
Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
(Department) Tübingen
Abteilung Innere Medizin II
(Schwerpunkt: Onkologie, Hämatologie, klinische Immunologie,
Rheumatologie)
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

Die Bedeutung der Phosphatidyl-Inositol-3- Kinase auf Wachstum und Differenzierung von dendritischen Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Caroline Renate Becker
aus
Böblingen
2008

Dekan: Prof. Dr. med. I.B. Autenrieth
1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. P. Brossart
2. Berichterstatter: Dr. H. Salih





meinen lieben Eltern Renate und Thomas Becker

INHALTSVERZEICHNIS

1. Einleitung	8
1.1 Das Immunsystem	8
1.1.1 Das angeborene Immunsystem	9
1.1.2 Das adaptive Immunsystem	9
1.1.3 Die Zellen des adaptiven Immunsystems	10
1.1.4 Antigenpräsentierende Zellen (APC)	12
1.1.5 Dendritische Zellen	13
1.2 Apoptose	14
1.2.1 Der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase Signalweg	16
1.2.2 Der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase Inhibitor LY294002	18
1.3 Toll-like Rezeptoren	19
1.3.1 Die Signalwege der TLR	21
1.3.1.1 MyD88 abhängige Signaltransduktion	22
1.3.1.2 MyD88 unabhängige Signaltransduktion	23
1.3.2 Der Toll-like Rezeptor 2 und sein Ligand Pam ₃ Cys	24
1.3.2 Der Toll-like Rezeptor 3 und sein Ligand Poly I:C	24
1.3.4 Der Toll-like Rezeptor 4 und sein Ligand LPS	24
1.3.5 Der Toll-like Rezeptor 7 und sein Ligand R 848	25
1.4 Zielsetzung	26
2. Material	27
2.1 Geräte	27
2.2 Verbrauchsmaterialien	28
2.3 Reagenzien	31
2.3.1 Antikörper	31
2.3.1.1 Antikörper für Western Blots	31
2.3.1.2 Antikörper für FACS Analyse	31
2.3.2 Chemikalien	32
2.3.3 Kits	34
2.3.4 Medien und Antibiotika	35
2.3.5 Puffer und Lösungen	36

3. Methoden	39
3.1 Zellkultur	39
3.1.1 Kultivierung von Zellen	39
3.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl	39
3.1.3 Kryokonservierung von Zellen	40
3.1.4 Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes	40
3.1.5 <i>Ex-vivo</i> Generierung von DC	41
3.2 Durchflusszytometrie/FACS Analyse	43
3.2.1. Aufbau und Funktion eines Durchflusszytometers	43
3.2.2 Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern	44
3.3 Messung der Apoptoserate nach Nicoletti	44
3.4 MLR (mixed lymphocyte reaction)	45
3.5 Migration	46
3.6 Kernextrakte	47
3.7 Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE	48
3.7.1 Western Blot	49
3.8 Stripping	50
4. Ergebnisse	52
4.1.1 Ansetzen der Versuche mit LY294002 und TLR-Liganden	52
4.1.2 Die Rolle von GM-CSF und IL-4 bei der Generierung der DC	53
4.2 Die Auswirkung von LY294002 auf die Reifung der mit TLR-Liganden stimulierten DC	54
4.3 LY 294002 induziert Apoptose bei DC	59
4.4 LY294002 inhibiert die Migrationsfähigkeit von dendritischen Zellen	60
4.5 LY294002 reduziert die allo-stimulatorische Fähigkeit von DC	62
4.6 Die Wirkung von LY294002 auf intrazelluläre Signalwege	63
4.6.1 LY294002 blockiert die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren	63
5. Diskussion	67
6. Zusammenfassung	73
7. Abkürzungsverzeichnis	75
8. Literaturverzeichnis	78

9. Danksagung	88
10. Lebenslauf	89

Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das Immunsystem beinhaltet alle Mechanismen, die bei der Erkennung und Elimination von Pathogenen mitwirken und so den Organismus vor Krankheiten schützen.

Man unterscheidet dabei zwei eng miteinander verbundene Systeme, das angeborene und das erworbene (adaptive) Immunsystem.

Das angeborene Immunsystem, reagiert beim ersten Eindringen eines Pathogens in den Organismus sofort, wirkt aber sehr unspezifisch.

Überwindet der Erreger diese erste Barriere, so beginnt das hochentwickelte adaptive Immunsystem zu wirken.

1.1.1 Das angeborene Immunsystem

Das evolutionär gesehen ältere angeborene Immunsystem besteht aus verschiedenen Komponenten, zu denen zum Beispiel der Säuremantel der Haut, eine intakte Epidermis, die Zilienbewegung der Schleimhäute, die kommensalen Bakterien oder der Tränenfilm gehören. Zellulär zählen vor allem Phagozyten, wie Monozyten, Makrophagen, Granulozyten und natürliche Killerzellen (NK), zum angeborenen Immunsystem. Zu den humoralen Faktoren, die die angeborene Immunantwort unterstützen, zählen die Akute-Phase Proteine, Zytokine, Enzyme und das Komplementsystem.

Durchbricht ein Erreger die erste Schranke, die aus Haut und Schleimhaut besteht, und dringt in den Organismus ein, so reagiert das angeborene Immunsystem sofort und schnell.

Dabei ist es in der Lage Schlüssel-moleküle auf Pathogenen zu erkennen (*pathogen associated molecular patterns PAMPs*). Dazu zählen zum Beispiel LPS, Peptidoglykane, Lipoteichonsäure und Glykane. Diese werden über spezielle Rezeptoren, sogenannte PRR auf Phagozyten, wie z.B. Makrophagen

oder neutrophile Granulozyten, erkannt. (Aderem und Ulevitch 2000) Zu den PRR zählen z.B. die TLR-Liganden, der Mannose-Rezeptor, der v.a. bei Makrophagen vorkommt und an konservierte Mannose reiche Kohlehydrate auf Bakterien und einigen Viren bindet und so zur Phagozytose führt. (Aderem und Underhill 1999) Auch Scavenger-Rezeptoren wie CD36 und CD91 gehören zu den PRR. Sie erkennen bestimmte anionische Polymere und acetylierte low-density Lipoproteine. (Febbraio et al. 2001)

Auch das aus verschiedenen Plasmaproteinen bestehende Komplementsystem ist in der Lage eingedrungene Erreger zu eliminieren, indem es an die Pathogene bindet und diese lysiert. Schließlich werden die lysierten Mikroorganismen phagozytiert.

Die Bedeutung der Zytokine, die beim Eindringen von Erregern von verschiedenen Zellen sezerniert werden, liegt vor allem darin, Zellen des adaptiven Immunsystems anzulocken und zu aktivieren.

Sie werden vor allem von Makrophagen und NK sezerniert. Zu den wichtigsten inflammatorischen Zytokinen zählen $\text{TNF}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-12 und IFN.

Außerdem hemmen Zytokine das Wachstum der Pathogene und sind an der Akute-Phase-Reaktion beteiligt. Unter der Akute-Phase-Reaktion versteht man eine Allgemeinreaktion des Organismus im Rahmen einer Entzündung. Bei der Akute-Phase-Reaktion kommt es zu Fieber, Leukozytose und zur Produktion von Akute-Phase-Proteine (wie z.B. C-reaktives Protein, Fibrinogen und Alpha-1-Antitrypsin)

Das angeborene Immunsystem wirkt von den ersten Stunden bis zu sieben Tagen nach erfolgter Infektion. Nach dieser Zeit ist das adaptive Immunsystem bereit, bei der Immunantwort mitzuwirken.

1.1.2 Das adaptive Immunsystem

Das adaptive Immunsystem, das nur bei Wirbeltieren vorkommt, lässt sich wiederum in eine zelluläre und eine humorale (humor, lat.:Flüssigkeit) Komponente unterteilen. Effektorzellen der humoralen Immunsystems sind die

B-Lymphozyten, wohingegen die T-Lymphozyten zur zellulären Abwehr zählen. Das adaptive Immunsystem zeichnet sich durch Antigen-spezifität, einem Gedächtnis und einer Selbst-Fremd-Erkennung aus. Im Gegensatz zum angeborenen Immunsystem wirkt es spezifisch gegen Antigene.

Am Beginn des adaptiven Immunsystems steht die Aufnahme und Prozessierung eines Antigens durch die Antigen-präsentierenden Zellen (APC).

1.1.3 Die Zellen des adaptiven Immunsystems

Die T-Lymphozyten, die aus dem Knochenmark stammen, wandern in einer noch unreifen Form in den Thymus und reifen dort aus.

Dabei entwickeln sich zwei verschiedene Subtypen: Die CD4⁺-Zellen und die CD8⁺-Zellen, die sich durch unterschiedliche Oberflächenmoleküle auszeichnen.

Die CD4⁺-Zellen lassen sich wiederum in die T_H1-Effektorzellen und die T_H2-Helferzellen unterteilen. Welcher der beiden Untertypen sich entwickelt, hängt vom Zytokinmilieu während der Differenzierung ab.

T_H1-Zellen produzieren IFN γ und induzieren die zelluläre Immunantwort, indem sie vor allem Makrophagen aktivieren. T_H2 Zellen zeichnen sich vor allem durch die Produktion von IL-4 und IL-5 aus und vermitteln die humorale Immunantwort.

Inzwischen konnte weitere Subpopulationen charakterisiert werden. Regulatorische T-Zellen (CD25⁺, FOXP3⁺) inhibieren Immunantworten und spielen eine wichtige Rolle bei der Unterdrückung von Autoimmunprozessen. Sie sezernieren unter anderem IL-10 und TGF- β . TH 17 Zellen führen zu inflammatorischen Reaktionen und produzieren IL-17

Die CD8⁺-Zellen wirken als zytotoxische T-Lymphozyten (CTL), indem sie v.a. virusinfizierte Zellen eliminieren. Dies geschieht durch das sog. Perforin, ein membranschädigendes Protein, das Poren in den pathogenen Zellen bildet, durch Sezernieren von Granzymen, die intrazellulär als Proteasen agieren, und durch den Fas Ligand (CD95L), der an den Todesrezeptor (CD95) bindet. All

diese Mechanismen wirken Apoptose induzierend auf pathogene oder infizierte Zellen. Die T-Zellen können weiterhin in effector und memory Zellen subtypisiert werden. Die T-Zellen können weiter in effector und memory Zellen unterteilt werden.

