: Durch die CD14⁺-Sortierung wurden sehr reine Kulturen Dendritischer Zellen gewonnen. So zeigen über 90% der unstimulierten Gruppe (u) eine hohe Homogenität. Die mit LPS stimulierte Gruppe (s) dagegen beinhaltet mehr tote Zellen (s.Text). Die gefensterten Zellen exprimieren deutlich CD11c, mit LPS stimulierte Zellen zeigen im Vergleich zu unstimulierten Zellen eine deutliche Mehrexpression von CD80 sowie CD86 (rosa Kurve: unstimulierte Zellen, hellblaue Kurve: stimulierte Zellen, Isotypkontrollen: dunkelblau gefüllte Kurve: unstimulierte Zellen CD11c und CD80: IgG1, CD86: IgG2b, grüne Kurve: stimulierte Zellen CD11c und CD80: IgG1, CD86: IgG2b). Stimulierte Zellen zeigen TNF- α Sekretion (Balkengrafik, ELISA durchgeführt von Regina Teufel und Birgid Scheel, Interfakultäres Institut für Zellbiologie, Universität Tübingen).

die Dendritischen Zellen erfolgreich ausgereift (Abbildung 3.2) (siehe auch Anhang, Abbildungen 6.1, 6.2 und 6.3).

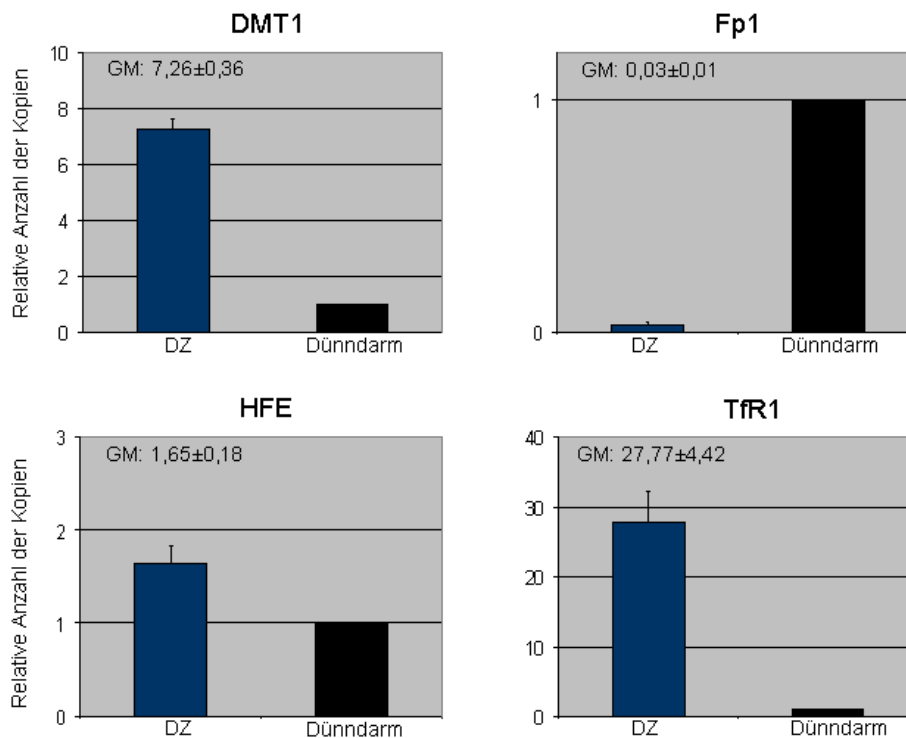


Abbildung 3.3: Die Abbildung zeigt geometrisch gemittelte Werte (GM) der RNA-Expression der Proteine DMT1, Fp1, HFE und TfR1 in Dendritischen Zellen im Vergleich zum Dünndarm. X-Achse: DZ: Relation unstimulierter Dendritischer Zellen des zweiten Tages nach Stimulation zum Dünndarm (Dd), Y-Achse: relative Expression, Dünndarm wurde hier als Vergleich als 1 dargestellt, Werte: Geometrisches Mittel \pm nach Gauss fortgeplanter Fehler der Einzelwerte, siehe hierzu Tabelle 3.1

3.2 Ergebnisse der mRNA-Analysen mittels qRT-PCR

3.2.1 Vergleich der mRNA-Expression von DMT1, Fp1, HFE und TfR1 zwischen Dendritischen Zellen und dem Dünndarm

Aus dem Dünndarm gewonnene Gesamt-mRNA wurde mit in die quantitative Analyse integriert. Der Dünndarm gilt aufgrund der hier stattfindenden Eisenaufnahme und Regulation des Eisenmetabolismus als wichtigstes, in den Eisenstoffwechsel integriertes Organ. Hier ist eine deutliche Expression der in Frage kommenden Proteine zu erwarten. Zu beachten ist jedoch, dass diese RNA aus gesamten Dünndärmen extrahiert wurde. Das bedeutet, eine Vielzahl von unterschiedlichen Zellen geht hier in den Gesamt-RNA-Pool ein (siehe dazu auch Diskussion). Aus drei Experimenten

wurde das Verhältnis zwischen dem mRNA-Gehalt der unstimulierten Dendritischen Zellen des zweiten Tages nach Stimulation und der erworbenen Dünndarm-RNA für die jeweiligen Proteine gebildet (Abbildung 3.3). Diese wurden geometrisch gemittelt. Der Fehlerbalken bezeichnet hier nicht die Streuung der Einzelwerte, sondern den fortgepflanzten Fehler (für die Einzelwerte siehe Tabelle 3.1). Dendritische Zellen zeigen somit deutliche mRNA-Spiegel der in Frage kommenden Proteine. Sowohl TfR1-, HFE- als auch DMT1-mRNA ist deutlich exprimiert. Dabei weist TfR1 im Mittel eine etwa 28-fach stärkere Genexpression in Dendritischen Zellen verglichen mit dem Dünndarm auf. DMT1-mRNA ist im Mittel 7-fach stärker exprimiert, HFE dagegen zeigt in Dendritischen Zellen eine ähnliche Genexpression wie die Dünndarmprobe. Fp1 als das verantwortliche Protein des Eisenexports zeigt dagegen in Dendritischen Zellen deutlich niedrigere mRNA-Konzentrationen, ca. 33-fach (geometrisches Mittel: 0,03) niedriger als im Dünndarm (Rohdaten siehe Anhang, Tabelle 6.2).

	4.2.-6.2.	18.2.-20.2.	10.6.-12.6.	GM	fortgepfl. Fehler
DMT1	6,66±0,74	4,86±0,33	11,84±0,86	7,26	0,36
Fp1	0,02±0,01	0,02±0,01	0,08±0,03	0,03	0,01
HFE	2,14±0,31	1,22±0,17	1,71±0,43	1,65	0,18
TfR1	28,35±3,83	18,86±0,83	40,08±18,27	27,77	4,42

Tabelle 3.1: Einzelwerte des Vergleichs Dendritischer Zellen mit der Dünndarmprobe. Angegeben sind die Quotienten des mRNA-Gehaltes zwischen den unstimulierten Dendritischen Zellen des zweiten Tags und der Dünndarmprobe. Die Werte bezeichnen dabei den Quotienten \pm die Standardabweichung. Horizontal: Daten der drei Zellkulturen, GM: geometrisches Mittel, fortgepfl. Fehler: der nach Gausscher Fehlerfortpflanzung berechnete fortgepflanzte Fehler, vertikal: die einzelnen mRNAs. Weiteres siehe Text.

3.2.2 Veränderung der mRNA-Expression der Proteine DMT1, Fp1, HFE und TfR1 während der Reifung Dendritischer Zellen

3.2.2.1 QRT-PCR Ergebnisse durch die Adhärenzmethode gewonnener Dendritischer Zellen

Durch Adhärenz gewonnene Dendritische Zellen wurden einer RNA-Analyse unterzogen, siehe Abbildung 3.4. Zu beachten ist, dass hier der Anteil an Fremdzellen recht hoch ist. Die mit LPS stimulierten Zellen zeigen am ersten Tag nach der

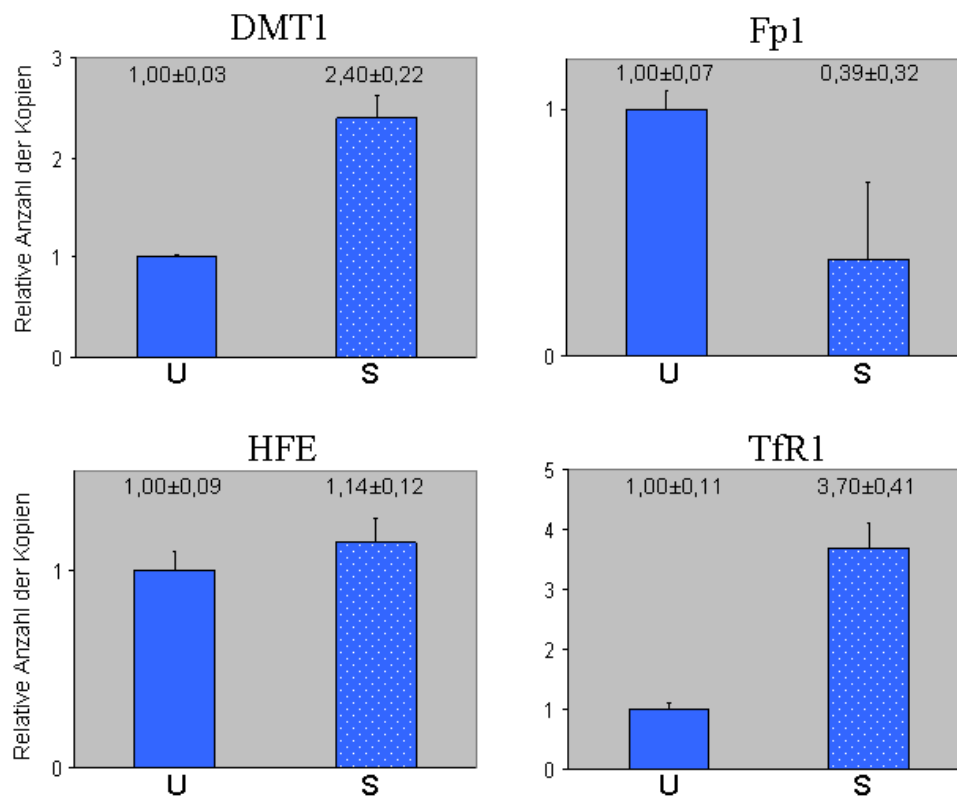


Abbildung 3.4: Ergebnis der Echtzeit-PCR einer, am ersten Tag nach Stimulation mit LPS, durch Adhärenz gewonnenen Probe. X-Achse: U: unstimulierte, S: mit LPS stimulierte Zellen, Y-Achse: relative Anzahl der Kopien, unstimulierte Zellen auf 1 normiert, Werte: Wert \pm Standardabweichung.

Stimulation eine Reduktion von Fp1-mRNA auf etwa ein Drittel (0,39), eine vermehrte Expression der TfR1-mRNA um das 3,7-fache. Die HFE-mRNA-Expression ist hier sehr konstant, DMT1-mRNA ist 2,4-fach vermehrt in den stimulierten Zellen nachweisbar (Rohdaten siehe Anhang, Tabelle 6.1). Die übrigen Versuche wurden aufgrund des höheren Reinheitsgrades und des damit geringeren Hintergrundes mit CD14-sortierten Zellen durchgeführt.

3.2.2.2 QRT-PCR Ergebnisse der mittels CD14-Sortierung gewonnenen Dendritischen Zellen

Um während der Reifung Dendritischer Zellen auftretende Expressionsveränderungen zu erfassen, wurden 24 Stunden (Std.), 48 Std. und 72 Std. nach dem LPS-Stimulus jeweils Zellen beider Gruppen zur RNA-Analyse entnommen. Die Kontrolle zu unstimulierten Zellen des gleichen Alters schließt Nebeneffekte, zum Beispiel durch längeres Verweilen im Medium, weitgehend aus. Abbildung 3.5 zeigt das Er-

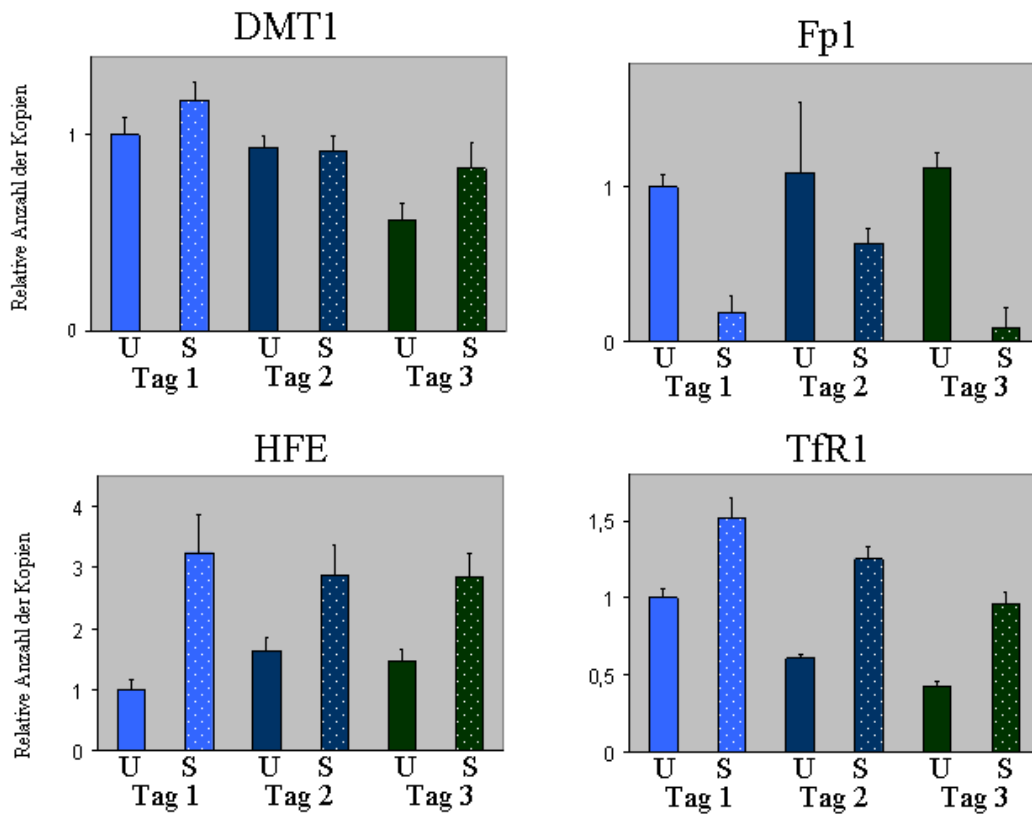


Abbildung 3.5: Ergebnis der qRT-PCR-Analyse eines Einzelerperiments der Proben des ersten bis dritten Tages nach Stimulation mit LPS: Die X-Achse zeigt U: unstimulierte Zellen, S: mit LPS stimulierte Zellen (gepunktet) am Tag 1-3 nach Stimulation, die Y-Achse zeigt: relative Anzahl der Kopien, unstimulierte Zellen des Tages 1 wurden auf 1 normiert. Erklärung siehe Text.

gebnis eines der drei Analysen der durch CD14-Sortierung gewonnenen Dendritischen Zellen.