Die Aktivierung der im Blut zirkulierenden T-Lymphozyten erfolgt dabei über antigenpräsentierende Zellen (APC), die das Antigen gebunden an MHC-Moleküle zusammen mit kostimulatorischen Molekülen auf der Oberfläche präsentieren.

CD8⁺-Zellen erkennen Peptide aus 8 – 10 Aminosäuren auf MHC I-Molekülen, die auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert werden. CD4⁺-Zellen erkennen Antigene wenn sie auf MHC II-Moleküle präsentiert werden.

Bei den kostimulatorischen Molekülen handelt es sich um eine Interaktion des CD28 Oberflächenmoleküls auf T-Lymphozyten, mit B7 Molekülen auf APC. Nach Aktivierung werden sowohl bei den T-Lymphozyten als auch bei den APC verschiedene Signalmoleküle, wie zum Beispiel CD40-L und CD40, vermehrt exprimiert. Dies führt zur weiteren Aktivierung der APC und zur vermehrten Zytokinproduktion.

Durch die Aktivierung der T-Lymphozyten beginnt die klonale Expansion (Proliferation), und die T-Zellen reifen zu CD4⁺-Effektorzellen. Zusätzlich kommt es zur Sekretion von Zytokinen.

Die humorale Immunantwort dient dazu, Toxine oder extrazelluläre Bakterien zu bekämpfen. Daran beteiligt sind T-Helferzellen und B-Lymphozyten.

Die ebenfalls aus dem Knochenmark stammenden B-Lymphozyten sind für die Antikörperproduktion zuständig. Die Stimulation zur Antikörperproduktion erfolgt dabei über im Organismus zirkulierende Antigene, die von den B-Lymphozyten endozytiert, prozessiert und schließlich über MHC II-Moleküle auf der Oberfläche der B-Lymphozyten präsentiert werden. Dort werden diese Peptide über MHC II-Moleküle T-Helferzellen präsentiert, die wiederum die B-Lymphozyten aktivieren und so ihre Differenzierung in eine Antikörper sezernierende Plasmazelle unterstützen.

Die B-Lymphozyten benötigen drei Anreize um aktiviert zu werden: erstens ein Antigen, das den B-Zellrezeptor kreuzvernetzt, zweitens die T-Helferzelle, die

Peptid-Fragmente spezifisch auf MHC II-Molekülen an der B-Zelloberfläche erkennt, und drittens die Bindung von CD40-L. Dabei bindet CD40-L der T-Helferzelle an CD40 des B-Lymphozyten. Dies bewirkt eine Stimulation der T-Helferzelle und führt zu einem Anstieg der IL-4 Produktion. Durch die IL-4 Produktion proliferieren die B-Zellen stark und entwickeln sich zu Plasmazellen, die Antikörper sezernieren und Antigene opsonisieren. Die Opsonisierung erfolgt durch verschiedene Antikörper wie IgG, IgA, IgM. Durch die Bindung der Antikörper werden Antigene neutralisiert, komplement aktiviert oder Phagozyten die Antigen-Aufnahme ermöglicht.

Nach Eliminierung des Krankheitserregers im Rahmen der Immunantwort muss die Anzahl der T-Lymphozyten drastisch reduziert werden, das heißt es muss wieder eine Homöostase hergestellt werden.

Die meisten Zellen werden dabei durch den sog. AICD (*activation-induced cell-death*) deaktiviert; dabei handelt es sich um Apoptose, die durch Interaktion mit Fas und Fas Ligand vermittelt wird. (Budd 2001)

Einige wenige CD4⁺-Helferzellen und CD8⁺-Zellen verbleiben jedoch als Gedächtniszellen. Sie zirkulieren oft jahrelang im Organismus, um bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Antigen noch schneller eine wirksame sekundäre Immunantwort auslösen zu können. (Tanchot et al. 1997)

1.1.4 Antigenpräsentierende Zellen (APC)

Die meisten Körperzellen besitzen die Eigenschaft Antigene zu präsentieren, um bei einer Infektion oder einer tumorartigen Veränderung vom Immunsystem erkannt zu werden. Zu den so genannten „professionellen“ APC des Immunsystems zählen jedoch nur dendritische Zellen, Makrophagen und B-Lymphozyten.

Diese besitzen die Eigenschaft, eingedrungene Pathogene aufzunehmen, zu prozessieren und die dabei entstandenen Peptidfragmente über MHC-Moleküle zu präsentieren, was dann schließlich zur Aktivierung der T-Lymphozyten führt.

1.1.5 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen wurden zum ersten Mal von Steinman *et al* (Steinman und Cohn 1973) im Jahre 1973 bei Untersuchungen von Milzen von Mäusen entdeckt und als neuer Zelltyp beschrieben. In weiteren Untersuchungen fanden Schuler *et al* (Schuler et al. 1985) jedoch heraus, dass dendritische Zellen phänotypisch und morphologisch den damals bereits bekannten Langerhans Zellen der Haut entsprechen und beide zu den antigenpräsentierenden Zellen (APC) gehören.

Dendritische Zellen werden *in vivo* als CD34⁺ Progenitorzellen im Knochenmark gebildet und wandern als unreife Zellen über den Blutweg in fast alle peripheren Gewebe, wo sie eine Art Netzwerk bilden und ihre Umgebung kontrollieren. Dabei unterscheiden sich die unreifen von den reifen DC vor allem in zwei Kriterien: Zum einen können sie Antigene aufnehmen und zum anderen besitzen sie eine verminderte kostimulatorische Aktivität.

Bei Kontakt der unreifen DC mit inflammatorischen Stimuli (wie z.B. verschiedene Toll-like-Rezeptor-Liganden) werden diese aktiviert und wandern zu den lymphatischen Organen, wo es zur Reifung der Zellen kommt, das heißt, sie können keine Antigene mehr aufnehmen, jedoch kostimulatorisch aktiv sein. (Banchereau und Steinman 1998) Des Weiteren rekrutieren sie an ihrer Oberfläche vermehrt peptidbeladene MHC I- und MHC II-Moleküle sowie andere Oberflächenmoleküle (CD86, CD80, CD83) und es kommt zur verstärkten Zytokinproduktion (z.B. IL-12). (Sharpe und Freeman 2002)

Die reifen DC spielen also bei der Verknüpfung von angeborenem und adaptivem Immunsystem eine wichtige Rolle, da sie als die potentesten professionellen APC Antigene aufnehmen, prozessieren und naive T-Zellen aktivieren. (Liu 2001; Guermonprez et al. 2002).

Die T-Zellen, die durch ihren TCR für jeweils ein Antigen spezifisch sind, suchen die Oberfläche der DC nach präsentierten antigenen Epitopen ab. Dabei erkennen die CD8⁺-Zellen Antigene, die über MHC I-Moleküle präsentiert werden, wohingegen die CD4⁺ T-Helferzellen Antigene erkennen, die über MHC II-Moleküle präsentiert werden. Abhängig von ihrer Differenzierung können die

T-Helferzellen sowohl die B-Zell vermittelte humorale Immunantwort über T_H2-Helferzellen als auch die CTL-vermittelte zelluläre Immunantwort über T_H1-Effektorzellen aktivieren. Mit Hilfe der sog. „Kreuzpräsentation“ sind DC in der Lage, Determinanten von aufgenommenen exogenen Antigenen auf MHC I-Molekülen den CTL zu präsentieren und diese zu aktivieren. Diese TCR-MHC Bindung bildet die Grundvoraussetzung für die Aktivierung einer T-Zelle. Des Weiteren können T-Zellen über kostimulatorische Moleküle wie CD80 und CD86 aktiviert werden. Auch Zytokine sind in der Lage das funktionelle Profil der T-Zelle zu beeinflussen.

In vitro lassen sich dendritische Zellen auch aus CD14⁺ Monozyten bei Zugabe von IL-4 und GM-CSF züchten. DC können durch proinflammatorische Zytokine wie zum Beispiel CD40- Ligand, TNF α , und IL-1, durch Bakterienbestandteile wie z.B. LPS (Flores-Romo et al. 1997), durch synthetische Substanzen wie z.B. das synthetische dsRNA-Analogon PolyI:C oder synthetische Imidazoquinolone zur Reifung stimuliert werden. (Edwards et al. 2003; Wang et al. 2004)

1.2 Apoptose

Apoptose (griechisch von „apo“ -„weg“ und „ptosis“ -„Fall“, wie das Fallen der Blätter im Herbst) beschreibt den programmierten Zelltod einer Zelle. Die Apoptose findet vor allem in der Embryonalentwicklung, der Homöostase, bei tumorösen Veränderungen der Zellen sowie als Funktion des Immunsystems statt.

Im Gegensatz zur Nekrose bei der es durch chemische oder mechanische Schädigung zu einem initial reversiblen pathologischen Untergang der Zellen kommt und eine inflammatorische Reaktion stattfindet, handelt es sich bei der Apoptose um einen physiologischen Untergang der Zelle. (Kroemer et al. 1998) Die Apoptose ist nach erfolgter Induktion irreversibel. Morphologisch kommt es dabei zunächst zu einem Schrumpfen des Zytoplasmas und zu einer Chromatinkondensation im Kern. Es entstehen von der Zellmembran

umschlossene kleine Körperchen („*apoptotic bodies*“). Im weiteren Verlauf werden die Zellen schließlich sekundär nekrotisch, das heißt, sie verlieren ihre Membranintegrität. Diese kontrolliert ablaufenden Prozesse gewährleisten, dass keine Zellen des Nachbargewebes zugrunde gehen.

Bei der Apoptose spielen die Caspasen (*cysteiny-l-aspartate specific protease*) als wichtige Enzyme dieses Prozesses eine große Rolle. Caspasen sind Proteasen mit einem Cystein im aktiven Zentrum. Die humane Caspasenfamilie umfasst elf Mitglieder; dabei wird zwischen Initiator-Caspasen (Caspase 2, 8, 9, 10), die die Auslösung des Zelltodes herbeiführen und Effektor-Caspasen (Caspase 3, 6, 7) unterschieden.