Deutlich wird hier, dass sowohl über die gesamten drei Tage hinweg als auch an einzelnen Tagen zwischen stimulierten und unstimulierten Zellen Unterschiede hinsichtlich der mRNA-Expression bestehen. So ist der Spiegel der DMT1-mRNA über die drei Tage insgesamt sinkend, innerhalb eines Tages sowohl in der stimulierten als auch in der unstimulierten Gruppe jedoch recht konstant. HFE und TfR1 zeigen an allen drei Tagen in der stimulierten Gruppe deutlich höhere mRNA-Spiegel als in der Kontrollgruppe. Für Fp1 verhält es sich gegensätzlich. Deutlich wird hier die geringere Expression der mRNA in der stimulierten Gruppe.

Um zufällige Schwankungen der mRNA-Spiegel zu eliminieren, wurden drei Ex-

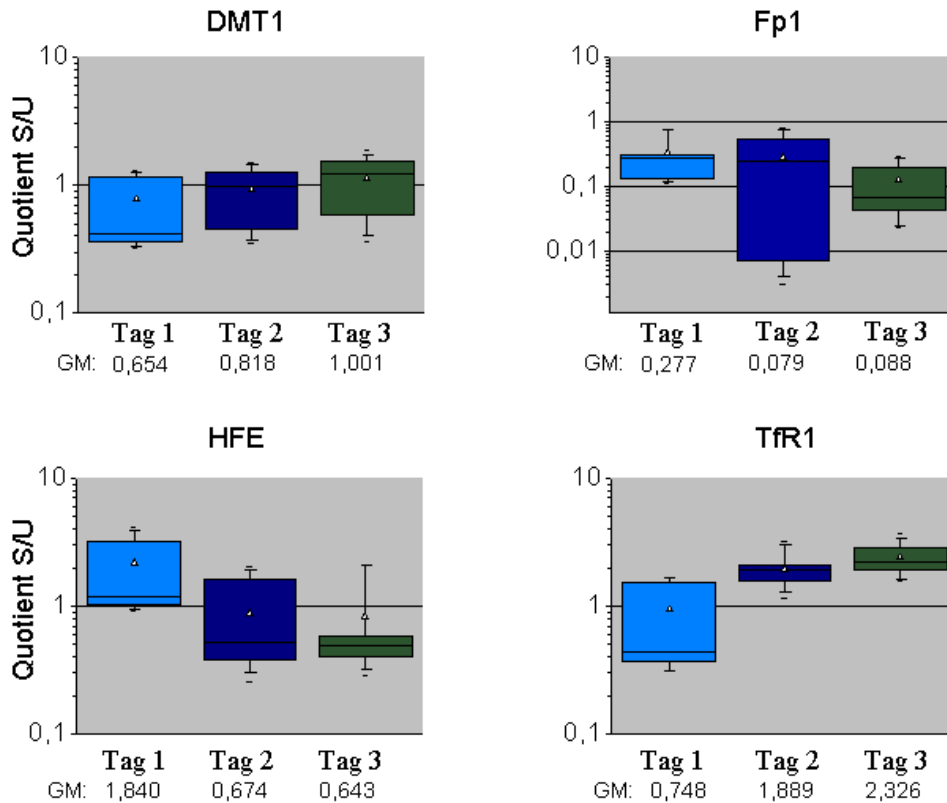


Abbildung 3.6: Zusammenfassung der Analysen der mittels CD14-Sortierung gewonnenen Zellen: Logarithmisch dargestellt ist das Verhältnis der Expression LPS-stimulierter (S) zu unstimulierten Zellen (U) für die jeweiligen Proteine am ersten bis dritten Tag nach der Stimulation. Zu beachten ist die weitere Skalierung bei Ferroportin-1 (Fp1). GM: geometrisches Mittel, weitere Erklärung siehe Text.

perimente summiert.

Die Abbildung 3.6 zeigt das Verhältnis der gemessenen RNA-Konzentrationen LPS-stimulierter im Vergleich zu unstimulierten Dendritischen Zellen. Die kurzen äußeren Linien stehen für Minimum und Maximum, die mit der Box verbundenen äußeren Linien für die 5./95. Perzentile, Box: Linien für 50., 25./75. Perzentile, kleines weißes Dreieck: arithmetisches Mittel, GM: geometrisches Mittel. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 3.2 wiedergegeben (Rohdaten für die Erstellung siehe Anhang, Tab. 6.2). Auffallend sind hier die mRNA-Konzentrationen der Proteine Fp1 und TfR1. Fp1, welches im Vergleich zum Dünndarm generell schon sehr gering exprimiert scheint, ist in reifenden Dendritischen Zellen noch deutlich weniger nachweisbar. Es zeigt sich am dritten Tag nach Stimulation eine Expressionsabnahme um das 11,36-fache (geometrisches Mittel 0,088), bei geringer Schwankungsbreite der Ergebnisse. Dagegen nimmt die Konzentration der mRNA für TfR1 zu, ca. um das 2,33-fache (geometri-

sches Mittel) am dritten Tag nach Stimulation der Zellen mit LPS. DMT1 und HFE zeigen Veränderungen, schwanken aber in den einzelnen Experimenten und lassen so auf keine eindeutige Veränderung schließen (geometrisches Mittel $0,5 < \text{geometrisches Mittel} < 2$).

Probe	50%	75%	25%	95%	5%	Max	Min	a.M.	g.M.
DMT1 Tag 1	0,412	1,165	0,360	1,250	0,330	1,310	0,320	0,770	0,654
DMT1 Tag 2	0,979	1,266	0,448	1,454	0,374	1,505	0,349	0,916	0,818
DMT1 Tag 3	1,210	1,526	0,586	1,717	0,410	1,892	0,360	1,125	1,001
FP1 Tag 1	0,277	0,307	0,129	0,734	0,116	0,743	0,111	0,331	0,277
FP1 Tag 2	0,250	0,525	0,007	0,739	0,004	0,778	0,003	0,284	0,079
FP1 Tag 3	0,067	0,193	0,042	0,277	0,024	0,290	0,023	0,124	0,088
HFE Tag 1	1,181	3,204	1,035	3,891	0,940	4,084	0,927	2,158	1,840
HFE Tag 2	0,518	1,602	0,382	1,932	0,301	2,042	0,255	0,875	0,674
HFE Tag 3	0,490	0,590	0,401	2,099	0,316	2,114	0,289	0,826	0,643
TfR1 Tag 1	0,443	1,513	0,369	1,664	0,313	1,675	0,309	0,944	0,748
TfR1 Tag 2	1,945	2,111	1,587	3,025	1,277	3,238	1,169	1,948	1,889
TfR1 Tag 3	2,228	2,885	1,919	3,395	1,631	3,658	1,576	2,395	2,326

Tabelle 3.2: Einzelwerte der Grafik 3.6: Perzentilen, Max: Maximalwert, Min: Minimalwert, a.M.: arithmetisches Mittel, g.M.: geometrisches Mittel.

3.3 Oberflächenexpression von TfR1, HFE und MHC-II

Ob die gemessene Erhöhung der mRNA-Konzentration des Transferrinrezeptors auch als erhöhte Oberflächenexpression des Proteins selbst sichtbar ist und ob man HFE mittels des Antikörpers 2F5 an der Zelloberfläche nachweisen kann, wurde mit einer FACS-Analyse untersucht, siehe dazu Abbildung 3.7. Dafür wurde eine weitere Zellkultur CD14-sortierter Zellen verwandt, siehe Anhang, Abbildung 6.3.

Desweiteren wurde ein gegen MHC-II-Proteine gerichteter Antikörper integriert. MHC-II-Proteine als antigenpräsentierende Proteine werden normalerweise während der Reifung der Dendritischen Zellen an der Oberfläche deutlich stärker exprimiert. Als Kontrolle dienten Antikörper desselben Isotyps. Der für die Erkennung der MHC-II-Proteine eingesetzte Antikörper TU39 benötigt als gemischter Antikörper jeweils 2 Isotypkontrollen.

Die verstärkte Expression der MHC-II-Proteine auf reifen Dendritischen Zellen war deutlich im FACS sichtbar (hellblaue Kurve im Vergleich zur rosa Kurve), eine der Isotypkontrollen ist zwar ebenfalls erhöht, gehört aber zur Gruppe der unstimulierten Zellen. Die Erhöhung der MHC-II-Proteine zeigt ebenso die erfolgreiche Reifung

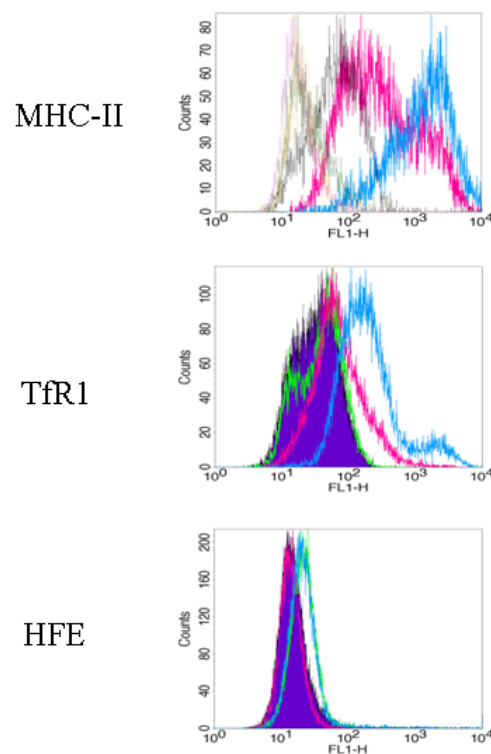


Abbildung 3.7: Oberflächenexpression von MHC-II, Tfr1 und HFE im FACS: MHC-II: rosa Kurve unstimulierte Zellen, hellblaue Kurve: stimulierte Zellen, restliche Kurven: Isotypkontrollen IgG2a und IgG2b, etwas rechtsverschobe graue Kurve: unstimulierte Zellen IgG2a. Tfr1 und HFE: rosa Kurve: unstimulierte Zellen, hellblaue Kurve: stimulierte Zellen. Isotypkontrollen: gefüllte Kurve: unstimulierte Zellen, Tfr1 IgG2a, HFE IgG1, grüne Kurve: stimulierte Zellen Tfr1 IgG2a, HFE IgG1. Deutlich ist die vermehrte Expression von MHC-II auf ausgereiften Dendritischen Zellen, Tfr1 zeigt ebenfalls eine verstärkte Expression auf stimulierten reifen Dendritischen Zellen. HFE konnte nicht auf der Zelloberfläche mit dem benutzten Antikörper 2F5 detektiert werden (siehe Text).

der mit LPS stimulierten Zellen.

Tfr1 konnte hier ebenfalls verstärkt exprimiert auf ausgereiften Dendritischen Zellen gefunden werden (hellblaue Kurve im Vergleich zur rosa Kurve). Die Erhöhung der Fluoreszenz ist zwar nicht so ausgeprägt wie bei den MHC-II-Proteinen, aber deutlich detektierbar.

HFE konnte auf den Zellen nicht nachgewiesen werden. Die hellblaue Kurve ist zwar gegenüber der rosa Kurve etwas rechtsverschoben, was eine erhöhte Fluoreszenz anzeigt, beide Kurven haben jedoch dieselbe Intensität wie die jeweiligen Isotypkontrollen.

3.4 Intrazelluläre Lokalisation von TfR1, HFE, MHC-I und MHC-II

Da in der Analyse der mRNA wie auch im FACS eine erhöhte Expression des Transferrinrezeptors auf reifen Dendritischen Zellen gesehen wurde, stellte sich die Frage, ob die erhöhte Oberflächenexpression nur aus der erhöhten Transskriptionsrate herrührt oder ob auch posttranskriptionelle Mechanismen hier einen Einfluss haben. Für MHC-II-Proteine zum Beispiel ist bekannt, dass sie aus Vesikeln heraus an die Oberfläche mobilisiert werden können. Um dies genauer zu untersuchen, wurden die Dendritischen Zellen mit Antikörpern gegen MHC-I, MHC-II, TfR1 und HFE inkubiert und unter einem konfokalen Mikroskop untersucht (siehe Abbildung 3.8). Die konfokale Mikroskopie bietet hier die Möglichkeit, durch die Untersuchung der Zellen in drei Ebenen auch intrazelluläre Fluoreszenz aufzuzeigen.

Sowohl MHC-I als auch MHC-II Proteine wurden mit dem konfokalen Mikroskop nachgewiesen. Beide sind deutlich anhand der Fluoreszenz an der Zelloberfläche nachweisbar. Bei MHC-II zeigt sich desweiteren die bereits beschriebene Redistribution aus Vesikeln heraus. Ist in den unstimulierten Zellen noch Fluoreszenz intrazellulär in Form kleiner Fluoreszenzgruppierungen sichtbar, so zeigen die gereiften Dendritischen Zellen nur noch Fluoreszenz an der Oberfläche.

TfR1 konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Eine Redistribution war jedoch nicht zu beobachten, sowohl bei den unreifen als auch bei den reifen Dendritischen Zellen war Fluoreszenz intrazellulär und an der Zelloberfläche nachweisbar.

HFE war auch hier mit dem benutzten Antikörper 2F5 nicht nachweisbar.

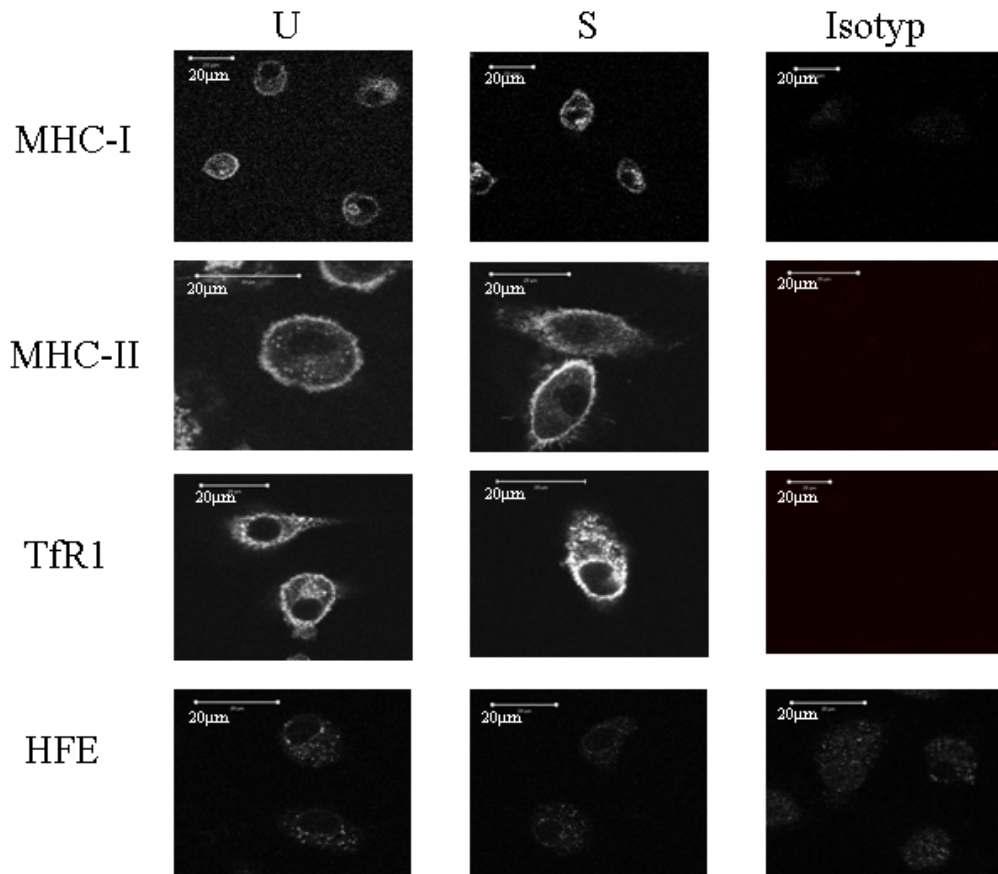


Abbildung 3.8: Untersuchung der Zellen mit dem Konfokalen Mikroskop: MHC-I, MHC-II und Tfr1 konnten an der Oberfläche sowie teils intrazellulär sichtbar gemacht werden, HFE war auch hier nicht detektierbar (s.Text). Ist in nicht stimulierten unreifen Dendritischen Zellen MHC-II noch im Zellinneren in Vesikeln nachweisbar, so erfolgt bei Reifung eine Redistribution aus Vesikeln an die Zelloberfläche, sichtbar an der Umverteilung der Fluoreszenz. Dies ist bei Tfr1 nicht zu beobachten. U: unstimulierte, S: mit LPS stimulierte Dendritische Zellen, Isotyp: jeweiliger Isotyp als Negativkontrolle.

4 Diskussion

4.1 Diskussion der qRT-PCR Analysen

4.1.1 Vergleich der mRNA-Expression von DMT1, Fp1, HFE und TfR1 zwischen Dendritischen Zellen und dem Dünndarm

Dendritische Zellen zeigen im Vergleich zur Dünndarmprobe eine deutliche Genexpression der bekannten, in den Eisenstoffwechsel integrierten Proteine DMT1, Fp1, HFE und TfR1.

Die von Clontech bezogene RNA wurde laut Produktbeschreibung aus gesamten Dünndärmen extrahiert, das bedeutet aus Duodenum, Jejunum und Ileum, im einzelnen aus Endothelzellen und sicherlich der gesamten Darmwand mit Muskelzellen und Bindegewebe.

Sicherlich ist nicht der gesamte Dünndarm so sehr in den Eisenhaushalt integriert wie Duodenum und proximales Jejunum. Besonders die Endothelzellen interessieren hier, da sie der Ort des Eisenstoffwechsels sind. Ein Vergleich zwischen Dendritischen Zellen und selektiv gewonnenen Endothelzellen aus dem Duodenum wäre hier sicherlich am interessantesten. Dies wäre jedoch entweder nur im Tierversuch möglich oder aber sehr invasiv, und beim Menschen wohl nur im Rahmen von Darmresektionen realisierbar. Diese aber beinhalten meist wieder einen pathologischen Befund, welcher die Genexpression beeinflussen könnte. So muss mit diesem Vergleich, der die mRNA aus einer Vielzahl unterschiedlicher Zelltypen enthält, vorlieb genommen werden.

Trotzdem lassen sich alle 4 mRNAs der Proteine gut in Dendritischen Zellen nachweisen und zeigen im Vergleich zur vorhandenen mRNA-Probe aus dem Dünndarm deutliche mRNA-Spiegel.

Dabei zeigt die deutliche Genexpression des Transferrinrezeptors, welcher im Vergleich zur Dünndarmprobe ca. 28-fach mehr in den Dendritischen Zellen nachweisbar war, dass Transferrin zur Eisenaufnahme auch in Dendritischen Zellen die Hauptrolle zukommen könnte. Zu beachten ist hier, dass der Vergleich nicht selektiv

zu den Endothelzellen des Dünndarms stattfand, da hier der Hintergrund anderer Zellen (s.o.) ja sehr hoch ist. Umso mehr erstaunt die starke Genexpression von Transferrinrezeptor-1 in den hier gewonnenen Dendritischen Zellen.

DMT1-mRNA ist ebenfalls deutlich detektierbar, in einer 7-fach höheren Konzentration als in der Dünndarmprobe. Wie TfR1 ist auch DMT1 in der Eisenaufnahme der Zellen von Bedeutung. Das an Transferrin gebundene Eisen wird mittels des TfR1 in die Zelle über „Clathrin-coated-pits“ aufgenommen und dann durch DMT1 aus dem Vesikel in das Zytoplasma gepumpt. Zusammen mit der hohen Expression von TfR1 erstaunt so die erhöhte Genexpression von DMT1 nicht, hängen sie doch auch funktionell zusammen.

HFE zeigt in Dendritischen Zellen eine ähnliche Genexpression wie in der Dünndarmprobe. Betrachtet man dies mit dem Wissen, dass HFE mit dem TfR1 funktionell verknüpft ist und dieser auf Dendritischen Zellen deutlich stärker als im Dünndarm exprimiert scheint (s.o.), so könnte dies eine geringere Hemmung der Eisenaufnahme über TfR1 in Dendritischen Zellen implizieren. Natürlich wird hier nur die mRNA betrachtet und nicht die Oberflächenexpression der Proteine. Somit gilt dies nur unter der Annahme, dass sich die verschiedenen mRNA-Spiegel auch in der Oberflächenexpression der Proteine wiederfinden.

Die deutlich geringere Genexpression von Fp1, ca. 33-fach niedriger als in der Dünndarmprobe, lässt eine geringere Bedeutung des Eisenexports vermuten. Hier gilt dieselbe Überlegung wie für Transferrinrezeptor-1. Das Dünndarmendothel hat zwar eine hohe Genexpression von Fp1, da es die Schranke zwischen Darmlumen und Blut darstellt, der Hintergrund aus anderen Zellen ist hier jedoch auch hoch. Somit erstaunt der deutliche Genexpressionsunterschied zwischen den hier gewonnenen Dendritischen Zellen und der Dünndarm-RNA.

Die Dendritischen Zellen scheinen somit deutlich zum eisenaufnehmenden Typ zu gehören, im Rahmen der bekannten Mechanismen der Eisenregulation zeigen sie deutliche mRNA-Spiegel der mit der Eisenaufnahme assoziierten Proteine TfR1 und DMT1. Die relativ zu TfR1 geringe Genexpression von HFE passt hierzu ins Bild. Ebenso ist Fp1 als das Protein des Eisenexports nur sehr gering nachweisbar.

4.1.2 Veränderung der mRNA-Spiegel der Proteine DMT1, Fp1, HFE und TfR1 während der Reifung Dendritischer Zellen

Leider lässt die geringe Anzahl der möglichen Versuche, verbunden mit dem hohen experimentellen Aufwand und den hohen Kosten der CD14-Methode, statistischen

Signifikanzprüfungen nur wenig Raum. Anhand gesetzter Kriterien sollten hier dennoch Rückschlüsse erlaubt sein.

Geometrische Mittel der Quotienten stimulierter zu unstimulierten Zellen $> 0,5$ und < 2 wurden als nicht signifikant gewertet. Nur Fp1 an allen drei Tagen und TfR1 am dritten Tag nach Stimulation erfüllen die gesetzten Bedingungen.

Fp1-mRNA war an allen drei Tagen klar in der stimulierten Gruppe geringer exprimiert als in der unstimulierten Gruppe. Die bis zu Faktor 11,3 (geometrisches Mittel 0,088 des Quotienten S/U) geringere mRNA-Menge am Tag drei bei sehr geringer Streubreite der Werte ist ebenso wie die Erhöhung der mRNA für TfR1 um das 2,3-fache am Tag drei bei ebenfalls sehr geringer Streuung als signifikant anzunehmen.

Die gemittelten Ergebnisse für HFE und DMT1 können nicht als signifikant gedeutet werden, in den einzelnen Experimenten waren zwar Unterschiede sichtbar, in der Summation relativierten sich diese jedoch. Zu erwarten gewesen wäre eine Reduktion von HFE, welche man unter Eisenbedarfsbedingungen als Gegenpart von TfR1 erwarten würde. Die Ergebnisse der Summation des Tages 3 für HFE deuten ein wenig in diese Richtung, sollen aber hier aufgrund der doch recht hohen Schwankung der Werte nicht diskutiert werden.

In der Adhärenzmethode wurde dies ebenso gesehen, in dem gezeigten Beispiel war ebenfalls eine Erhöhung des mRNA-Spiegel von TfR1 sowie eine Erniedrigung von Fp1 sichtbar.

Die beobachteten Veränderungen der Genexpression der Proteine TfR1 und Fp1 deuten somit aufgrund ihrer funktionellen Bedeutung auf eine vermehrte Eisenaufnahme während der Reifung hin.

Dies stimmt gut überein mit den Ergebnissen Kramers et al., die eine veränderte Morphologie und verringerte Stimulationsaktivität bei Dendritischen Zellen unter Eisenentzug beobachteten [54]. Dendritische Zellen scheinen somit unter ihrer Reifung aktiv über den Transferrinrezeptorweg vermehrt Eisen aufzunehmen und ihre Eisenexkretion durch Herabregulation von Fp1 zu reduzieren.

4.2 Proteinexpression von HFE und TfR1 im Vergleich zu MHC-II

Die mittels FACS gesehene vermehrte Oberflächenexpression des TfR1 der stimulierten Zellen im Vergleich zur unstimulierten Gruppe zeigt, dass die vermehrte Genexpression auch in einer stärkeren Oberflächenexpression des Proteins resultiert. Die

Fluoreszenzvermehrung ist hier jedoch nicht sehr ausgeprägt, unter Berücksichtigung der mRNA-Ergebnisse, welche um den Faktor 2,3 erhöhte mRNA-Spiegel zeigen, ist dies jedoch erklärlich. So scheint schon eine geringe Mehrexpression von TfR1 auszureichen, um ausreichend Eisen für die vermehrten Bedürfnisse während der Zellreife aufzunehmen.

Ein posttranslationeller Mechanismus, wie er zum Beispiel bei MHC-II-Proteinen bekannt ist und auch hier gesehen wurde, konnte für TfR1 im Konfokalen Mikroskop nicht nachgewiesen werden. MHC-II liegt im Cytosol in Vesikeln vor und wird während der Reifung an die Zelloberfläche gebracht. Die mit Transferrinrezeptor-Antikörpern behandelten Zellen zeigten nicht diese Fluoreszenzverlagerung von intrazellulär an die Zelloberfläche.

Die vermehrte Oberflächenexpression scheint somit rein aus der vermehrten Transkription des TfR1-Genes herzurühren.

HFE konnte nur auf mRNA-Basis nachgewiesen werden. Weder im FACS noch im Konfokalen Mikroskop zeigte sich ein Antikörperbindung des Antikörpers 2F5. Dies hängt möglicherweise damit zusammen, dass der zur Verfügung stehende Antikörper das Epitop nicht mehr erkennt, wenn HFE in Transferrin-gebundener Form vorliegt. Die Bindung mit Transferrinrezeptor scheint mit einer Konformationsveränderung einherzugehen, welche das Epitop nicht mehr zugänglich macht [4].

Sollte dies der Fall sein, so spricht die Expression HFEs in Dendritischen Zellen dafür, dass auch hier die Steuerung des Transferrinrezeptorzyklus dem Protein HFE unterliegt.

Bei Patienten mit hereditärer Hämochromatose, die an einer Mutation des HFE-Proteins leiden, wurde jedoch keine Verschlechterung der Funktion der Dendritischen Zellen gefunden [78]. Interessieren würde hier, ob die Zellen eine Eisenüberladung zeigen, eventuell beeinflusst diese die Zellfunktion nicht.