Die Apoptose kann über zwei prinzipielle Signalwege initiiert werden: den extrinsischen und den intrinsischen Weg. (Hengartner 2000)

Beim extrinsischen Weg wird der Anreiz zur Apoptose von außen über einen so genannten *death receptor* der TNF-Rezeptorfamilie an die Zelle gegeben. (Schulze-Osthoff et al. 1998) Zu den Liganden des *death receptors* gehören z.B. TNF oder CD95-L.

Nach der Aktivierung des *death receptors* kommt es zu einer Vielzahl von Reaktionen, die die Apoptose einleiten, wie zum Beispiel die Aktivierung von Caspase 8 und 10, die darauf eine Caspasen Kaskade aktivieren. (Cohen 1997) Des Weiteren kommt es an der Zellmembran zur Verschiebung von Phosphatidylserin zur Außenseite der Zellmembran. (Vermees et al. 1995) Als abschließender Schritt im Ablauf der Apoptose wird die DNA enzymatisch gespalten. (Nagata 2000)

Beim intrinsischen Weg hingegen kommt der Anreiz zur Apoptose aus dem Inneren der Zelle. Zumeist liegt eine Schädigung der DNA zu Grunde, die zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren wie zum Beispiel p53 führt. Diese bewirken wiederum in den Mitochondrien eine Ausschüttung von Cytochrom c und diversen anderen apoptotisch wirkenden Stoffen. Diese Stoffe lösen eine Reihe von Vorgängen aus, was schließlich zur Aktivierung von Caspase 9 führt. Die aktivierte Caspase 9 induziert daraufhin die Prozessierung der Effektor-Caspasen 3 und 7. Damit kann die Exekutionsphase der Apoptose beginnen.

1.2.1 Der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase Signalweg

Bei den Phosphatidyl-Inositol-3-Kinasen handelt es sich um in allen eukaryotischen Zellen vorkommende Lipidkinasen, die eine Vielzahl von zellulären Funktionen steuern.

So führt die Aktivierung des PI3-Kinase Signalwegs zur Stimulation zahlreicher zellulärer Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Migration und Überlebensfähigkeit der Zelle, während die Inhibition des PI3-Kinase Weges zur Apoptose der Zelle führt. Mutationen im PI3-Kinase Weg führen zur malignen Transformation der Zelle.

Die Familie der PI3- Kinasen unterteilt sich in drei Klassen (I-III), die sich in ihrer Lipidsubstrat-Spezifität, in unterschiedlicher Größe der katalytischen und regulatorischen Untereinheiten sowie in ihren verschiedenen Aktivierungsmechanismen unterscheiden. (Rubio et al. 1997; Domin und Waterfield 1997; Toker und Cantley 1997)

Die Aktivierung der PI3-Kinase erfolgt durch direkte oder indirekte Bindung an Rezeptor-Tyrosin-Kinasen. Dazu zählen z.B. der Insulinrezeptor und der Wachstumsfaktor Rezeptor EGFR. (Soltoff et al. 1994; Vanhaesebroeck et al. 1997) Außerdem kann die Aktivierung über heterotrimere G-Proteine ausgelöst werden. Auch eine direkte Interaktion über die GTPase Ras ist möglich. (Rodriguez-Viciano et al. 1994; Rodriguez-Viciano et al. 1996)

Die aktivierte PI3-Kinase phosphoryliert daraufhin das in der Plasmamembran liegende Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) an der 3'-Position des Inositolringes zu Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃).

PIP₃ dient anschließend anderen Enzymen als Bindungsstelle. Zu diesen Enzymen gehören Akt (=Protein Kinase B/PKB) sowie dessen Aktivatoren, die PDKs (*phosphatidylinositol-dependent kinases*), Nucleotid-Austausch-Faktoren (Tiam1, Vav und Sos1), GTPase aktivierende Faktoren, der ADP-Ribosylierungsfaktor 6 (ARF6), Phospholipasen, sowie Protein-Tyrosin-Kinasen der Bruton's Tyrosin Kinase und die Tec Familie. (Cantley 2002)

Die aktivierte AKT/PKB phosphoryliert wiederum eine Reihe von Proteinen, die zur Steuerung der Zellfunktionen, wie zum Beispiel dem Überleben der Zelle

beitragen. So kommt es zu einer Hochregulierung von zum Beispiel Bad, Caspase 9, der Protein Kinase GSK-3, was dann zur Proteinsynthese führt und einen antiapoptotischen Effekt auf die Zelle hat.

Eine Inhibierung der PI3-Kinase hat einen Apoptose induzierenden Effekt auf Zellen.

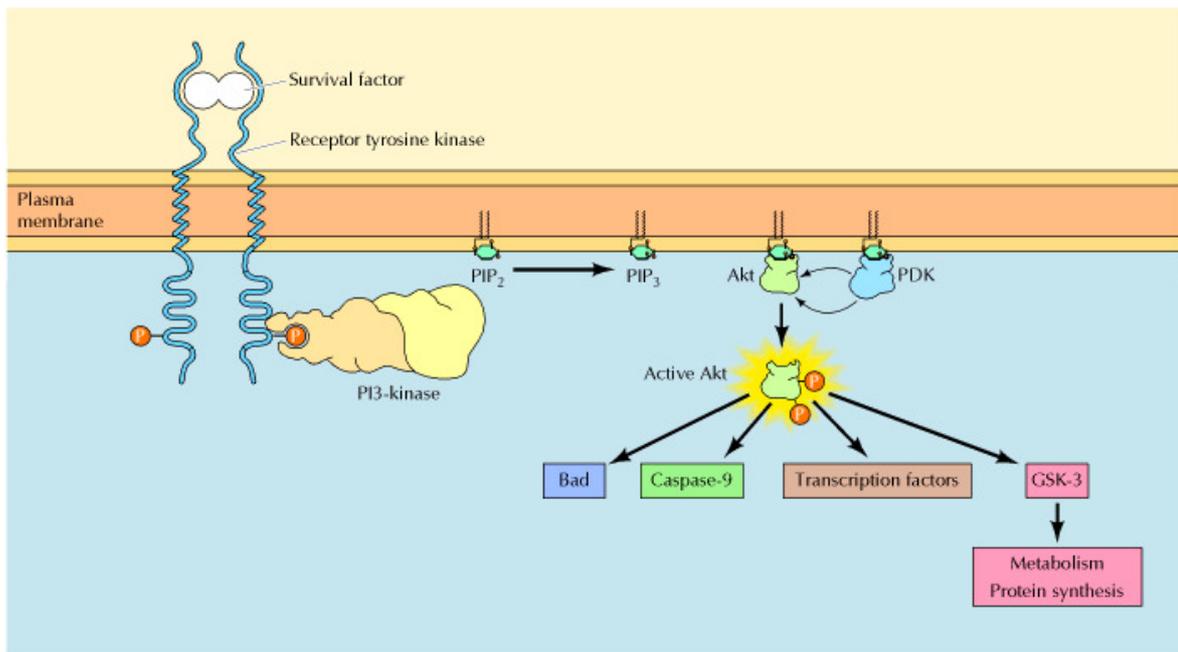
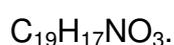


Abbildung 1.2.1.1

Darstellung des PI3-Kinase Signalweges. Über Rezeptor-Tyrosin Kinasen kommt es zur Aktivierung der PI3-Kinase und zur Bildung von PIP₃. PIP₃ aktiviert mit Hilfe der PDK wiederum Akt. Die aktivierte Kinase Akt steuert über weitere Enzyme den Stoffwechsel und die Proteinsynthese der Zelle. (Quelle: Geoffrey M. Cooper, 2000)

1.2.2 Der PI3-K Inhibitor LY294002

Bei LY294002 handelt es sich um einen synthetisch hergestellten PI3-K Inhibitor mit der chemischen Summenformel



LY294002 inhibiert spezifisch und selektiv die verschiedenen Mitglieder der PI3-K (Vlahos et al. 1994).

Der IC_{50} Wert gibt die Konzentration an die ein Stoff benötigt, um ein Enzym *in vitro* zu 50% zu blockieren. LY294002 hat einen IC_{50} von $1,4 \mu\text{M}$, dies ist etwa 500fach höher als der IC_{50} Wert von Wortmannin (IC_{50} : $4,2 \text{ nM}$), bei dem es sich ebenfalls um einen PI3-Kinase Inhibitor handelt. (Arcaro und Wymann 1993) LY294002 wird jedoch häufiger für Forschungszwecke verwendet, da es sich in Lösung stabiler als Wortmannin verhält.

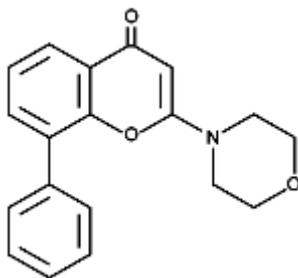


Abbildung 1.2.3.1

Strukturformel des PI3-Kinase Inhibitors LY294002

In dieser Arbeit wurde LY294002 als selektiver Inhibitor der PI3-K bei dendritischen Zellen in unterschiedlichen Konzentrationen eingesetzt.

Dabei bindet LY294002 an die aktive Seite der katalytischen p110 Untereinheit und hemmt damit die Kinaseaktivität. Wie bereits erwähnt, wird Akt/PKB über die PI3-K aktiviert und bietet dadurch den Zellen einen antiapoptotischen Schutz. Durch die angewandte konzentrationsabhängige Behandlung der DC mit LY294002 konnte eine erhöhte Apoptoserate der DC detektiert werden.