4.3 Aussichten

Weitere Untersuchungen dürften mehr Licht in den engen Zusammenhang zwischen dem Eisenhaushalt des Körpers und der Funktion der Dendritischen Zellen bringen. Kramer et al. zeigten bereits, dass Dendritische Zellen unter Eisenentzug phänotypisch undifferenziert waren und keine T-Zell-Stimulation mehr aufwiesen [54]. Diese Doktorarbeit zeigt sowohl, dass Dendritische Zellen deutlich die mit dem Eisenstoffwechsel assoziierten Proteine DMT1, FP1, HFE und TfR1 exprimieren, als auch, dass sich die Expression dieser Proteine während der Ausreifung verändert.

Insbesondere aufgrund der Bedeutung Dendritischer Zellen sollten weitere Untersuchungen erfolgen, z.B. ab welchen Konzentrationen und unter welchen Bedingungen das verfügbare Eisen Einfluss nimmt auf Ihre Funktion. So besitzen Dendritische Zellen bei der Tumorabwehr eine bedeutende Funktion, es wird versucht, dies therapeutisch zu nutzen. Bei Tumoren findet sich jedoch häufig eine Tumoranämie mit niedrigem freien Eisen bei vollen Ferritinspeichern [118]. Inwieweit dies die Funktion der Dendritischen Zellen oder auch die therapeutischen Bemühungen beeinflusst, ist noch nicht geklärt.

Auch der Einfluß von Therapien auf Dendritische Zellen, welche über den Transferrinrezeptor wirken sollen, bleibt zu untersuchen. Aufgrund der hohen Expression von Transferrinrezeptor-1 auf Dendritischen Zellen könnte es hier zu nicht gewollten Wirkungen kommen.

5 Zusammenfassung

Dendritische Zellen haben eine essentielle Funktion im Immunsystem. Als eine Art Wächter liegen sie z.B. als Langerhanszellen in Haut und Schleimhaut vor, bei Antigenkontakt können sie dieses phagozytieren.

Eine große Aufgabe der Dendritischen Zellen ist die Antigenpräsentation und Stimulation von T-Zellen. Dabei spielen sie nicht nur eine Rolle in der Abwehr pathogener Keime, auch in der Tumorzellkontrolle und im Rahmen anderer Erkrankungen, z.B. durch Prionen, kommt Dendritischen Zellen eine wichtige Bedeutung zu.

Die Entdeckung HFEs und des Zusammenhanges dieses MHC-I ähnlichen Moleküls mit der Eisenstoffwechselkrankheit hereditäre Hämochromatose war ein Meilenstein in der genetischen Forschung.

Nicht nur ist es die Ursache der hereditären Hämochromatose, auch schlägt es eine Brücke zwischen den Mechanismen der Immunabwehr über MHC-Proteine und dem Eisenstoffwechsel. Erste Ergebnisse zeigen, dass Viren dies nutzen, um über eine Degradation des Proteins sowohl der Antigenoberflächenexpression zu entgehen als auch intrazellulär Eisen anzureichern, was der Virenreplikation förderlich ist [112]. Die immer größer werdenden Erkenntnisse der Regulation des Eisenstoffwechsels und des Einflusses von Eisen auf verschiedenste Erkrankungen lassen neue Ansatzpunkte für Therapien erwarten. So werden schon jetzt Chelatoren nicht nur bei Erkrankungen mit Eisenüberladung, wie den verschiedenen Formen der Hämochromatose, eingesetzt, auch in der Therapie von Infektionskrankheiten wie der Tuberkulose oder der Hepatitis C wird über den Einsatz von entsprechenden Medikamenten nachgedacht [17] [48].

Bei Melanomzellen wurde gezeigt, dass Vitamin C über den Transferrinrezeptor zur Apoptose der Tumorzellen führen kann [49]. Über den Transferrinrezeptorzyklus sollen gezielt Therapeutika in die Zelle geschleust werden [59]. Diese und andere Ergebnisse zeigen Therapien auf, die womöglich an den Proteinen selbst ansetzen könnten.

Dabei sollte aber der Einfluss auf nützliche Zellen, wie zum Beispiel Dendritische Zellen, bekannt sein.

Mit Hilfe der CD14-Sortierung wurden sehr reine Kulturen Dendritischer Zellen er-

zeugt. Die Stimulation mit LPS führte zur Ausreifung dieser Zellen.

Dendritische Zellen zeigen deutliche Genexpression der in den Eisenstoffwechsel involvierten Proteine DMT1, Fp1, HFE und TfR1. Dabei sind im Vergleich zum Dünndarm TfR1 und DMT1 stark exprimiert, wogegen Fp1 deutlich weniger exprimiert ist. Die Genexpression von HFE entspricht in etwa der der Dünndarmprobe. Während der Reifung konnten sowohl auf mRNA-Ebene als auch an der Zelloberfläche typische Veränderungen, welche auf eine vermehrte Eisenaufnahme schließen lassen, gesehen werden. So ist vermehrt TfR1-mRNA in reifenden Dendritischen Zellen detektierbar. Dies zeigt sich auch an der Zelloberfläche mit einer vermehrten Expression des Proteins, wobei keine posttranskriptionellen Mechanismen beobachtet werden konnten.

Die Genexpression von Ferroportin dagegen wird unter dem LPS-Stimulus deutlich reduziert. So scheint die Abgabe von Eisen aus der Zelle noch gedrosselt zu werden. Dendritische Zellen zeigen somit ein deutlich ausgebildetes Eisenhomöostasesystem, die verstärkte Expression von Transferrinrezeptor sowie die verminderte Expression von Ferroportin lassen darauf schließen, dass Dendritische Zellen während ihrer Reifung vermehrt Eisen aufnehmen.

Andere Veröffentlichungen stützen diese These, Dendritische Zellen benötigen für ihre Ausreifung Eisen, ansonsten sind sie in ihrer Integrität gestört [54].

Therapiekonzepte, welche in den Eisenhaushalt der Zellen eingreifen, treffen somit auch Dendritische Zellen, welche einen integralen Bestandteil des Immunsystems darstellen. Somit könnte zwar eine Therapie mit Eisenchelatoren, wie sie im Falle der Tuberkulosebehandlung diskutiert wird [17], die Pathogenität der Erreger schwächen, der Einfluss auf die Abwehrmechanismen des menschlichen Körpers bedarf jedoch weiterer Untersuchungen. Eine Infunktionalität der Dendritischen Zellen aufgrund Eisenmangels würde eine empfindliche Schwächung des Immunsystems bedeuten.

6 Anhang

Probe	C_T DMT1	C_T FP1	C_T HFE	C_T Tfr1	C_T 18S
12.12.U	26,15 / 26,14	25,49 / 25,58	27,81 / 27,68	23,38 / 23,23	10,08 / 10,12
12.12.S	24,99 / 25,10	26,41 / 28,17	27,68 / 27,76	21,52 / 21,57	10,19 / 10,34

Tabelle 6.1: Durch die EchtzeitPCR gemessene Werte für die durch Adhärenz gewonnenen Dendritischen Zellen, U: unstimulierte Kontrolle, S: mit LPS stimulierte Zellen. C_T (threshold cycle): Zyklus, an dem die Fluoreszenz den gesetzten Schwellenwert überschritt, Probe: der jeweiligen Primer, Kalibrator: 18S.

Probe	C_T DMT1	C_T FP1	C_T HFE	C_T Tfr1	C_T 18S
4.2.U	25,79 / 25,87	31,18 / 32,55	30,33 / 30,52	22,40 / 22,25	9,89 / 9,77
4.2.S	26,70 / 26,57	32,71 / 32,43	29,70 / 29,72	23,02 / 23,26	9,19 / 9,17
5.2.U	27,43 / 27,55	31,94 / 32,02	30,23 / 30,09	24,22 / 24,06	10,08 / 9,95
5.2.S	26,42 / 26,37	32,22 / 33,45	30,23 / 30,86	23,08 / 22,76	9,33 / 9,36
6.2.U	28,33 / 28,74	33,20 / 32,45	30,22 / 30,49	25,13 / 25,16	10,38 / 10,43
6.2.S	26,66 / 26,72	34,41 / 33,78	29,91 / 29,94	23,00 / 22,78	8,97 / 9,04
Dd	28,78	24,51	29,81	27,62	8,57
18.2.U	27,20 / 27,1	33,33 / 33,41	32,18 / 31,94	24,12 / 24,11	10,49 / 10,57
18.2.S	26,87 / 26,8	36,58 / 35,24	30,42 / 30,14	23,35 / 23,49	10,48 / 10,41
19.2.U	26,70 / 26,65	32,24 / 33,07	30,84 / 30,71	24,29 / 24,25	9,96 / 9,95
19.2.S	28,14 / 28,2	34,98	31,33 / 31,55	24,71 / 24,66	11,47 / 11,39
20.2.U	26,85 / 27,1	32,24 / 32,1	30,51 / 30,52	24,44 / 24,34	9,59 / 9,48
20.2.S	27,35 / 27,59	35,43 / 38,95	30,61	24,24 / 24,22	10,65 / 10,51
Dd	28,05	25,76	30,16	27,69	9,05
10.6.U					
10.6.S	27,01 / 27,01	36,44 / 35,68	32,44 / 31,59	25,29 / 25,45	13,20 / 13,33
11.6.U	26,83 / 26,80	31,64 / 32,18	30,84 / 31,19	26,53 / 25,88	13,07 / 13,17
11.6.S	26,26 / 26,38	38,57 / 37,51	30,54 / 30,87	23,27 / 23,20	11,47 / 11,23
12.6.U	28,21 / 28,53	32,28 / 32,53	31,28 / 31,14	27,56 / 27,52	14,44 / 14,31
12.6.S	28,67 / 28,27	36,03 / 36,42	31,9	25,06 24,95	13,41 / 13,61
Dd	27,6	25,29	29,01	28,86	10,34

Tabelle 6.2: Mit EchtzeitPCR gemessene C_T Werte der durch CD14⁺ MACS Sortierung gewonnenen Dendritischen Zellen, U: unstimulierte Kontrolle, S: mit LPS stimulierte Zellen. C_T (threshold cyle): Zyklus, an dem die Fluoreszenz den gesetzten Schwellenwert überschritt, Probe: Zelllinie, Kalibrator: 18S, fehlende Werte: 10.6.U: auf dem RNA Gel konnten nicht die beiden Banden der 18S und 28S gezeigt werden, die RNA erschien degradiert, Einzelwerte: durch eine schlechte Dissoziationskurve mit falschen Schmelzpunkten herausgefallene Proben

FACS Analyse Zellen 04.-06.02.03

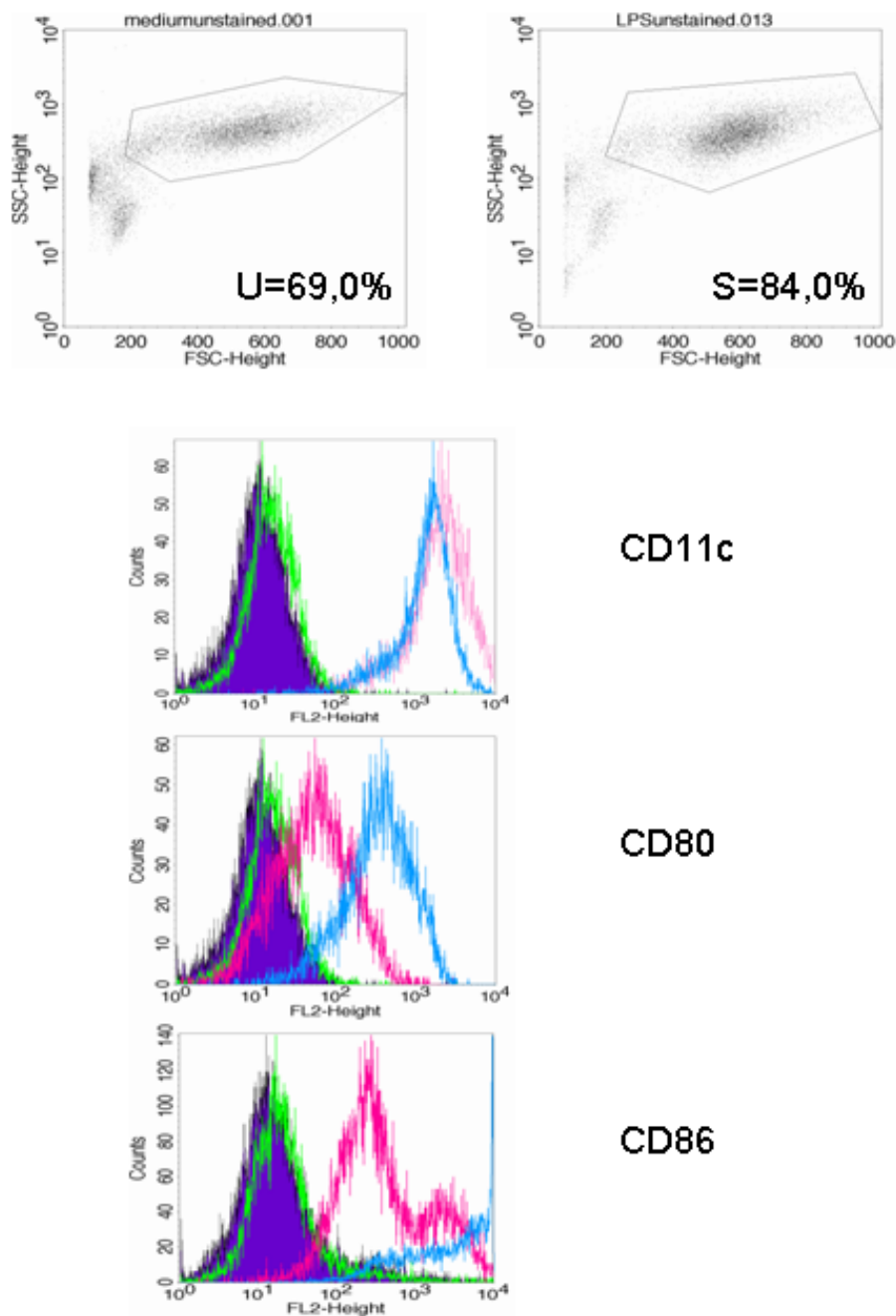


Abbildung 6.1: FACS Ergebnisse der Zellreihe vom 04.-06.02.03. Die Zellen weisen eine hohe Reinheit auf mit 69,0% Dendritischen Zellen in der unstimulierten und 84,0% in der stimulierten Gruppe. Beide zeigen eine deutliche Expression von CD11c, die stimulierten Zellen exprimieren verstärkt CD80 und CD86 (rosa Kurve: unstimulierte Zellen, hellblaue Kurve: stimulierte Zellen, Isotypkontrollen: dunkelblau gefüllte Kurve: unstimulierte Zellen CD11c und CD80: IgG1, CD86: IgG2b, grüne Kurve: stimulierte Zellen CD11c und CD80: IgG1, CD86: IgG2b).

FACS Analyse Zellen 18.-20.02.03

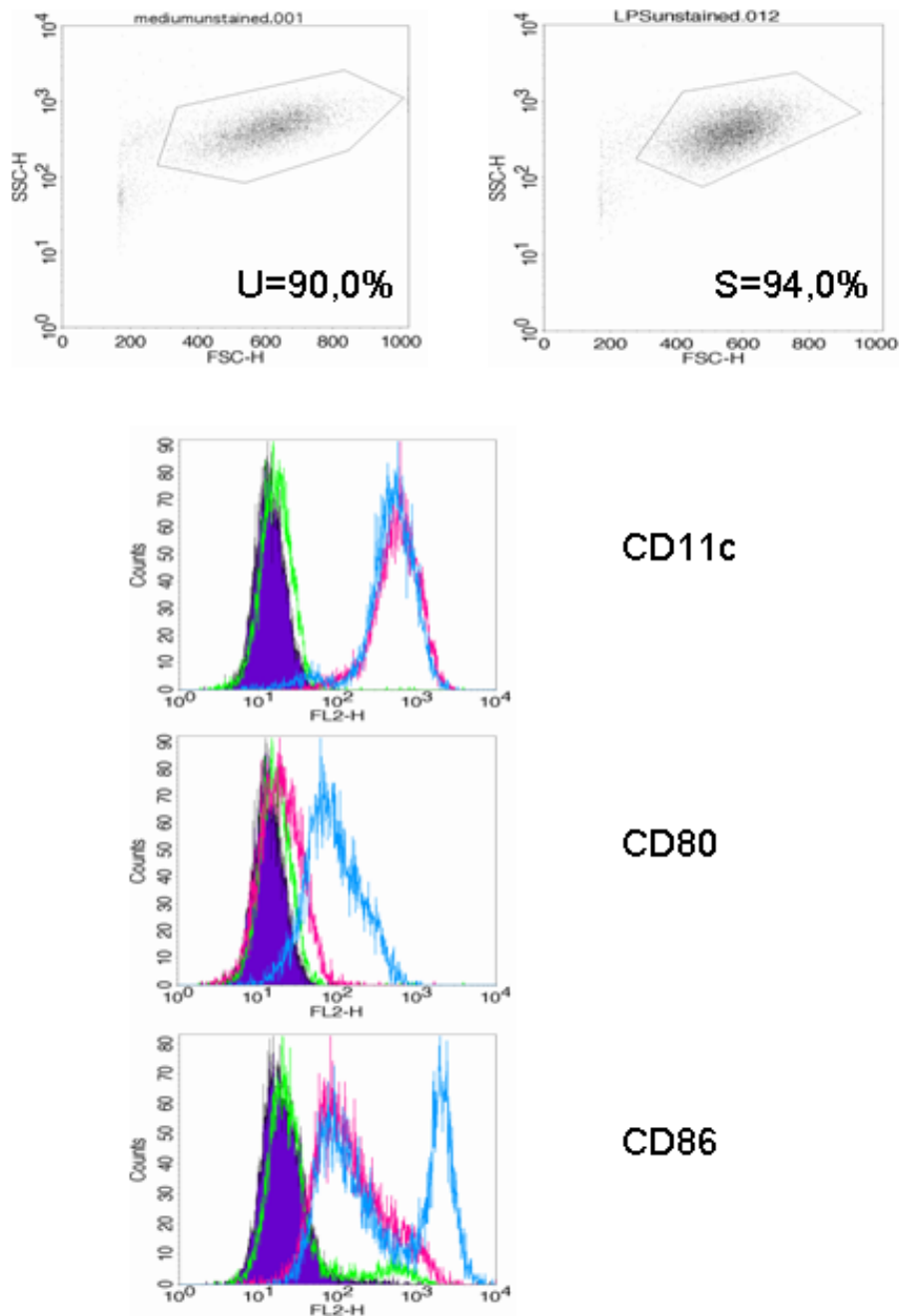


Abbildung 6.2: FACS Ergebnisse der Zellreihe vom 18.-20.02.03. Die Zellen weisen eine hohe Reinheit auf mit 90,0% Dendritischen Zellen in der unstimulierten und 94,0% in der stimulierten Gruppe. Beide zeigen eine deutliche Expression von CD11c, die stimulierten Zellen exprimieren verstärkt CD80 und CD86 (rosa Kurve: unstimulierte Zellen, hellblaue Kurve: stimulierte Zellen, Isotypkontrollen: dunkelblau gefüllte Kurve: unstimulierte Zellen CD11c und CD80: IgG1, CD86: IgG2b, grüne Kurve: stimulierte Zellen CD11c und CD80: IgG1, CD86: IgG2b).

FACS Analyse 11.-13.03.03

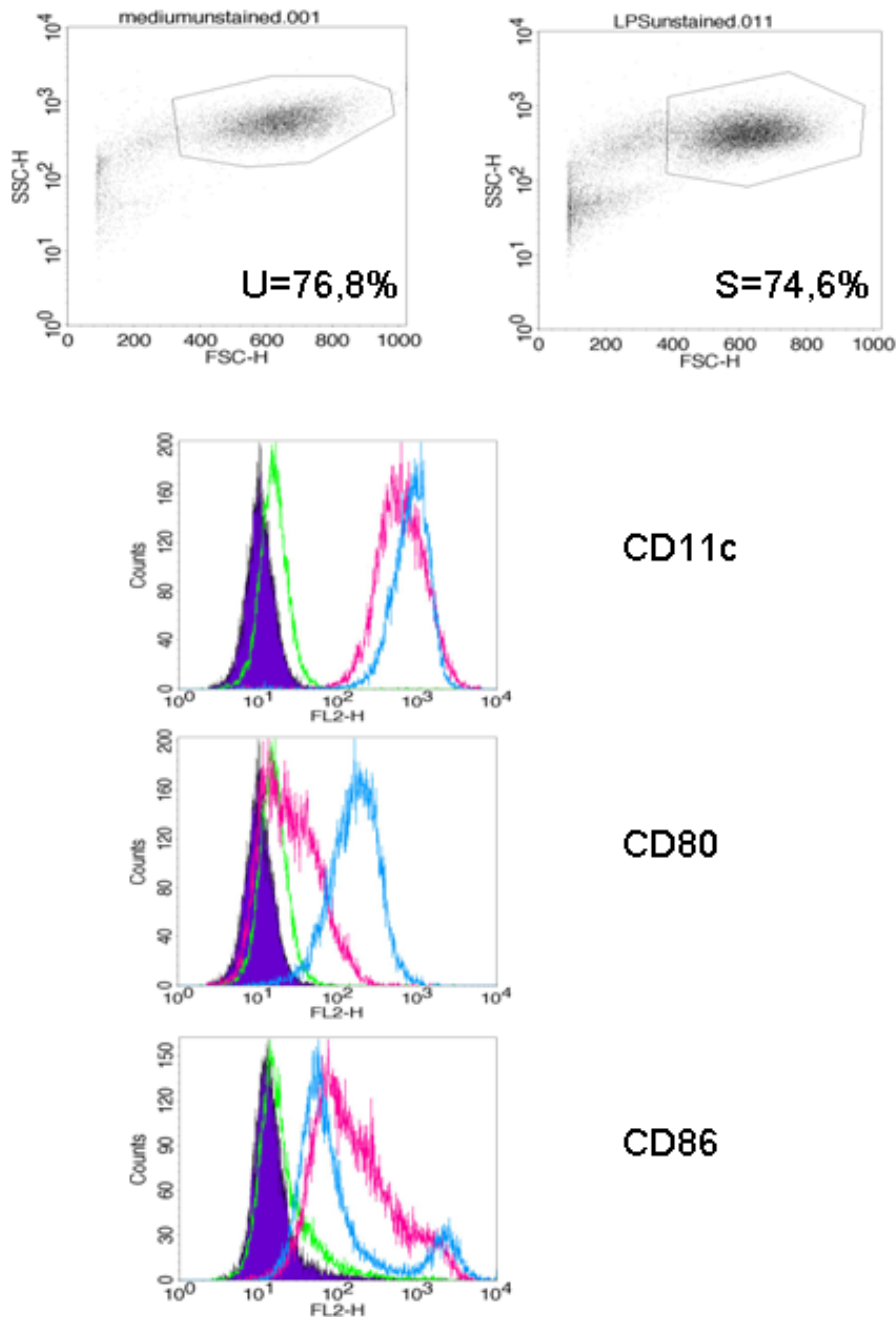


Abbildung 6.3: FACS Ergebnisse der Zellreihe vom 11.-13.03.03. Die Zellen weisen eine hohe Reinheit auf mit 76,8,1 Prozent Dendritischen Zellen in der unstimulierten und 74,8% in der stimulierten Gruppe. Beide zeigen eine deutliche Expression von CD11c, die stimulierten Zellen exprimieren verstärkt CD80 und CD86 (rosa Kurve: unstimulierte Zellen, hellblaue Kurve: stimulierte Zellen, Isotypkontrollen: dunkelblau gefüllte Kurve: unstimulierte Zellen CD11c und CD80: IgG1, CD86: IgG2b, grüne Kurve: stimulierte Zellen CD11c und CD80: IgG1, CD86: IgG2b).

7 Literaturverzeichnis

- [1] BAKER, H. M. ; ANDERSON, B. F. ; BAKER, E. N.: Dealing with iron: common structural principles in proteins that transport iron and heme. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 100 (2003), Nr. 7, S. 3579–83
- [2] BANCHEREAU, J. ; PALUCKA, A. K.: Dendritic cells as therapeutic vaccines against cancer. In: *Nat Rev Immunol* 5 (2005), Nr. 4, S. 296–306
- [3] BANCHEREAU, J. ; STEINMAN, R. M.: Dendritic cells and the control of immunity. In: *Nature* 392 (1998), Nr. 6673, S. 245–52
- [4] BEN-ARIEH, S. V. ; ZIMERMAN, B. ; SMORODINSKY, N. I. ; YAACUBOVICZ, M. ; SCHECHTER, C. ; BACIK, I. ; GIBBS, J. ; BENNINK, J. R. ; YEWDELL, J. W. ; COLIGAN, J. E. ; FIRAT, H. ; LEMONNIER, F. ; EHRLICH, R.: Human cytomegalovirus protein US2 interferes with the expression of human HFE, a nonclassical class I major histocompatibility complex molecule that regulates iron homeostasis. In: *J Virol* 75 (2001), Nr. 21, S. 10557–62
- [5] BISHOP, G. A. ; HOSTAGER, B. S.: The CD40-CD154 interaction in B cell-T cell liaisons. In: *Cytokine Growth Factor Rev* 14 (2003), Nr. 3-4, S. 297–309
- [6] BULLEN, J. J. ; LEIGH, L. C. ; ROGERS, H. J.: The effect of iron compounds on the virulence of Escherichia coli for guinea-pigs. In: *Immunology* 15 (1968), Nr. 4, S. 581–8
- [7] CALZOLARI, A. ; DEAGLIO, S. ; SPOSI, N. M. ; PETRUCCI, E. ; MORSILLI, O. ; GABBIANELLI, M. ; MALAVASI, F. ; PESCHLE, C. ; TESTA, U.: Transferrin receptor 2 protein is not expressed in normal erythroid cells. In: *Biochem J* 381 (2004), Nr. Pt 3, S. 629–34
- [8] CAMASCHELLA, C. ; ROETTO, A. ; CALI, A. ; DE GOBBI, M. ; GAROZZO, G. ; CARELLA, M. ; MAJORANO, N. ; TOTARO, A. ; GASPARINI, P.: The gene TFR2 is mutated in a new type of haemochromatosis mapping to 7q22. In: *Nat Genet* 25 (2000), Nr. 1, S. 14–5
- [9] CAROLINE, L. ; ROSNER, F. ; KOZINN, P. J.: Elevated serum iron, low unbound transferrin and candidiasis in acute leukemia. In: *Blood* 34 (1969), Nr. 4, S. 441–51
- [10] CARPENTER, C. E. ; MAHONEY, A. W.: Contributions of heme and nonheme iron to human nutrition. In: *Crit Rev Food Sci Nutr* 31 (1992), Nr. 4, S. 333–67