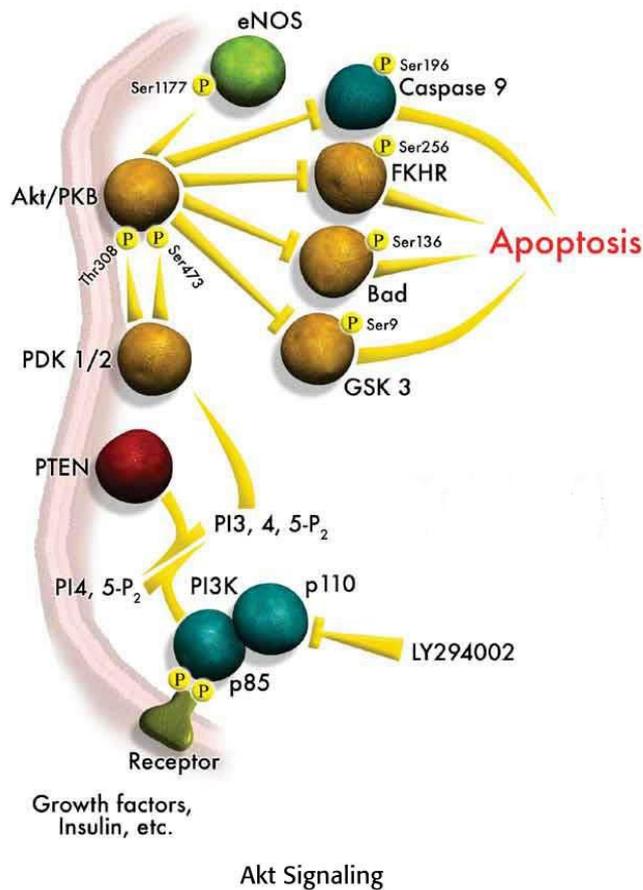


Abbildung 1.2.3.2

Schematische Darstellung der Wirkung von LY294002. Durch die inhibitorische Wirkung von LY294002 wird die Signaltransduktion in der Zelle gehemmt. LY294002 bindet an die p110 Untereinheit der PI3-Kinase, und inhibiert damit die PI3-Kinase. Der oben beschriebene PI3-K Signalweg wird dadurch blockiert. (Quelle: upstate, cell signaling solutions)

1.3 Toll-like Rezeptoren

Die Toll Rezeptoren wurden zum ersten Mal 1984 bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* entdeckt und spielen dort eine wesentliche Rolle in der dorso-ventralen Ausrichtung des Embryos. (Anderson und Nusslein-Volhard 1984)

Einige Zeit später konnten bei Wirbeltieren die so genannten Toll-like Rezeptoren (*TLR*) auf verschiedenen Zellen des Immunsystems, vor allem aber auf Zellen des MPS, nachgewiesen werden. (Zarembler und Godowski 2002)

Allerdings konnten TLR auch auf Zellen, die nicht dem Immunsystem angehören wie beispielsweise Fibroblasten oder Adipozyten, nachgewiesen werden.

TLR erkennen krankheitsspezifische molekulare Muster; so genannte PAMPs. Durch diese Erkennung wird dann die MyD88-abhängige oder die MyD88-unabhängige Signaltransduktion aktiviert.

Mittlerweile wurden 13 verschiedene TLR nachgewiesen. Für einige von ihnen konnten bereits die Liganden identifiziert werden. In dieser Arbeit wurde mit den TLR-Liganden 2, 3, 4 und 7 gearbeitet, worauf im Folgenden näher eingegangen wird.

1.3.1 nach Takeda *et al* (Takeda et al. 2003) vereinfacht dargestellte Tabelle über die Toll-like Rezeptoren 2, 3, 4 und 7, ihre Herkunft und ihre Liganden

TLR	Liganden	Herkunft der Liganden
TLR 2	Peptidoglykan, Lipoteichonsäure	Grampositive Bakterien
	Lipoproteine	Diverse Pathogene
	Lipidoarabinomannan	Mycobakterien
	Zymosan	Hefe
	Atypisches LPS	<i>Leptospira interrogans</i> <i>Porohyromonas</i> <i>gingivalis</i>
	Glycophosphatidylinositol (GPI)	Protozoen
TLR 3	Doppelsträngige RNA	Viren/Bakterien
	Poly I:C	synthetisch
	siRNA	Viren /Bakterien
	mRNA	Viren /Bakterien
TLR 4	LPS	Gram-neg. Bakterien
	Taxol	Pflanzen

	F-Protein (Fusions-Protein)	Respiratory-Syncycial Virus (RSV)
	HSP 60, HSP 70	Wirtsorganismus
	Fibronektin (extra-DomäneA)	Wirtsorganismus
	Oligosaccharide der Hyaluronsäure	Wirtsorganismus
	Heparansulfat-Fragmente	Wirtsorganismus
	Peptidoglykane	Mycobakterien
TLR 7	Imidazoquinoline u.a. Einzel- und doppelsträngige RNA	Synthetische Verbindungen

1.3.1 Die Signalwege der TLR

Der Toll-like Rezeptor ist aus zwei Teilen aufgebaut:

Der extrazelluläre Teil besteht aus einer Leucin-reichen Domäne, während der intrazelluläre Teil dem Interleukin-1 Rezeptor ähnelt, weshalb er auch als TIR-Domäne (Toll/ Il-1R homology domain) bezeichnet wird. (Gay und Keith 1991; Werling und Jungi 2003)

Die TIR-Domäne interagiert mit Adapterproteinen, die dann die Signaltransduktion einleiten. Derzeit sind drei solche Adapterproteine bekannt: MyD88 (Myeloid Differentiation Antigen 88), TIRAP/Mal (TIR-domain containing adapter protein; MyD88 adapter-like protein) und TRIF/TICAM (TIR-Domain-containing

adaptor inducing IFN β bzw. TIR-domain-containing adaptor molecule 1). (Medzhitov et al. 1998; Fitzgerald et al. 2001; Horng et al. 2001)

Zu den wichtigen Transkriptionsfaktoren, die bei Stimulation der TLR hochreguliert werden, zählen NF- κ B, AP-1 und IRF 3.

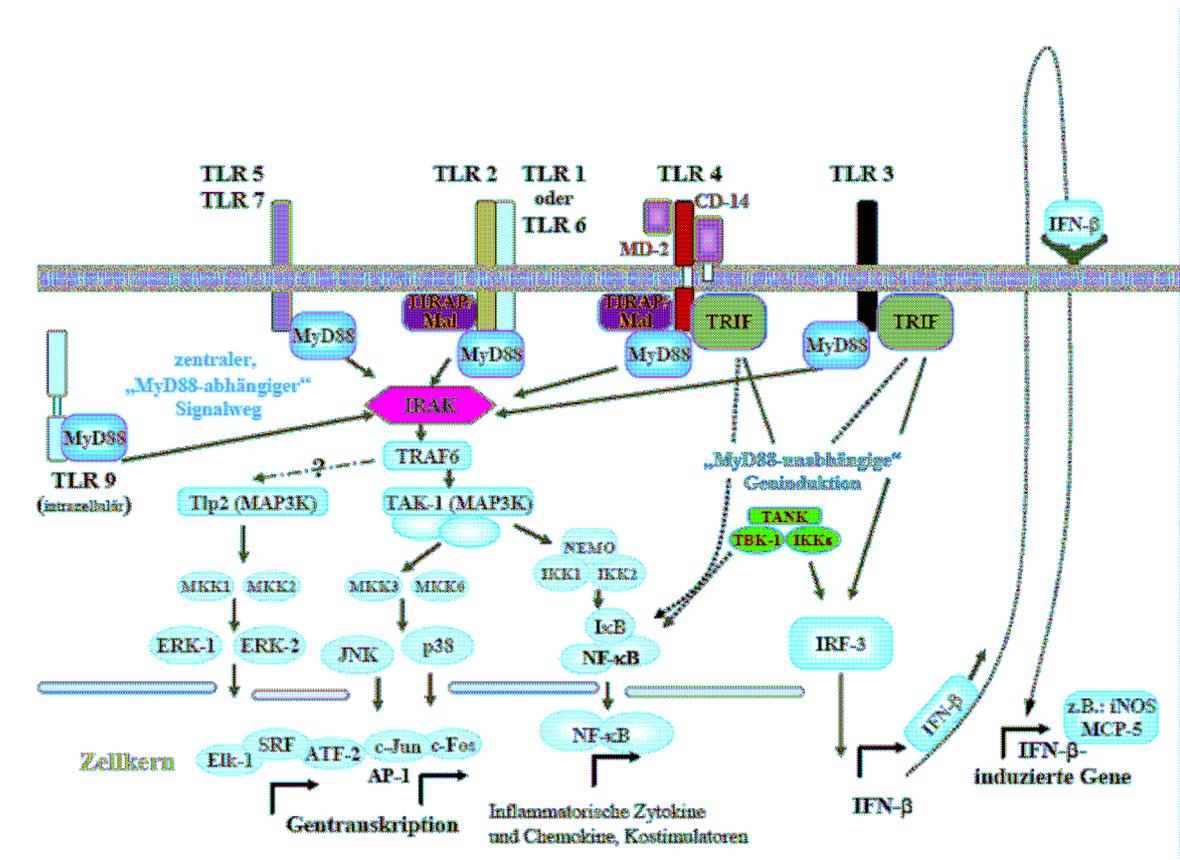


Abbildung 1.3.1

Die Abbildung zeigt die TLR 1 – 7 und ihre dazugehörigen Signaltransduktionskaskaden, den zentralen MyD88-abhängigen und den MyD88-unabhängigen Signalweg.

1.3.1.1 Die MyD88 abhängige Signaltransduktion

Bei dieser „zentralen“ Signaltransduktionskaskade kommt es über die Aktivierung von MyD88 zur Interaktion mit IRAK (IL-1R-assozierte Kinasen). (O'Neill 2003) IRAK stimuliert daraufhin TRAF6 (TNF-R-assoziierter Faktor 6) und dies führt wiederum zur Aktivierung von TAK-1 (TGFβ-activated kinase1). An dieser Stelle teilt sich die Signaltransduktionskaskade in zwei Wege: Ein Weg führt über eine Reihe von weiteren Faktoren zur Aktivierung von NFκB, der andere Weg führt über die Interaktion mit c-Jun und p38 zur Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren im Zellkern wie z.B. AP-1.

Außerdem existiert noch ein dritter Weg der Signaltransduktion. Dieser verläuft über die Interaktion mit ERK1 und ERK2 (extrazellulär Signal-regulierte Kinasen) und führt ebenfalls zur Aktivierung von Transkriptionsfaktoren.

1.3.1.2 Die MyD88 unabhängige Signaltransduktion

Dieser Weg der Signaltransduktion wurde erst bekannt, als es gelang MyD88 defiziente Mäuse zu generieren. Dabei stellte sich heraus, dass die TLR 2, 5, 7 und 9 MyD88 abhängig sind, während TLR 3 und 4 auch in MyD88 defizienten Zellen in der Lage sind NF- κ B und MAPK zu aktivieren, jedoch bei TLR 4 mit etwas Verzögerung. (Kawai et al. 1999; Alexopoulou et al. 2001) Außerdem kommt es zur Hochregulierung von IRF 3.