- [11] CAUX, C. ; VANBERVLIET, B. ; MASSACRIER, C. ; DEZUTTER-DAMBUYANT, C. ; SAINT-VIS, B. de ; JACQUET, C. ; YONEDA, K. ; IMAMURA, S. ; SCHMITT, D. ; BANCHEREAU, J.: CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF+TNF alpha. In: *J Exp Med* 184 (1996), Nr. 2, S. 695–706
- [12] CELLA, M. ; JARROSSAY, D. ; FACCHETTI, F. ; ALEBARDI, O. ; NAKAJIMA, H. ; LANZAVECCHIA, A. ; COLONNA, M.: Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. In: *Nat Med* 5 (1999), Nr. 8, S. 919–23
- [13] CELLA, M. ; SALLUSTO, F. ; LANZAVECCHIA, A.: Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. In: *Curr Opin Immunol* 9 (1997), Nr. 1, S. 10–6
- [14] CERIO, R. ; GRIFFITHS, C. E. ; COOPER, K. D. ; NICKOLOFF, B. J. ; HEADINGTON, J. T.: Characterization of factor XIIIa positive dermal dendritic cells in normal and inflamed skin. In: *Br J Dermatol* 121 (1989), Nr. 4, S. 421–31
- [15] CIECHANOVER, A. ; SCHWARTZ, A. L. ; DAUTRY-VARSAT, A. ; LODISH, H. F.: Kinetics of internalization and recycling of transferrin and the transferrin receptor in a human hepatoma cell line. Effect of lysosomotropic agents. In: *J Biol Chem* 258 (1983), Nr. 16, S. 9681–9
- [16] CONRAD, M. E. ; UMBREIT, J. N.: Pathways of iron absorption. In: *Blood Cells Mol Dis* 29 (2002), Nr. 3, S. 336–55
- [17] CRONJE, L. ; BORNMAN, L.: Iron overload and tuberculosis: a case for iron chelation therapy. In: *Int J Tuberc Lung Dis* 9 (2005), Nr. 1, S. 2–9
- [18] CUI, Z. ; LOCKMAN, P. R. ; ATWOOD, C. S. ; HSU, C. H. ; GUPTE, A. ; ALLEN, D. D. ; MUMPER, R. J.: Novel D-penicillamine carrying nanoparticles for metal chelation therapy in Alzheimer's and other CNS diseases. In: *Eur J Pharm Biopharm* 59 (2005), Nr. 2, S. 263–72
- [19] CYSTER, J. G.: Chemokines and the homing of dendritic cells to the T cell areas of lymphoid organs. In: *J Exp Med* 189 (1999), Nr. 3, S. 447–50
- [20] DAL MASO, L. ; SERRAINO, D. ; FRANCESCHI, S.: Epidemiology of AIDS-related tumours in developed and developing countries. In: *Eur J Cancer* 37 (2001), Nr. 10, S. 1188–201
- [21] DAUTRY-VARSAT, A. ; CIECHANOVER, A. ; LODISH, H. F.: pH and the recycling of transferrin during receptor-mediated endocytosis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 80 (1983), Nr. 8, S. 2258–62
- [22] DI BISCEGLIE, A. M. ; BONKOVSKY, H. L. ; CHOPRA, S. ; FLAMM, S. ; REDDY, R. K. ; GRACE, N. ; KILLENBERG, P. ; HUNT, C. ; TAMBURRO, C. ; TAVILL, A. S. ; FERGUSON, R. ; KRAWITT, E. ; BANNER, B. ; BACON, B. R.:

- Iron reduction as an adjuvant to interferon therapy in patients with chronic hepatitis C who have previously not responded to interferon: a multicenter, prospective, randomized, controlled trial. In: *Hepatology* 32 (2000), Nr. 1, S. 135–8
- [23] DIEU, M. C. ; VANBERVLIET, B. ; VICARI, A. ; BRIDON, J. M. ; OLDHAM, E. ; AIT-YAHIA, S. ; BRIERE, F. ; ZLOTNIK, A. ; LEBECQUE, S. ; CAUX, C.: Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. In: *J Exp Med* 188 (1998), Nr. 2, S. 373–86
- [24] DIEU-NOSJEAN, M. C. ; MASSACRIER, C. ; HOMEY, B. ; VANBERVLIET, B. ; PIN, J. J. ; VICARI, A. ; LEBECQUE, S. ; DEZUTTER-DAMBUYANT, C. ; SCHMITT, D. ; ZLOTNIK, A. ; CAUX, C.: Macrophage inflammatory protein 3alpha is expressed at inflamed epithelial surfaces and is the most potent chemokine known in attracting Langerhans cell precursors. In: *J Exp Med* 192 (2000), Nr. 5, S. 705–18
- [25] DIEU-NOSJEAN, M. C. ; VICARI, A. ; LEBECQUE, S. ; CAUX, C.: Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. In: *J Leukoc Biol* 66 (1999), Nr. 2, S. 252–62
- [26] DUBOIS, B. ; BARTHELEMY, C. ; DURAND, I. ; LIU, Y. J. ; CAUX, C. ; BRIERE, F.: Toward a role of dendritic cells in the germinal center reaction: triggering of B cell proliferation and isotype switching. In: *J Immunol* 162 (1999), Nr. 6, S. 3428–36
- [27] DUBOIS, B. ; MASSACRIER, C. ; VANBERVLIET, B. ; FAYETTE, J. ; BRIERE, F. ; BANCHEREAU, J. ; CAUX, C.: Critical role of IL-12 in dendritic cell-induced differentiation of naive B lymphocytes. In: *J Immunol* 161 (1998), Nr. 5, S. 2223–31
- [28] EFRON, P. A. ; TSUJIMOTO, H. ; BAHJAT, F. R. ; UNGARO, R. ; DEBERNARDIS, J. ; TANNAHILL, C. ; BAKER, H. V. ; EDWARDS, C. K. ; MOLDAWER, L. L.: Differential maturation of murine bone-marrow derived dendritic cells with lipopolysaccharide and tumor necrosis factor-alpha. In: *J Endotoxin Res* 11 (2005), Nr. 3, S. 145–60
- [29] EMERIT, J. ; BEAUMONT, C. ; TRIVIN, F.: Iron metabolism, free radicals, and oxidative injury. In: *Biomed Pharmacother* 55 (2001), Nr. 6, S. 333–9
- [30] ESCHE, C. ; LOKSHIN, A. ; SHURIN, G. V. ; GASTMAN, B. R. ; RABINOWICH, H. ; WATKINS, S. C. ; LOTZE, M. T. ; SHURIN, M. R.: Tumor's other immune targets: dendritic cells. In: *J Leukoc Biol* 66 (1999), Nr. 2, S. 336–44
- [31] FAHMY, M. ; YOUNG, S. P.: Modulation of iron metabolism in monocyte cell line U937 by inflammatory cytokines: changes in transferrin uptake, iron handling and ferritin mRNA. In: *Biochem J* 296 (Pt 1) (1993), S. 175–81

- [32] FEDER, J. N. ; GNIRKE, A. ; THOMAS, W. ; TSUCHIHASHI, Z. ; RUDDY, D. A. ; BASAVA, A. ; DORMISHIAN, F. ; DOMINGO, Jr. ; ELLIS, M. C. ; FULLAN, A. ; HINTON, L. M. ; JONES, N. L. ; KIMMEL, B. E. ; KRONMAL, G. S. ; LAUER, P. ; LEE, V. K. ; LOEB, D. B. ; MAPA, F. A. ; MCCLELLAND, E. ; MEYER, N. C. ; MINTIER, G. A. ; MOELLER, N. ; MOORE, T. ; MORIKANG, E. ; PRASS, C. E. ; QUINTANA, L. ; STARNES, S. M. ; SCHATZMAN, R. C. ; BRUNKE, K. J. ; DRAYNA, D. T. ; RISCH, N. J. ; BACON, B. R. ; WOLFF, R. K.: A novel MHC class I-like gene is mutated in patients with hereditary haemochromatosis. In: *Nat Genet* 13 (1996), Nr. 4, S. 399–408
- [33] FEDER, J. N. ; PENNY, D. M. ; IRRINKI, A. ; LEE, V. K. ; LEBRON, J. A. ; WATSON, N. ; TSUCHIHASHI, Z. ; SIGAL, E. ; BJORKMAN, P. J. ; SCHATZMAN, R. C.: The hemochromatosis gene product complexes with the transferrin receptor and lowers its affinity for ligand binding. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Nr. 4, S. 1472–7
- [34] FEDER, J. N. ; TSUCHIHASHI, Z. ; IRRINKI, A. ; LEE, V. K. ; MAPA, F. A. ; MORIKANG, E. ; PRASS, C. E. ; STARNES, S. M. ; WOLFF, R. K. ; PARKKILA, S. ; SLY, W. S. ; SCHATZMAN, R. C.: The hemochromatosis founder mutation in HLA-H disrupts beta2-microglobulin interaction and cell surface expression. In: *J Biol Chem* 272 (1997), Nr. 22, S. 14025–8
- [35] FLEMING, M. D. ; TRENOR, 3rd ; SU, M. A. ; FOERNZLER, D. ; BEIER, D. R. ; DIETRICH, W. F. ; ANDREWS, N. C.: Microcytic anaemia mice have a mutation in Nramp2, a candidate iron transporter gene. In: *Nat Genet* 16 (1997), Nr. 4, S. 383–6
- [36] FOTI, M. ; GRANUCCI, F. ; AGGUJARO, D. ; LIBOI, E. ; LUINI, W. ; MINARDI, S. ; MANTOVANI, A. ; SOZZANI, S. ; RICCIARDI-CASTAGNOLI, P.: Upon dendritic cell (DC) activation chemokines and chemokine receptor expression are rapidly regulated for recruitment and maintenance of DC at the inflammatory site. In: *Int Immunol* 11 (1999), Nr. 6, S. 979–86
- [37] GASQUE, P.: Complement: a unique innate immune sensor for danger signals. In: *Mol Immunol* 41 (2004), Nr. 11, S. 1089–98
- [38] GERLACH, M. ; DOUBLE, K. L. ; BEN-SHACHAR, D. ; ZECCA, L. ; YAUDIM, M. B. ; RIEDERER, P.: Neuromelanin and its interaction with iron as a potential risk factor for dopaminergic neurodegeneration underlying Parkinson's disease. In: *Neurotox Res* 5 (2003), Nr. 1-2, S. 35–44
- [39] GLYNN, A. A.: Lysozyme: antigen, enzyme and antibacterial agent. In: *Sci Basis Med Annu Rev* (1968), S. 31–52
- [40] GOIDIN, D. ; MAMESSIER, A. ; STAQUET, M. J. ; SCHMITT, D. ; BERTHIER-VERGNES, O.: Ribosomal 18S RNA prevails over glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and beta-actin genes as internal standard for quantitative comparison of mRNA levels in invasive and noninvasive human melanoma cell subpopulations. In: *Anal Biochem* 295 (2001), Nr. 1, S. 17–21

- [41] GROUARD, G. ; RISSOAN, M. C. ; FILGUEIRA, L. ; DURAND, I. ; BANCHE-REAU, J. ; LIU, Y. J.: The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. In: *J Exp Med* 185 (1997), Nr. 6, S. 1101–11
- [42] GRUNEBACH, F. ; MULLER, M. R. ; BROSSART, P.: New developments in dendritic cell-based vaccinations: RNA translated into clinics. In: *Cancer Immunol Immunother* 54 (2005), Nr. 6, S. 517–25
- [43] GUMEROV, D. R. ; MASON, A. B. ; KALTASHOV, I. A.: Interlobe communication in human serum transferrin: metal binding and conformational dynamics investigated by electrospray ionization mass spectrometry. In: *Biochemistry* 42 (2003), Nr. 18, S. 5421–8
- [44] GUNSHIN, H. ; MACKENZIE, B. ; BERGER, U. V. ; GUNSHIN, Y. ; ROMERO, M. F. ; BORON, W. F. ; NUSSBERGER, S. ; GOLLAN, J. L. ; HEDIGER, M. A.: Cloning and characterization of a mammalian proton-coupled metal-ion transporter. In: *Nature* 388 (1997), Nr. 6641, S. 482–8
- [45] HARRIS, Z. L. ; DURLEY, A. P. ; MAN, T. K. ; GITLIN, J. D.: Targeted gene disruption reveals an essential role for ceruloplasmin in cellular iron efflux. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 96 (1999), Nr. 19, S. 10812–7
- [46] HARRISON, P. M. ; AROSIO, P.: The ferritins: molecular properties, iron storage function and cellular regulation. In: *Biochim Biophys Acta* 1275 (1996), Nr. 3, S. 161–203
- [47] HENDERSON, B. R. ; MENOTTI, E. ; KUHN, L. C.: Iron regulatory proteins 1 and 2 bind distinct sets of RNA target sequences. In: *J Biol Chem* 271 (1996), Nr. 9, S. 4900–8
- [48] KAKIZAKI, S. ; TAKAGI, H. ; HORIGUCHI, N. ; TOYODA, M. ; TAKAYAMA, H. ; NAGAMINE, T. ; MORI, M. ; KATO, N.: Iron enhances hepatitis C virus replication in cultured human hepatocytes. In: *Liver* 20 (2000), Nr. 2, S. 125–8
- [49] KANG, J. S. ; CHO, D. ; KIM, Y. I. ; HAHM, E. ; KIM, Y. S. ; JIN, S. N. ; KIM, H. N. ; KIM, D. ; HUR, D. ; PARK, H. ; HWANG, Y. I. ; LEE, W. J.: Sodium ascorbate (vitamin C) induces apoptosis in melanoma cells via the down-regulation of transferrin receptor dependent iron uptake. In: *J Cell Physiol* 204 (2005), Nr. 1, S. 192–7
- [50] KAWABATA, H. ; YANG, R. ; HIRAMA, T. ; VUONG, P. T. ; KAWANO, S. ; GOMBART, A. F. ; KOEFFLER, H. P.: Molecular cloning of transferrin receptor 2. A new member of the transferrin receptor-like family. In: *J Biol Chem* 274 (1999), Nr. 30, S. 20826–32
- [51] KEMP, J. D.: Iron deprivation and cancer: a view beginning with studies of monoclonal antibodies against the transferrin receptor. In: *Histol Histopathol* 12 (1997), Nr. 1, S. 291–6

- [52] KISPAL, G. ; SIPOS, K. ; LANGE, H. ; FEKETE, Z. ; BEDEKOVICS, T. ; JANAKY, T. ; BASSLER, J. ; AGUILAR NETZ, D. J. ; BALK, J. ; ROTTE, C. ; LILL, R.: Biogenesis of cytosolic ribosomes requires the essential iron-sulphur protein Rli1p and mitochondria. In: *Embo J* 24 (2005), Nr. 3, S. 589–98
- [53] KOHRGRUBER, N. ; HALANEK, N. ; GROGER, M. ; WINTER, D. ; RAPPERSBERGER, K. ; SCHMITT-EGENOLF, M. ; STINGL, G. ; MAURER, D.: Survival, maturation, and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by cytokines. In: *J Immunol* 163 (1999), Nr. 6, S. 3250–9
- [54] KRAMER, J. L. ; BALTATHAKIS, I. ; ALCANTARA, O. S. ; BOLDT, D. H.: Differentiation of functional dendritic cells and macrophages from human peripheral blood monocyte precursors is dependent on expression of p21 (WAF1/CIP1) and requires iron. In: *Br J Haematol* 117 (2002), Nr. 3, S. 727–34
- [55] KRAUSE, A. ; NEITZ, S. ; MAGERT, H. J. ; SCHULZ, A. ; FORSSMANN, W. G. ; SCHULZ-KNAPPE, P. ; ADERMANN, K.: LEAP-1, a novel highly disulfide-bonded human peptide, exhibits antimicrobial activity. In: *FEBS Lett* 480 (2000), Nr. 2-3, S. 147–50
- [56] LANIER, L. L. ; O’FALLON, S. ; SOMOZA, C. ; PHILLIPS, J. H. ; LINSLEY, P. S. ; OKUMURA, K. ; ITO, D. ; AZUMA, M.: CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. In: *J Immunol* 154 (1995), Nr. 1, S. 97–105
- [57] LAWSON, D. M. ; TREFFRY, A. ; ARTYMIUK, P. J. ; HARRISON, P. M. ; YEWDALL, S. J. ; LUZZAGO, A. ; CESARENI, G. ; LEVI, S. ; AROSIO, P.: Identification of the ferroxidase centre in ferritin. In: *FEBS Lett* 254 (1989), Nr. 1-2, S. 207–10
- [58] LILLIG, C. H. ; BERNDT, C. ; VERGNOLLE, O. ; LONN, M. E. ; HUDEMANN, C. ; BILL, E. ; HOLMGREN, A.: Characterization of human glutaredoxin 2 as iron-sulfur protein: A possible role as redox sensor. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), Nr. 23, S. 8168–73
- [59] LIM, C. J. ; SHEN, W. C.: Transferrin-oligomers as potential carriers in anti-cancer drug delivery. In: *Pharm Res* 21 (2004), Nr. 11, S. 1985–92
- [60] LIN, C. L. ; SURI, R. M. ; RAHDON, R. A. ; AUSTYN, J. M. ; ROAKE, J. A.: Dendritic cell chemotaxis and transendothelial migration are induced by distinct chemokines and are regulated on maturation. In: *Eur J Immunol* 28 (1998), Nr. 12, S. 4114–22
- [61] LIPSCOMB, M. F. ; MASTEN, B. J.: Dendritic cells: immune regulators in health and disease. In: *Physiol Rev* 82 (2002), Nr. 1, S. 97–130

- [62] LIU, L. ; RICH, B. E. ; INOBE, J. ; CHEN, W. ; WEINER, H. L.: A potential pathway of Th2 development during primary immune response. IL-10 pretreated dendritic cells can prime naive CD4+ T cells to secrete IL-4. In: *Adv Exp Med Biol* 417 (1997), S. 375–81
- [63] LIU, X. B. ; YANG, F. ; HAILE, D. J.: Functional consequences of ferroportin 1 mutations. In: *Blood Cells Mol Dis* (2005)
- [64] MCKIE, A. T. ; BARROW, D. ; LATUNDE-DADA, G. O. ; ROLFS, A. ; SAGER, G. ; MUDALY, E. ; MUDALY, M. ; RICHARDSON, C. ; BARLOW, D. ; BOMFORD, A. ; PETERS, T. J. ; RAJA, K. B. ; SHIRALI, S. ; HEDIGER, M. A. ; FARZANEH, F. ; SIMPSON, R. J.: An iron-regulated ferric reductase associated with the absorption of dietary iron. In: *Science* 291 (2001), Nr. 5509, S. 1755–9
- [65] MCKIE, A. T. ; MARCIANI, P. ; ROLFS, A. ; BRENNAN, K. ; WEHR, K. ; BARROW, D. ; MIRET, S. ; BOMFORD, A. ; PETERS, T. J. ; FARZANEH, F. ; HEDIGER, M. A. ; HENTZE, M. W. ; SIMPSON, R. J.: A novel duodenal iron-regulated transporter, IREG1, implicated in the basolateral transfer of iron to the circulation. In: *Mol Cell* 5 (2000), Nr. 2, S. 299–309
- [66] MONTOSI, G. ; DONOVAN, A. ; TOTARO, A. ; GARUTI, C. ; PIGNATTI, E. ; CASSANELLI, S. ; TRENOR, C. C. ; GASPARINI, P. ; ANDREWS, N. C. ; PIETRANGELO, A.: Autosomal-dominant hemochromatosis is associated with a mutation in the ferroportin (SLC11A3) gene. In: *J Clin Invest* 108 (2001), Nr. 4, S. 619–23
- [67] NEMETH, E. ; TUTTLE, M. S. ; POWELSON, J. ; VAUGHN, M. B. ; DONOVAN, A. ; WARD, D. M. ; GANZ, T. ; KAPLAN, J.: Heparin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. In: *Science* 306 (2004), Nr. 5704, S. 2090–3
- [68] NEMETH, E. ; VALORE, E. V. ; TERRITO, M. ; SCHILLER, G. ; LICHTENSTEIN, A. ; GANZ, T.: Heparin, a putative mediator of anemia of inflammation, is a type II acute-phase protein. In: *Blood* 101 (2003), Nr. 7, S. 2461–3
- [69] NICOLAS, G. ; BENNOUN, M. ; PORTEU, A. ; MATIVET, S. ; BEAUMONT, C. ; GRANDCHAMP, B. ; SIRITO, M. ; SAWADOGO, M. ; KAHN, A. ; VAULONT, S.: Severe iron deficiency anemia in transgenic mice expressing liver hepcidin. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 99 (2002), Nr. 7, S. 4596–601
- [70] OATES, P. S. ; MORGAN, E. H.: Effects of dietary iron loading with carbonyl iron and of iron depletion on intestinal growth, morphology, and expression of transferrin receptor in the rat. In: *Anat Rec* 246 (1996), Nr. 3, S. 364–71
- [71] OATES, P. S. ; THOMAS, C. ; MORGAN, E. H.: Transferrin receptor activity and localisation in the rat duodenum. In: *Pflugers Arch* 440 (2000), Nr. 1, S. 116–24

- [72] OLBRICH, H. ; HAFFNER, K. ; KISPERT, A. ; VOLKEL, A. ; VOLZ, A. ; SASMAZ, G. ; REINHARDT, R. ; HENNIG, S. ; LEHRACH, H. ; KONIETZKO, N. ; ZARIWALA, M. ; NOONE, P. G. ; KNOWLES, M. ; MITCHISON, H. M. ; MEEKS, M. ; CHUNG, E. M. ; HILDEBRANDT, F. ; SUDBRAK, R. ; OMRAN, H.: Mutations in DNAH5 cause primary ciliary dyskinesia and randomization of left-right asymmetry. In: *Nat Genet* 30 (2002), Nr. 2, S. 143–4
- [73] OLLILA, J. ; VIHINEN, M.: B cells. In: *Int J Biochem Cell Biol* 37 (2005), Nr. 3, S. 518–23
- [74] PALMER, E.: Negative selection—clearing out the bad apples from the T-cell repertoire. In: *Nat Rev Immunol* 3 (2003), Nr. 5, S. 383–91
- [75] PANTOPOULOS, K.: Iron metabolism and the IRE/IRP regulatory system: an update. In: *Ann N Y Acad Sci* 1012 (2004), S. 1–13
- [76] PARK, C. H. ; VALORE, E. V. ; WARING, A. J. ; GANZ, T.: Hepcidin, a urinary antimicrobial peptide synthesized in the liver. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 11, S. 7806–10
- [77] PARMLEY, R. T. ; BARTON, J. C. ; CONRAD, M. E. ; AUSTIN, R. L. ; HOLLAND, R. M.: Ultrastructural cytochemistry and radioautography of hemoglobin–iron absorption. In: *Exp Mol Pathol* 34 (1981), Nr. 2, S. 131–44
- [78] PHOTHIRATH, P. ; DUPERRIER, K. ; BERNAUD, J. ; DURIEU, D. ; PICOLLET, J. ; BIENVENU, J. ; RIGAL, D.: Generation of monocyte-derived dendritic cells in patients with hereditary hemochromatosis. In: *Clin Immunol* 105 (2002), Nr. 1, S. 93–103
- [79] PICKL, W. F. ; MAJDIC, O. ; KOHL, P. ; STOCKL, J. ; RIEDL, E. ; SCHEINECKER, C. ; BELLO-FERNANDEZ, C. ; KNAPP, W.: Molecular and functional characteristics of dendritic cells generated from highly purified CD14+ peripheral blood monocytes. In: *J Immunol* 157 (1996), Nr. 9, S. 3850–9
- [80] PIGEON, C. ; ILYIN, G. ; COURSELAUD, B. ; LEROYER, P. ; TURLIN, B. ; BRISSOT, P. ; LOREAL, O.: A new mouse liver-specific gene, encoding a protein homologous to human antimicrobial peptide hepcidin, is overexpressed during iron overload. In: *J Biol Chem* 276 (2001), Nr. 11, S. 7811–9
- [81] RAFFIN, S. B. ; WOO, C. H. ; ROOST, K. T. ; PRICE, D. C. ; SCHMID, R.: Intestinal absorption of hemoglobin iron-heme cleavage by mucosal heme oxygenase. In: *J Clin Invest* 54 (1974), Nr. 6, S. 1344–52
- [82] RATTIS, F. M. ; PEGUET-NAVARRO, J. ; STAQUET, M. J. ; DEZUTTER-DAMBUYANT, C. ; COURTELLEMONT, P. ; REDZINIAK, G. ; SCHMITT, D.: Expression and function of B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) on human epidermal Langerhans cells. In: *Eur J Immunol* 26 (1996), Nr. 2, S. 449–53

- [83] RES, P. C. ; COUWENBERG, F. ; VYTH-DREESE, F. A. ; SPITS, H.: Expression of pTalpha mRNA in a committed dendritic cell precursor in the human thymus. In: *Blood* 94 (1999), Nr. 8, S. 2647–57
- [84] RICHARDSON, D. R.: Iron chelators as therapeutic agents for the treatment of cancer. In: *Crit Rev Oncol Hematol* 42 (2002), Nr. 3, S. 267–81
- [85] RICHARDSON, D. R.: Friedreich's ataxia: iron chelators that target the mitochondrion as a therapeutic strategy? In: *Expert Opin Investig Drugs* 12 (2003), Nr. 2, S. 235–45
- [86] ROETTO, A. ; PAPANIKOLAOU, G. ; POLITOU, M. ; ALBERTI, F. ; GIRELLI, D. ; CHRISTAKIS, J. ; LOUKOPOULOS, D. ; CAMASCHELLA, C.: Mutant antimicrobial peptide hepcidin is associated with severe juvenile hemochromatosis. In: *Nat Genet* 33 (2003), Nr. 1, S. 21–2
- [87] ROHRLICH, P. S. ; FAZILLEAU, N. ; GINHOUX, F. ; FIRAT, H. ; MICHEL, F. ; COCHET, M. ; LAHAM, N. ; ROTH, M. P. ; PASCOLO, S. ; NATO, F. ; COPPIN, H. ; CHARNEAU, P. ; DANOS, O. ; ACUTO, O. ; EHRLICH, R. ; KANELLOPOULOS, J. ; LEMONNIER, F. A.: Direct recognition by alphabeta cytolytic T cells of Hfe, a MHC class Ib molecule without antigen-presenting function. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 102 (2005), Nr. 36, S. 12855–60
- [88] ROMANI, N. ; GRUNER, S. ; BRANG, D. ; KAMPGEN, E. ; LENZ, A. ; TROCKENBACHER, B. ; KONWALINKA, G. ; FRITSCH, P. O. ; STEINMAN, R. M. ; SCHULER, G.: Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. In: *J Exp Med* 180 (1994), Nr. 1, S. 83–93
- [89] ROSICARELLI, B. ; SERAFINI, B. ; SBRICCOLI, M. ; LU, M. ; CARDONE, F. ; POCCHIARI, M. ; ALOISI, F.: Migration of dendritic cells into the brain in a mouse model of prion disease. In: *J Neuroimmunol* (2005)
- [90] ROTIG, A. ; LONLAY, P. de ; CHRETIEN, D. ; FOURY, F. ; KOENIG, M. ; SIDI, D. ; MUNNICH, A. ; RUSTIN, P.: Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. In: *Nat Genet* 17 (1997), Nr. 2, S. 215–7
- [91] RUPPERT, J. ; SCHUTT, C. ; OSTERMEIER, D. ; PETERS, J. H.: Down-regulation and release of CD14 on human monocytes by IL-4 depends on the presence of serum or GM-CSF. In: *Adv Exp Med Biol* 329 (1993), S. 281–6
- [92] 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. In: *J Exp Med* 179 (1994), Nr. 4, S. 1109–18
- [93] SALLUSTO, F. ; LANZAVECCHIA, A.: Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. In: *Immunol Rev* 177 (2000), S. 134–40