Diese spezifische Aktivierung von TLR 3 und 4 unterscheidet sich also entwicklungsgeschichtlich von den anderen TLR. Bei der Aktivierung der TLR 3 und 4 kommt es zu einer Hochregulierung von IRF 3 und es konnte eine Hemmung der viralen Replikation nachgewiesen werden. (Doyle et al. 2002) Durch die Aktivierung von IRF 3 erfolgt die Aktivierung der Interferon-assoziierten Gene wie IFN α und IFN β . Diese aktivieren im Anschluss STAT I und STAT II („signal transducers and activators of transcription“), die wiederum zusammen mit anderen IRFs die Transkription von weiteren IFN gesteuerten Genen bewirken. (Decker et al. 2002)

Die Adaptermoleküle spielen sowohl bei der MyD88 abhängigen als auch bei der MyD88 unabhängigen Signaltransduktion eine Rolle. So vermittelt das Adapterprotein TRIF/TICAM-1 beide Signaltransduktionswege für die TLR 3 und TLR 4.

TIRAP/Mal, das dritte bekannte TLR-Adaptorprotein, scheint nur an der Signaltransduktion von TLR 2 und TLR 4 beteiligt zu sein. Außerdem spielt TIRAP eine Rolle bei der Zytokin-Induktion durch TLR 2 und TLR 4.

1.3.2 Der Toll-like Rezeptor 2 und sein Ligand Pam3Cys

Wie in Tabelle 1.3.1 dargestellt, bindet der TLR 2 verschiedene Liganden, wie zum Beispiel Lipoteichonsäure und Peptidoglykane grampositiver Bakterien, (Schwandner et al. 1999) Lipoproteine, bestimmte Formen von LPS gramnegativer Bakterien, (Werts et al. 2001; Hirschfeld et al. 2001) Zymosane von Hefen, (Underhill et al. 1999) Lipidoarabinomannan von Mykobakterien und Glycophosphatidylinositol (GPI) von Protozoen. (Campos et al. 2001)

TLR2 ist in der Lage Dimere mit TLR 1 und TLR 6 zu bilden. (Underhill und Ozinsky 2002)

1.3.3 Der Toll-like Rezeptor 3 und sein Ligand Poly I:C

Der Toll-like Rezeptor 3 ist im endosomal-lysosomalen Kompartiment lokalisiert und erkennt bakterielle und virale doppelsträngige RNA (dsRNA) (Alexopoulou et al. 2001).

Bei Infekten gelangt dsRNA in den Organismus, wird ins Endosom aufgenommen und von TLR3 erkannt.

Doppelsträngige RNA (dsRNA) tritt zum Beispiel bei viralen Infekten mit Influenzaviren im Organismus auf. (Alexopoulou et al. 2001; Tabet et al. 2004) TLR 3 reagiert jedoch nicht nur auf „ganze“ Viren sondern auch auf synthetische Bestandteile wie das synthetische dsRNA-Analogon Poly-Inosin: Poly-Cytidyl-Säure (Poly I:C) (Wang et al. 2004).

Des Weiteren sind small interfering RNA (siRNA) und endogene mRNA als Liganden am TLR 3 bekannt. (Kariko et al. 2004a; Kariko et al. 2004b)

1.3.4 Der Toll-like Rezeptor 4 und sein Ligand LPS

Die Hauptliganden von TLR 4 sind Lipopolysaccharide die sich in den äußeren Membranen von gramnegativen Bakterien befinden.

Beim Auftreten von LPS im Organismus bindet das LBP an das MD-2 Lipopolysaccharid. Der so entstandene LPS-LBP-Komplex bindet nun an CD14, das sich an der Oberfläche von Phagozyten befindet und den TLR 4 aktiviert. Der TLR 4 ist wiederum in der Lage über Signaltransduktion die Immunantwort einzuleiten. Dabei wird im Kern der Transkriptionsfaktor NF- κ B aktiviert, der daraufhin die Bildung bestimmter Proteine induziert, die dann wiederum die zelluläre Immunantwort aktivieren. (Hoshino et al. 1999; Shimazu et al. 1999; Poltorak et al. 2000)

Bei einer unkontrollierten systemischen Bakterieninfektion kann es zu einer überschießenden Zytokinproduktion kommen und es entsteht ein septischer Schock.

Bei LPS handelt es sich um ein Molekül, das aus einer hydrophilen und einer hydrophoben Domäne, dem LipidA, besteht. LipidA ist ein variabler Teil, der sich in den jeweiligen gramnegativen Bakterien unterscheidet. Gewisse Sonderformen wie *Porphyromonas gingivales* und *Leptospira interrogans* können deshalb nicht von TLR 4 sondern nur von TLR 2 erkannt werden. (Hirschfeld et al. 2001)

Weitere Liganden am TLR 4 stellen z.B. Taxol von Pflanzen, HSP60 und HSP70, (Bulut et al. 2002) Fibronectin, Heparansulfat-Fragmente und Oligosaccharide der Hyaluronsäure aus Wirtsorganismen sowie Peptidoglykane von Mycobakterien (Uehori et al. 2005) dar.

1.3.5 Der Toll-like Rezeptor 7 und sein Ligand R 848

Die im Organismus vorkommenden Liganden von TLR 7 sind bisher noch nicht bekannt. Dennoch konnte nachgewiesen werden, dass antiviral wirksame niedermolekulare synthetische Substanzen wie Imidazoquinolone (zum Beispiel R848) in der Lage sind, den TLR 7 - MyD88 abhängigen Signaltransduktionsweg zu aktivieren. (Hemmi et al. 2002; Edwards et al. 2003) Durch Einwirken dieser synthetischen Substanzen kommt es zu einer erhöhten Synthese von IFN α und anderen Zytokinen.

Außerdem wurde vor kurzem herausgefunden, dass auch einzelsträngige RNA ein Ligand von TLR 7 darstellt. (Heil et al. 2004; Diebold et al. 2004)

1.4 Zielsetzung

Es ist bereits bekannt, dass LY294002 als selektiver Inhibitor der PI3-Kinase wirkt. Über seine Wirkung auf dendritische Zellen ist bisher jedoch wenig bekannt.

In dieser Arbeit wurde die Bedeutung der Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase auf Wachstum und Differenzierung von dendritischen Zellen untersucht.

2. Material

2.1 Geräte

Tabelle 2.1: Geräte

Gerät	Hersteller
Autoklav: Varioklav □ Dampfsterilisator	H+P Labortechnik GmbH, Oberschleißheim, Deutschland
Bestrahlungsgerät	MDS Nordion, Bucks, UK
Betaplatte Liquid scintillation	Perkin Elmer Wallace, Freiburg, Deutschland
Zellzähler	
Durchflusszytometer: FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Heiz- und Magnetrührer RCT basic IKA □	VWR International GmbH Bruchsal, Deutschland
Lichtmikroskop: Olympus CK 30-F200	Olympus Deutschland GmbH, Hamburg, Deutschland
MicroBeta 1450 Trilux	Wallace-ADL, Freiburg, Deutschland
Mini Trans Blot Cell	BioRad Laboratories GmbH, München,
Pipetboy	Integra Biosciences, Fernwald, Deutschland

Röntgenfilmkassette X-Ray Cassette	Gollwitzer GmbH & Co KG, Augsburg, Deutschland
Sterilbank	Heraeus Instruments GmbH, Düsseldorf Deutschland
Zellkultur-Brutschrank	NuAire, Inc., Plymouth, USA

Zentrifugen

Multifuge 3 S-R	Kendro Laboratory Products, Hanau, Deutschland
Eppendorf-Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.2 Verbrauchsmaterialien

Produkt	Hersteller
Combitips plus 5 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Einmalspritze 2-teilig, 10 ml, 20ml, 50ml	Braun, Melsungen, Deutschland

Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell BioSciences GmbH, Dassel, Deutschland
NUNC Cryo Tube® Vials 1 ml, 1,8 ml	Nalge Nunc International, Rochester, USA
Peha-Soft Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidelberg, Deutschland
Pipetten 10 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Pipetten 2 ml Falcon®, Polystyrol, steril, gestopft	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
5 ml, 10 ml, 25ml, 50ml	Corning Inc., Corning, New York, USA
Pipettenspitzen	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen Deutschland
Polypropylenröhrchen Falcon®, 50 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
PP-Test Tube Cellstar®, steril, 15 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Reaktionsgefäße, 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Rundbodenröhrchen, Polystyrol, 5 ml, steril, 12 x 75 mm	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Stericup™, 0,22 µm, 500 ml, steril	Millipore, Bedford, USA
TC-Tube Cellstar®, steril, 14 ml, 16,0/100 mm Screw Cap	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, Deutschland
6-Kavitäten-Zellkulturplatte Falcon® Multiwell®	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
24-Kavitäten-Zellkulturplatte Falcon® Multiwell™	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
96-Kavitäten-Flachbodenplatte Cellstar®	Greiner Bio-One, Frickenhausen, Deutschland
Whatman-Papier	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Zellkulturflaschen 0.2 µm <i>Vented Blue Plug Seal</i> <i>Cap</i> , 75 cm ² , 250 ml, 70ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.3 Reagenzien

2.3.1 Antikörper

2.3.1.1 Antikörper für Western Blot Analyse

Tabelle 2.3: Antikörper für Western Blot Analyse

Produkt	Hersteller
anti-ERK1/2	Cell Signaling Technology Inc, Beverly, Ma, USA
anti-IRF3	Santa Cruz Biotechnology Inc. , Santa Cruz, CA, USA
anti-IRF-8	Santa Cruz Biotechnology Inc. , Santa Cruz, CA, USA
anti-rabbit-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc. , Santa Cruz, CA, USA
anti-goat-IgG-HRP	Santa Cruz Biotechnology Inc. , Santa Cruz, CA, USA
anti-relB	Santa Cruz Biotechnology Inc. , Santa Cruz, CA, USA