- [94] SALLUSTO, F. ; SCHAERLI, P. ; LOETSCHER, P. ; SCHANIEL, C. ; LENIG, D. ; MACKAY, C. R. ; QIN, S. ; LANZAVECCHIA, A.: Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. In: *Eur J Immunol* 28 (1998), Nr. 9, S. 2760–9
- [95] SIEGAL, F. P. ; KADOWAKI, N. ; SHODELL, M. ; FITZGERALD-BOCARSLY, P. A. ; SHAH, K. ; HO, S. ; ANTONENKO, S. ; LIU, Y. J.: The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. In: *Science* 284 (1999), Nr. 5421, S. 1835–7
- [96] SORG, R. V. ; KOGLER, G. ; WERNET, P.: Identification of cord blood dendritic cells as an immature CD11c- population. In: *Blood* 93 (1999), Nr. 7, S. 2302–7
- [97] SOZZANI, S. ; ALLAVENA, P. ; D’AMICO, G. ; LUINI, W. ; BIANCHI, G. ; KATAURA, M. ; IMAI, T. ; YOSHIE, O. ; BONECCHI, R. ; MANTOVANI, A.: Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. In: *J Immunol* 161 (1998), Nr. 3, S. 1083–6
- [98] SOZZANI, S. ; ALLAVENA, P. ; VECCHI, A. ; MANTOVANI, A.: The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking. In: *J Leukoc Biol* 66 (1999), Nr. 1, S. 1–9
- [99] SOZZANI, S. ; SALLUSTO, F. ; LUINI, W. ; ZHOU, D. ; PIEMONTE, L. ; ALLAVENA, P. ; VAN DAMME, J. ; VALITUTTI, S. ; LANZAVECCHIA, A. ; MANTOVANI, A.: Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. In: *J Immunol* 155 (1995), Nr. 7, S. 3292–5
- [100] STEINMAN, R. M. ; ADAMS, J. C. ; COHN, Z. A.: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. In: *J Exp Med* 141 (1975), Nr. 4, S. 804–20
- [101] STEINMAN, R. M. ; COHN, Z. A.: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. In: *J Exp Med* 137 (1973), Nr. 5, S. 1142–62
- [102] STEINMAN, R. M. ; COHN, Z. A.: Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. In: *J Exp Med* 139 (1974), Nr. 2, S. 380–97
- [103] STEINMAN, R. M. ; SWANSON, J.: The endocytic activity of dendritic cells. In: *J Exp Med* 182 (1995), Nr. 2, S. 283–8
- [104] SZALAI, A. J. ; GINKEL, F. W. ; WANG, Y. ; MCGHEE, J. R. ; VOLANAKIS, J. E.: Complement-dependent acute-phase expression of C-reactive protein and serum amyloid P-component. In: *J Immunol* 165 (2000), Nr. 2, S. 1030–5
- [105] TEW, J. G. ; WU, J. ; QIN, D. ; HELM, S. ; BURTON, G. F. ; SZAKAL, A. K.: Follicular dendritic cells and presentation of antigen and costimulatory signals to B cells. In: *Immunol Rev* 156 (1997), S. 39–52

- [106] THIEME, Verlag: *Innere Medizin*. Bd. 6. 1999
- [107] THOMSON, A. M. ; ROGERS, J. T. ; LEEDMAN, P. J.: Iron-regulatory proteins, iron-responsive elements and ferritin mRNA translation. In: *Int J Biochem Cell Biol* 31 (1999), Nr. 10, S. 1139–52
- [108] TORTI, S. V. ; KWAK, E. L. ; MILLER, S. C. ; MILLER, L. L. ; RINGOLD, G. M. ; MYAMBO, K. B. ; YOUNG, A. P. ; TORTI, F. M.: The molecular cloning and characterization of murine ferritin heavy chain, a tumor necrosis factor-inducible gene. In: *J Biol Chem* 263 (1988), Nr. 25, S. 12638–44
- [109] TURLEY, S. J. ; INABA, K. ; GARRETT, W. S. ; EBERSOLD, M. ; UNTERNAEHRER, J. ; STEINMAN, R. M. ; MELLMAN, I.: Transport of peptide-MHC class II complexes in developing dendritic cells. In: *Science* 288 (2000), Nr. 5465, S. 522–7
- [110] UMBREIT, J. N. ; CONRAD, M. E. ; HAINSWORTH, L. N. ; SIMOVICH, M.: The ferrireductase paraferitin contains divalent metal transporter as well as mobilferrin. In: *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 282 (2002), Nr. 3, S. G534–9
- [111] UMBREIT, J. N. ; CONRAD, M. E. ; MOORE, E. G. ; DESAI, M. P. ; TURRENS, J.: Paraferitin: a protein complex with ferrireductase activity is associated with iron absorption in rats. In: *Biochemistry* 35 (1996), Nr. 20, S. 6460–9
- [112] VAHDATI-BEN ARIEH, S. ; LAHAM, N. ; SCHECHTER, C. ; YEWDELL, J. W. ; COLIGAN, J. E. ; EHRLICH, R.: A single viral protein HCMV US2 affects antigen presentation and intracellular iron homeostasis by degradation of classical HLA class I and HFE molecules. In: *Blood* 101 (2003), Nr. 7, S. 2858–64
- [113] VECCHI, A. ; MASSIMILIANO, L. ; RAMPONI, S. ; LUINI, W. ; BERNASCONI, S. ; BONECCHI, R. ; ALLAVENA, P. ; PARMENTIER, M. ; MANTOVANI, A. ; SOZZANI, S.: Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. In: *J Leukoc Biol* 66 (1999), Nr. 3, S. 489–94
- [114] VULPE, C. D. ; KUO, Y. M. ; MURPHY, T. L. ; COWLEY, L. ; ASKWITH, C. ; LIBINA, N. ; GITSCHIER, J. ; ANDERSON, G. J.: Hephaestin, a ceruloplasmin homologue implicated in intestinal iron transport, is defective in the sla mouse. In: *Nat Genet* 21 (1999), Nr. 2, S. 195–9
- [115] WALLET, M. A. ; SEN, P. ; TISCH, R.: Immunoregulation of dendritic cells. In: *Clin Med Res* 3 (2005), Nr. 3, S. 166–75
- [116] WANG, Y. B.: Antibacterial mechanisms of lysozyme on *Streptococcus mutans*. In: *Zhonghua Ya Yi Xue Hui Za Zhi* 9 (1990), Nr. 3, S. 87–97
- [117] WEINSTEIN, D. A. ; ROY, C. N. ; FLEMING, M. D. ; LODA, M. F. ; WOLFS-DORF, J. I. ; ANDREWS, N. C.: Inappropriate expression of hepcidin is associated with iron refractory anemia: implications for the anemia of chronic disease. In: *Blood* 100 (2002), Nr. 10, S. 3776–81

- [118] WEISS, G.: Pathogenesis and treatment of anaemia of chronic disease. In: *Blood Rev* 16 (2002), Nr. 2, S. 87–96
- [119] WEST, Jr. ; BENNETT, M. J. ; SELLERS, V. M. ; ANDREWS, N. C. ; ENNS, C. A. ; BJORKMAN, P. J.: Comparison of the interactions of transferrin receptor and transferrin receptor 2 with transferrin and the hereditary hemochromatosis protein HFE. In: *J Biol Chem* 275 (2000), Nr. 49, S. 38135–8
- [120] WONG, A. ; YANG, J. ; CAVADINI, P. ; GELLERA, C. ; LONNERDAL, B. ; TARONI, F. ; CORTOPASSI, G.: The Friedreich's ataxia mutation confers cellular sensitivity to oxidant stress which is rescued by chelators of iron and calcium and inhibitors of apoptosis. In: *Hum Mol Genet* 8 (1999), Nr. 3, S. 425–30
- [121] WRIGHT, A. C. ; SIMPSON, L. M. ; OLIVER, J. D.: Role of iron in the pathogenesis of *Vibrio vulnificus* infections. In: *Infect Immun* 34 (1981), Nr. 2, S. 503–7
- [122] WYLLIE, J. C. ; KAUFMAN, N.: An electron microscopic study of heme uptake by rat duodenum. In: *Lab Invest* 47 (1982), Nr. 5, S. 471–6
- [123] YOKOZEKI, H. ; KATAYAMA, I. ; OHKI, O. ; MATSUNAGA, T. ; WATANABE, K. ; SATOH, T. ; AZUMA, M. ; OKUMURA, K. ; NISHIOKA, K.: Functional CD86 (B7-2/B70) on cultured human Langerhans cells. In: *J Invest Dermatol* 106 (1996), Nr. 1, S. 147–53
- [124] ZHANG, A. S. ; SHEFTEL, A. D. ; PONKA, P.: Intracellular kinetics of iron in reticulocytes: evidence for endosome involvement in iron targeting to mitochondria. In: *Blood* 105 (2005), Nr. 1, S. 368–75
- [125] ZHOU, X. Y. ; TOMATSU, S. ; FLEMING, R. E. ; PARKKILA, S. ; WAHEED, A. ; JIANG, J. ; FEI, Y. ; BRUNT, E. M. ; RUDDY, D. A. ; PRASS, C. E. ; SCHATZMAN, R. C. ; O'NEILL, R. ; BRITTON, R. S. ; BACON, B. R. ; SLY, W. S.: HFE gene knockout produces mouse model of hereditary hemochromatosis. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 95 (1998), Nr. 5, S. 2492–7
- [126] ZOLLER, H. ; KOCH, R. O. ; THEURL, I. ; OBRIST, P. ; PIETRANGELO, A. ; MONTOSI, G. ; HAILE, D. J. ; VOGEL, W. ; WEISS, G.: Expression of the duodenal iron transporters divalent-metal transporter 1 and ferroportin 1 in iron deficiency and iron overload. In: *Gastroenterology* 120 (2001), Nr. 6, S. 1412–9

8 Abkürzungsverzeichnis

2F5	anti-HFE-Antikörper
BSA	<i>Bovine-Serum-Albumine</i>
C	<i>Complement-Factor</i>
CCR	Chemokinrezeptor
CCXR	Chemokinrezeptor
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary Deoxyribonucleic-Acid</i> , durch reverse Transkription aus RNA gewonnene DNA
C_T	<i>Threshold-Cycle</i> : Zyklus, in dem in der qRT-PCR die Fluoreszenz den Schwellenwert übersteigt
Dcytb	Cytochrome-b ähnliche Ferrireduktase
DMT1	<i>Divalent-Metal-Transporter-1</i>
DNA	<i>Deoxyribonucleic-Acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DPBS	<i>Dulbecco's-Phosphate-Buffered-Saline</i>
EDTA	<i>Ethylenediaminetetraacetic-Acid</i> , Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked-Immunsorbent-Assay</i>
FACS	<i>Fluorescence-Activated-Cell-Sorting</i>
FCS	<i>Fetal-Calf-Serum</i>
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
Fp1	<i>Ferroportin-1</i>
FSC	<i>Forward-Scatter</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte/Macrophage Colony-Stimulating-Factor</i>
HFE	Hämochromatose-Gen, Kontrollfunktion für Transferrinrezeptor-1
HIV	<i>Human-Immunodeficiency-Virus</i>
iDZ	interstitielle Dendritische Zellen
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IRE	<i>Iron-Responsive-Element</i>
IRP	<i>Iron-Responsive-Protein</i>
LHZ	Langerhanszellen

LPS	Lipopolysaccharid
LSM	<i>Laser-Scanning-Microscope</i>
MACS	<i>Magnetic-Cell-Sorting</i>
MHC	<i>Major-Histocompatibility-Complex</i>
mRNA	<i>messenger Ribonucleic-Acid</i> , Boten-Ribonukleinsäure
OD	optische Dichte
PBS	<i>Phosphate-Buffered-Saline</i>
PCR	<i>Polymerase-Chain-Reaction</i> , Polymerase-Kettenreaktion
pDZ	plasmazytoide Dendritische Zellen
pH	<i>pondus Hydrogenii</i>
qRT-PCR	<i>quantitative Realtime-Polymerase-Chain-Reaction</i>
RNA	<i>Ribonucleic-Acid</i> , Ribonukleinsäure
SSC	<i>Side-Scatter</i>
SYBR	<i>Synergy Brands, Inc</i>
TfR1	Transferrinrezeptor-1
TfR2	Transferrinrezeptor-2
TLR	<i>Toll-like-receptor</i>
TNF- α	<i>Tumor-Necrosis-Factor-α</i>

9 Publikation

Aus dieser Arbeit hervorgegangene Veröffentlichung:

Brinkmann, M. ; Teuffel, R. ; Laham, N. ; Ehrlich, R. ; Decker, P. ; Lemonnier, F.A. ; Pascolo, S. : Expression of iron transport proteins divalent metal transporter-1, Ferroportin-1, HFE and transferrin receptor-1 in human monocyte-derived dendritic cells. In: Cell Biochem Funct. 2006 Aug 22; (Epub ahead of print)

10 Danksagung

Herzlich möchte ich mich bei denen bedanken, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben:

Herrn Prof. Dr. Hans-Georg Rammensee für die Überlassung des Themas, der sehr guten Unterstützung sowie der hervorragenden Möglichkeiten des Labors.

Herrn Dr. Steve Pascolo gilt ein besonderer Dank für die Idee der Arbeit, einer konsequenten und sehr guten Betreuung mit vielen Hilfestellungen und Geduld während der gesamten Zeit.

Patrice für die Bereitstellung Dendritischer Zellen in der Anfangsphase und das Erlernen der Zellkultur.

Birgid und Regina für die Hilfe bei den ELISA-Analysen.

Allen im Labor, die mir bei der Erarbeitung der Methoden geholfen haben, vor allem Olli mit Hilfen zur quantitativen Echtzeit-PCR.

Jochen für die vielen beantworteten Fragen und gutem Ausgleich während langer Labortage.

Manfred für die Unterstützung bei statistischen Fragen und Latex2e.

Handan für die Ruhe auch in anstrengenden Phasen.

Meinen Eltern, die mich während des gesamten Medizinstudiums unterstützt haben.

11 Lebenslauf

Persönliche Daten

Martin Brinkmann

geb. am 06. 11. 1976 in Köln

ledig

deutsch

Schulbildung

1984–1996 schulische Ausbildung mit Abschluss Abitur am Theodor-Heuss-Gymnasium Göttingen

Wehrersatzdienst

09/96–09/97 Zivildienst im Blindenheim Freiburg auf der Altenpflegestation

Studium

WS97/98–SS98 Studium der Biologie an der Universität Freiburg

WS98–SS05 Studium der Medizin an den Universitäten Rostock, Freiburg und Tübingen

14.09.2000 Ärztliche Vorprüfung

21.03.2002 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

06.04.2004 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

27.04.2005 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

Praktisches Jahr

04.04–08.04 Kinderklinik des Städtischen Krankenhauses Friedrichshafen

08.04–12.04 Abteilung für Chirurgie am Hospital San Gabriel, La Paz, Bolivien

12.04–03.05 Abteilung für Innere Medizin des Städtischen Krankenhauses
Friedrichshafen

Berufliche Laufbahn

seit 10/05 Assistenzarzt in der Kinderklinik Böblingen

Tübingen, 12. Februar 2006