2.3.1.2 Antikörper für FACS-Analysen

Tabelle 2.3.1: Anti-humane Antikörper für FACS-Analysen

Produkt	Hersteller
---------	------------

Maus anti-CD1a-FITC	Dako, Hamburg, Deutschland
Maus anti-CD14-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus anti-CCR7-FITC	R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA
Maus anti-CD80-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus anti-CD40-FITC	PharMingen, Hamburg, Deutschland
Maus IgG1-FITC	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus anti-CD86-PE	PharMingen, Hamburg, Deutschland
Maus anti-54-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus anti-CD86-PE	PharMingen, Hamburg, Deutschland
Maus anti-CD83-PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
Maus anti-HLA-DR-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Maus anti-DC-SIGN-PE	R&D Systems Inc, Minneapolis, MN, USA
Maus IgG1-PE	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.3.2 Chemikalien

Tabelle 2.3.2: Chemikalien

Produkt	Hersteller
30% Acrylamid/Bis-acrylamid (37,5:1)	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Aprotinin	Sigma, St. Louis, USA

<i>Bench Mark® Prestained Protein Ladder</i>	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
<i>Biotinylated SDS PAGE Standards Low Range</i>	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Beta-Mercaptoethanol	Sigma-Alfdrich, Deisenhofen, Deutschland
BSA	Roche, Mannheim, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis, USA
DMSO	Sigma, St. Louis, USA
DTT	Roth, Karlsruhe, Deutschland
EDTA, 0,5M	Sigma, St. Louis, USA
EGTA	Sigma, St. Louis, USA
Ficoll: <i>Biocoll Separating Solution</i>	Biochrom AG Berlin, Deutschland
FITC-Dextran	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Glycerin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
[³ H]-Thymidin	Amersham Life Science, Little Chalfont, UK
Igepal CA-630	Sigma, St. Louis, USA
LY294002	Upstate, Lake Placid, NY ; USA
Marker für SDS-PAGE, <i>Broad Range</i>	BioRad Laboratories GmbH, München, Deutschland
Natriumorthovanadat	Sigma, St. Louis, USA
PMSF	Sigma, St. Louis, USA
Propidiumjodid	Sigma, St. Louis, USA
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Slim Fast Schokolade	Slim Fast Deutschland GmbH, Wiesbaden, Deutschland
<i>Streptavidin Horseradish Peroxidase Conjugate</i>	Amersham Life Science, Freiburg, Deutschland
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland
Toll like Rezeptor Ligand 2 (= Pam ₃ Cys)	EMC Microcollections, Tübingen, Deutschland
Toll like Rezeptor Ligand 3 (=Poly I:C)	Sigma, St. Louis, USA
Toll like Rezeptor Ligand 4 (=LPS)	Sigma, St. Louis, USA
Toll like Rezeptor Ligand 7 (= R848)	InvivoGen, San Diego, USA
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Trypanblau	Sigma, St. Louis, USA
TWEEN® 20	Merck, Hohenbrunn, Deutschland
Zytokine	
GM-CSF Leukine® Liquid	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
Sargramostim	
IL-4	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland
MIP-3β	R&D Systems, Wiesbaden, Deutschland

2.3.3 Kits

Tabelle 2.3.3: Kits

Produkt	Hersteller
BCA <i>Protein Assay Reagent Kit</i>	Pierce, Peribio Science, Bonn, Deutschland
ECL® <i>Western Blotting Detection Reagent Kit</i>	Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland

2.3.4 Medien und Antibiotika

Das Medium RPMI 1640 mit Glutamax-I, die Antibiotika Penicillin/Streptomycin, das zum Ablösen der Zellen verwendete Trypsin-EDTA, das PBS sowie das eingesetzte FCS wurden von der Firma Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, Deutschland bezogen. Das Medium X-Vivo 20 stammte von der Firma BioWhittaker™, Walkersville, USA.

Tabelle 2.3.4: Medien

Medium	Zusammensetzung
Einfriermedium	10% (v/v) DMSO in FCS
RP10-Medium	Medium RPMI 1640 mit Glutamax-I, 10% hitzeinaktiviertem FCS, 100 IU/ml Penicillin/Streptomycin

2.3.5 Puffer und Lösungen

Tabelle 2.3.5: Puffer und Lösungen

Puffer	Zusammensetzung
FACS-Puffer	5% (v/v) BSA in PBS
Laufpuffer für SDS- Polyacrylamidgelelektrophorese	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS
Lysepuffer IGEPAL-1	1% Igepal CA-630 2 mM EDTA 2 mg/l Aprotinin 1 mM PMSF
Lysepuffer RIPA-0,1	1% Igepal CA-630 0,5% Natriumdeoxycholat 0,1% SDS 2 mM EDTA 2 mg/l Aprotinin 1 mM PMSF in PBS

Propidiumjodid-Lösung	100 ml H ₂ O 100 µl Triton X 100 µl Na-Citrat 500 µl Propidiumjodid
Puffer A Kernextrakte	10 mM HEPES pH 7,9 10 mM KCl 0,1 mM EDTA 0,1 mM EGTA 1 mM DTT 0,5 mM PMSF
Puffer C Kernextrakte	20 mM HEPES pH 7,9 0,4 M NaCl 1 mM EDTA 1 mM EGTA 1 mM DTT 0,5 mM PMSF
SDS-Probenpuffer für PAGE, 3-fach	0,18 M Tris-HCl pH 6,8 28% Glycerin 0,001% Bromphenolblau 300 mM DTT 6% SDS
Stripping Puffer	100 mM β-Mercaptoethanol 2% SDS 62,5 mM Tris/HCl pH 6,7

	in H ₂ O
TBS	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl
TBST, 0,5%	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl 0,5% (v/v) Tween-20
TBST, 3%	10 mM Tris-HCl pH 8,0 140 mM NaCl 3% (v/v) Tween-20 20% (v/v) Methanol
Transferpuffer für denaturierenden Western Blot	192 mM Glycin 25 mM Tris 0,1% SDS 20% (v/v) Methanol

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von Zellen

Die Kultivierung der DC erfolgte in 75 cm² Zellkulturflaschen mit 1×10^7 Zellen pro Flasche in Inkubatoren bei 37°C, 5% CO₂ in feuchtigkeitsgesättigter Atmosphäre. Es wurden ausschließlich aus Monozyten generierte DC verwendet, die mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4 im Kulturmedium RP-10 angezüchtet wurden. (Sallusto und Lanzavecchia 1994; Romani et al. 1996)

3.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurden in einem Eppendorf-Gefäß 10 µl Zellsuspension und 10 µl Trypanblau gemischt.

Daraufhin wurden ungefähr 10 µl dieser Mischung auf eine Neubauer Zählkammer aufgetragen und unter dem Lichtmikroskop 16 Quadrate ausgezählt.

Die Zellzahl pro Milliliter lässt sich folgendermaßen errechnen:

(Lebendzellzahl in 16 Quadraten) $\times 10^4 \times 2$ Zellen/ ml.

Hierbei entspricht der Faktor 2 der Verdünnung mit Trypanblau.

Bei der Betrachtung im Lichtmikroskop erscheinen lebende Zellen ungefärbt, da der Farbstoff die Zellwand nicht durchdringen kann; tote Zellen stellen sich blau dar, da hier der Farbstoff in die Zelle eindringen kann.

3.1.3 Kryokonservierung von Zellen

Das Aufbewahren von DC erfolgte bei -80°C . Dem Protokoll folgend wurden die Zellen abtrypsinisiert, anschließend mit Medium gewaschen, und die Zellzahl in der Neubauer Zählkammer bestimmt.

Es wurden jeweils 1×10^7 Zellen pro Kryoröhrchen in 1 ml Einfriermedium aufgenommen. Die Kryoröhrchen wurden in einer Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80°C eingefroren, um ein möglichst langsames Einfrieren zu gewährleisten.

Das Auftauen der Zellen muss sehr rasch erfolgen, um den Verlust großer Zellzahlen zu vermeiden. Die in den Kryoröhrchen eingefrorenen Zellen wurden in einem Wasserbad bei 37°C erwärmt, bis die Zellsuspension fast vollständig aufgetaut war. Dann wurden die Zellen in ein 50 ml Polypropylenröhrchen überführt, 10 ml Medium zugegeben, gemischt und schließlich zentrifugiert ($486 \times g$, 5 min). Dadurch wurden die Zellen von im Einfriermedium vorhandenem zytotoxischen DMSO befreit. Nachdem der Überstand verworfen worden war, wurden die Zellen in 10 ml Medium aufgenommen, in eine 75 cm^2 Kulturflasche überführt und für weitere Versuche verwendet.

3.1.4 Isolation mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Zur Gewinnung von PBMNC (*Peripheral Blood Mononuclear cells*) wurden *Buffy Coats* aus der Blutspendezentrale Tübingen verwendet. Die Isolation der mononukleären Zellen erfolgte dabei über eine Ficollseparation, deren folgendes Prinzip zu Grunde liegt: Bei Ficoll handelt es sich um ein synthetisches Polysaccharid mit einer Dichte von $1,077 \text{ g/ml}$. Bei der Übersichtung von Ficoll mit Vollblut und der anschließenden Zentrifugation bei sehr hoher Umdrehungszahl kommt es zu einer charakteristischen Auftrennung des Vollblutes: Die mononukleären Zellen (Lymphozyten und Monozyten) befinden sich in der Grenzschicht von Serum und Ficoll, Granulozyten und Erythrozyten befinden sich am Boden des Zentrifugationsgefäßes, was durch ihre höhere

Dichte bestimmt ist und die Thrombozyten verteilen sich auf die oberhalb des Ficolls liegende Serumschicht.

Im Versuch wird die Isolation mononukleärer Zellen folgendermaßen durchgeführt: Die Buffy Coats wurden im Verhältnis 1:4 mit PBS verdünnt. Dann wurden in sechs Polypropylenröhrchen je 12 ml Ficoll-Lösung pipettiert, die daraufhin mit je 33 ml des verdünnten *Buffy Coats* vorsichtig überschichtet wurden, so dass es zu keiner Vermischung der beiden Schichten kam.

Die Röhrchen wurden dann für 18 Minuten bei 806 x g und RT zentrifugiert (Bremsgradient 3, Beschleunigungsgradient 3). Dadurch bildeten sich, wie oben beschrieben, eine Plasmaschicht, eine Erythrozytenschicht mit dem darüber liegenden Ficoll und eine PBMNC-Schicht zwischen den beiden anderen Schichten.

Nach erfolgter Zentrifugation wurde die Plasmaschicht bis 1-2 cm oberhalb der PBMNC-Schicht abgesaugt, die PBMNC-Schicht mit einer Pasteur Pipette abgenommen und in zwei neuen Polypropylenröhrchen überführt.

Die beiden neuen Ansätze wurden mit jeweils 50 ml PBS aufgefüllt, und fünf Minuten bei 453 x g zentrifugiert, um die Ficoll-Lösung aus den PBMNC zu waschen. Dieser Vorgang wurde noch zweimal wiederholt.

Anschließend wurden alle PBMNC in ein gemeinsames Polypropylenröhrchen überführt, und in 10 ml PBS aufgenommen. Von der Zelllösung wurden 10 µl abpipettiert, und daraus die Zellzahl bestimmt.

Nach erneuter Zentrifugation wurden die Zellen mit X-Vivo 20 auf eine Zellzahl von 1×10^8 Zellen pro ml eingestellt.

3.1.5 Ex-vivo Generierung von DC

Die durch Ficollseparation gewonnenen PBMNC wurden zur Isolation der adhärennten Monozyten in 75 cm² Zellkulturflaschen aufgenommen, wobei in jede Zellkulturflasche je 1 ml der Zellsuspension (also 1×10^8 PBMNC) und 9 ml X-Vivo pipettiert wurden. Um nun die Monozyten am Flaschenboden adhären zu lassen, wurden die Zellen im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂

für zwei Stunden inkubiert. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Flaschen dreimal mit je 10 ml PBS gewaschen, so dass die im Überstand verbliebenen Zellen aus der Zellkulturflasche gewaschen wurden.

Zu den am Boden adhärennten Monozyten wurde nun 10 ml RP10-Nährlösung gegeben, und die Zellen wurden für sieben Tage im Brutschrank inkubiert. Um die Reifung der Monozyten zu dendritischen Zellen zu induzieren, wurde alle zwei Tage GM-CSF (100 ng/ml) und IL-4 (20 ng/ml) zugegeben. (Caux et al. 1992) Während der Reifungszeit wurden die Zellen mit verschiedenen Stoffen behandelt, die die verschiedenen Stoffwechselfvorgänge der DC hemmen sollten. (Romani et al. 1994)

Nach sieben Tagen wurden die Zellen geerntet, indem man das Medium abnahm und die adhärennten Zellen mit 10 ml PBS, 7 mM EDTA gewaschen und dadurch vom Flaschenboden abgelöst. Daraufhin wurde die Zellsuspension in Polypropylenröhrchen überführt.

Die geernteten Zellen wurden bei 453 x g für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert und anschließend dreimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Nach Bestimmung der Lebendzellzahl konnten die DC für weitere Experimente verwendet werden.

3.2 Durchflusszytometrie/ FACS Analyse

Bei der Durchflusszytometrie oder FACS Analyse („Fluorescence activated cell sorting“) handelt es sich um eine neuere Labormethode, die das Zählen und die Analyse von Zellen und Mikropartikeln in einem Flüssigkeitsstrom erlaubt.

In der medizinischen Forschung besteht das Hauptanwendungsgebiet der FACS-Analyse darin, mit Hilfe von Fluoreszenzfarbstoff markierten Proben spezielle Eigenschaften der Zellen, wie zum Beispiel die Zahl bestimmter Oberflächenmoleküle auf Einzelzellebene, zu dokumentieren. (Valet 2003)

Zur Analyse der Zellen werden diese einzeln, wie an einer Perlenkette, an einem gebündelten Laserstrahl vorbeigeleitet, und dabei die Fluoreszenz gemessen.

3.2.1. Aufbau und Funktion eines Durchflusszytometers

Das Durchflusszytometer ist in der Lage, „optische“ Signale wie Reflexion, Streuung und Fluoreszenz zu messen.

Dabei durchwandern die zu messenden Zellen folgende „Stationen“ des Durchflusszytometers:

Zunächst wurden die in FACS-Puffer gelösten Zellen in spezielle FACS-Röhrchen überführt. Diese Röhrchen wurden dann in das FACS-Gerät eingespannt, die Zellen angesaugt, in eine Messküvette geleitet und vom fokussierten Lichtstrahl einer Lichtquelle beleuchtet. Die Zellen wurden dabei in der Messküvette linear beschleunigt, so dass sie stets nacheinander bestrahlt wurden und nicht mehrere Zellen gleichzeitig, was das Messergebnis verfälschen würde.

Die bestrahlten Zellen streuen je nach ihrem Aufbau (z.B. Beschaffenheit der Zellwand, DNA-Gehalt, zytoplasmatischer Anteil) das Licht unterschiedlich. Auch wird das Licht nicht in alle Richtungen gleichmäßig gestreut. Am stärksten ist der Lichtstrahl dabei in Vorwärtsrichtung, (Vorwärtsstreulicht, Forward Angle Light Scatter (=FSC)), wobei die Stärke des Vorwärtsstreulichts abhängig von der Größe der Zelle ist, d.h. je größer die Zelle, umso stärker das Vorwärtsstreulicht. Ein viel geringerer Teil des Lichtes streut auch in Seitwärtsrichtung (Seitwärtsstreulicht; Side Scatter (=SSC)). Dieser Teil ist abhängig von der Granularität, Membranfaltung und äußeren Form der Zelle.

3.2.2 Markierung mit fluoreszierenden Antikörpern

Das Anfärben der Zellen mit fluoreszierenden Antikörpern oder mit Farbstoffen, die intrazelluläre Bestandteile anfärben (wie zum Beispiel Propidiumjodid), ermöglicht es, Populationen mit verschiedenen Eigenschaften zu klassifizieren. Bei der Messung wird dann sowohl die Fluoreszenz als auch die Streulichtemission der Zelle gemessen.

Unter Fluoreszenz versteht man die rasch abklingende Lichtemission von Molekülen nach Absorption energiereicher Strahlen.

3.3 Messung der Apoptoserate nach Nicoletti

Zur Bestimmung der Apoptoserate wurde eine Färbung der DNA-Fragmente nach Nicoletti vorgenommen. (Nicoletti et al. 1991) Hierbei wurde der Prozentsatz der apoptotischen Zellen nach einer Färbung mit Propidiumjodid (PI) in hypotonischem Puffer gemessen. Bei PI handelt es sich um einen DNA-interkalierenden Farbstoff, der intakte Zellmembranen nicht durchdringen kann, und so nur tote Zellen anfärbt.

Verwendet wurden DC, die eine Woche kultiviert und in dieser Zeit mit speziellen Stoffen, die eine apoptotische Wirkung haben, behandelt worden waren. Zunächst wurden in eine 96-Kavitäten Flachbodenplatte pro Ansatz je 5×10^4 DC in 200 μ l Medium vorgelegt. Um Messungengenauigkeiten zu minimieren wurde jeder Ansatz 3fach angesetzt.

Anschließend wurden die Zellen 5 min bei 460 x g zentrifugiert und die Überstände verworfen, indem die Platte auf einem Papierhandtuch gut abgeklopft wurde.

Daraufhin wurde in jede Kavität mit Hilfe einer Multipipette 100 μ l PI-Lösung pipettiert und die Proben im Dunkeln für 15 min inkubiert.

Die gefärbten Ansätze wurden jetzt in FACS-Röhrchen überführt und bis zur Messung auf Eis gekühlt und mit Alufolie gegen Helligkeit geschützt, da PI-

Lösung sehr lichtempfindlich ist. Die apoptotischen Zellen wurden schließlich im Durchflusszytometer analysiert.

3.4 MLR (Mixed Lymphocyte Reaction)

Die MLR dient dazu *in vitro* eine Immunreaktion zu erzeugen. Ursprünglich wurde die MLR entwickelt, um Transplantatabstoßungen zu vermeiden. (BACH und HIRSCHHORN 1964) Dabei bedient man sich der Tatsache, dass Zellen mit fremden MHC-Molekülen, also die Spenderzellen, die T-Lymphozyten des Empfängers zur Reifung und Proliferation anregen und damit zu einer Abstoßungsreaktion führen können. Fällt in der MLR die Empfänger–anti–Spender–Reaktion jedoch gar nicht oder sehr schwach aus, so ist mit keiner Transplantatabstoßung zu rechnen. Da die MLR jedoch sehr zeitaufwendig ist, kann sie bei vielen klinischen Problemstellungen nicht angewendet werden.

Per MLR lässt sich jedoch auch feststellen, in wie weit DC in der Lage sind, Lymphozyten zur Proliferation zu stimulieren.

Im Versuch wurden jeweils drei verschiedene DC Konzentrationen verwendet, 1×10^5 , 1×10^4 und 1×10^3 . Jede Konzentration wurde viermal angesetzt, um Messfehler zu minimieren.

Im ersten Schritt wurden die DC mit 30 Gy bestrahlt. Dabei wurde die Dosis so gewählt, dass die DC nicht abgetötet wurden, jedoch soweit gehemmt wurden, dass sie nicht mehr proliferieren konnten. Nach erfolgter Bestrahlung wurden die verschiedenen Konzentrationen von DC in eine 96-Kavitäten Platte überführt, wobei die Zellen in 100 µl RP10-Medium pro Kavität resuspendiert waren.

Anschließend wurden PBMNC, die ja zahlreiche Lymphozyten enthalten, langsam aufgetaut, mit PBS gründlich gewaschen, in RP-10 Medium aufgenommen und gezählt.

Jeder Kavität in der 96-Kavitäten Platte wurden nun 1×10^5 PBMNC, die ebenfalls in 100 µl RP-10 gelöst waren, zugefügt.

Daraufhin wurde die Platte für 5 Tage im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

Während dieser fünftägigen Inkubationszeit kann es vorkommen, dass die proliferierenden PBMNC das Medium verbrauchen, woraufhin 100 µl des Mediums in den betroffenen Kavitäten ausgetauscht wurde.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Zellen für weitere 16 h mit ³H-Thymidin inkubiert. Hierbei handelt es sich um eine radioaktive Substanz, die bei proliferierenden Zellen in die DNA eingebaut wird. Die Zellen, die ³H-Thymidin aufgenommen hatten, konnten durch die von der Substanz ausgehende Strahlung in einem „Counter“ gezählt werden.

Zuletzt wurden die inkubierten Zellen auf ein „Fließ-Papier“ übertragen, und die Aktivität im Szintillationszähler quantifiziert.

3.5 Migration

Die Migrationsfähigkeit von DC wurde vor allem bei Entzündungsvorgängen beobachtet. Die unreifen DC nehmen dabei Antigene auf und migrieren zum Entzündungsherd, wobei sie sich gleichzeitig auch zu reifen DC umwandeln. Dabei werden sie von Chemokinen aus dem Gewebe, wie zum Beispiel MIP-3β (*Makrophagen inflammatorisches Protein 3-beta*), geleitet. Nach Erreichen des Entzündungsherds stimulieren sie dort Lymphozyten, um die Immunabwehr des Körpers zu aktivieren. Toxische Stoffe können die Migrationsfähigkeit der DC inhibieren.

Im Versuch wurde die Migrationsfähigkeit von unterschiedlich vorbehandelten DC mit jeweils 1×10^5 DC pro Ansatz untersucht.

Im ersten Schritt wurden in eine 24-Kavitäten Platte je 1 ml RP10 pro Kavität vorgelegt. Um die Migrationsfähigkeit der DC mit und ohne Chemokine vergleichen zu können, wurde jeweils ein Ansatz mit 100 ng/ml MIP-3β und ein weiterer Ansatz ohne MIP-3β angesetzt.

Als nächstes wurden die Membraneinsätze in die Kavitäten gesetzt. Anschließend wurden in jeden Membraneinsatz 1×10^5 DC pipettiert und bei 37°C für 3 h inkubiert. Während dieser Zeit konnten die DC durch die Membraneinsätze hindurchwandern.

Nach erfolgter Inkubation wurden die Membraneinsätze vorsichtig herausgenommen und verworfen. Die in die Kavitäten migrierten DC konnten nun mit PBS heraus gewaschen werden. Die Ansätze wurden daraufhin in FACS Röhrchen überführt, für 5 min bei 453 x g zentrifugiert und danach in 200 µl FACS Puffer aufgenommen.

Um zu ermitteln, wie viele Zellen durch die Membraneinsätze migriert waren, wurde im FACS jeder Ansatz genau eine Minute gemessen und die Anzahl der gemessenen Zellen pro Ansatz verglichen.

3.6 Kernextrakte

Zur Herstellung von Kernextrakten wurde stets die exakt gleiche Menge an Zellen, nämlich 1×10^6 Zellen, verwendet. Im ersten Schritt wurden die zu bearbeitenden Zellen in ein Eppendorf-Gefäß überführt, und in 1 ml PBS resuspendiert.

Anschließend wurden die Zellen in der Eppendorfcentrifuge für 15 s mit 20000 x g bei RT zentrifugiert und danach die Überstände vorsichtig abgenommen. Das am Boden verbliebene Pellet wurde in 400 µl hypotonen Lysepuffer A aufgenommen und resuspendiert. Das frisch zugesetzte DTT des Puffers schützt die gelösten Proteine vor Oxidation mit Luftsauerstoff, PMSF inhibiert Proteasen.

Das Gemisch wurde dann 15 min auf Eis inkubiert, um die Zellen zum Anschwellen zu bringen. Im nächsten Schritt wurden in jedes Eppendorf-Gefäß 25 µl einer 10%igen IGEPAL zugefügt und die Proben sofort 10 s kräftig gevortext. Dadurch wurden die Membranen der Zellen zerstört. Daraufhin wurde 30 s bei 4°C mit 20000 x g zentrifugiert. Der zytoplasmatische Überstand wurde verworfen und das nukleäre Pellet in 50 µl Puffer C vorsichtig resuspendiert. Dem Puffer C wurde direkt vor der Verwendung ebenfalls 1 mM DTT und 1 mM PMSF zugefügt. Die Proben wurden daraufhin für weitere 15 min unter mehrmaligem vortexen auf Eis inkubiert, um das Pellet aufzulösen.

Zuletzt wurden die Proben für weitere 5 min bei 20800 rpm und 4°C zentrifugiert, die Überstände, in denen sich jetzt die Kernproteine befanden, abgenommen, in Eppendorf-Gefäße überführt und bei -80°C eingefroren.

3.7 Auftrennung der Proteine durch SDS-PAGE

Bei der SDS-PAGE werden die Proteine nach unterschiedlichem Molekulargewicht aufgetrennt.

Die bei -80°C gelagerten Kernextrakte wurden langsam auf Eis aufgetaut. Von jeder zu analysierenden Kernextraktprobe wurden 16 µl entnommen, wobei 1-2 µl c.a. 2-4 µg Protein entsprechen.

Nun wurden die Proben im Verhältnis 3:1 mit einem 3x Sample Buffer vermischt, der 300 mM DTT enthält.

DTT bewirkt die Reduktion der Disulfidbrücken der Proteine. Im nächsten Schritt wurden die Proben bei 100°C für 4 min erhitzt, um die Proteine zusätzlich zu denaturieren.

Anschließend wurden die Proben mittels Gelelektrophorese aufgetrennt.

Für die Gelelektrophorese benötigte man Gele, die aus zwei Phasen aufgebaut waren; dem Sammelgel zum Fokussieren der Proteine und dem Trenngel zum Auftrennen der Proteine entsprechend dem Molekulargewicht.

Das Trenngel hatte einen Polyacrylamidanteil von 10% (Zusammensetzung: 5 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1), 5,6 ml 1 M Tris/HCL pH 8,8, 4,2 ml H₂O, 150 µl SDS (10% v/v), 100 µl APS (10% v/v), 10 µl TEMED) und das Sammelgel einen Polyacrylamidanteil von 6% (Zusammensetzung: 1 ml 30% Acrylamid/Bisacrylamid 37,5:1), 1 ml 2 M Tris/HCL pH 6,7, 3 ml H₂O, 50 µl SDS (10% v/v), 50 µl APS (10% v/v), 5 µl TEMED).

Der 1%ige Anteil des anionischen Detergenz SDS (Natriumdodecylsulfat) in den Gelen bewirkte, dass die Eigenladung sämtlicher Proteine überdeckt wurde und alle Proteine negativ geladen waren. Dem entsprechend wurden die Proteine nur nach ihrem Molekulargewicht, nicht nach ihrer Ladung aufgetrennt.

Nun wurden die oben beschriebenen Proben vorsichtig in die Taschen der Gele pipettiert, und zusätzlich in eine am Rand des Gels gelegene Tasche 7 µl des Prestained Markers mit bekannten Referenzproteinen vorgelegt, um später das Molekulargewicht der Proteine abschätzen zu können.

Nach Auftragen der Proben wurden die Gele in eine horizontale Elektrophoresekammer, die mit Laufpuffer gefüllt war, gestellt und eine Spannung von 120 V angelegt, bis die Proteine das Ende des Trenngels erreicht hatten.

3.7.1 Western Blot

Beim Western Blot werden die zuvor in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulose-Membran übertragen. Auf dieser Membran können dann über spezifische Antikörperbindungen einzelne Proteinbanden detektiert werden. (Renart et al. 1979; Towbin et al. 1979)

Nach erfolgter Elektrophorese wurde das Gel auf die Nitrozellulosemembran gelegt, auf beide Seiten ein mit Transferpuffer getränktes Whatman-Papier gelegt und schließlich als äußerste Schicht auf jede Seite noch ein mit Transferpuffer getränkter Schwamm gelegt. Dabei wurde darauf geachtet, dass die einzelnen Schichten dieses „sandwichs“ nicht gegeneinander verrutschen, um z.B. Mehrfachbanden eines Proteins oder Luftblasen zu vermeiden.

Da der Proteintransfer auf Grund der negativen Ladung der Proteine von der Kathode zur Anode erfolgte, musste dem entsprechend das Gel auf Seiten der Kathode liegen und die Membran auf Seiten der Anode.

Um den Proteintransfer zu starten wurde das ganze „Blot-Sandwich“ in die mit Transferpuffer gefüllte Transferkammer gespannt und bei einer angelegten Stromstärke von 250 mA bei 4 °C für eine Stunde geblottet.

Nach erfolgtem Proteintransfer wurde die Membran sofort in 1 x TBS überführt, um ein Austrocknen zu vermeiden.

Damit spätere unspezifische Bindungen der Antikörper vermieden werden konnten, wurde die Membran nun in einer 4%igen Slimfast-Lösung mit TBS

0,5% Tween geblockt. Dabei banden die Proteine der Slimfast-Lösung an die Membran.

Nachdem die Membran mit Proteinen gesättigt war, konnte sie nun mit einem Primär-Antikörper behandelt werden.

Die entsprechende Konzentration des zu verwendenden Antikörpers wurde in 15 ml TBS 0,5% Tween und 2,5% Slimfast aufgenommen und bei 4°C im Kühlraum über Nacht oder für eine Stunde bei RT auf einem Schwenktisch inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 x 5 min in TBS 0,5% Tween gewaschen, um nicht gebundene Antikörper zu entfernen.

Im nächsten Schritt wurde der Sekundär-Antikörper auf die Membran gegeben. Auch hier wurde die entsprechende Konzentration des Antikörpers in 15 ml TBS 0,5% Tween und 2,5% Slimfast gelöst und die Membran für mindestens 1 Stunde bei RT auf einem Schwenktisch inkubiert. In dieser Zeit band der Sekundär-Antikörper an den Primär-Antikörper.

Um nicht gebundene Antikörper zu entfernen, wurde die Membran einmal in TBS 0,5% Tween geschwenkt und anschließend 2 x 5 Minuten in TBS 0,5% Tween gewaschen. Dann wurde die Membran drei Minuten in TBS 3% Tween gewaschen, nochmals kurz in TBS 0,5% Tween geschwenkt und darauf weitere 3 Minuten in TBS 0,5% Tween gewaschen. Zuletzt wurde die Membran noch 2 x 5 Minuten in TBS gewaschen, um Tweenreste zu entfernen. Die Detektion des vom Primär-Antikörper erkannten Proteins erfolgte über das ECL-System. Hierfür wurde die Membran in eine Mischung aus 1 ml ECL-Lösung 1 und 1 ml ECL-Lösung 2 überführt und für eine Minute inkubiert.

Nach erfolgter Inkubation wurde die Membran in Klarsichtfolie eingeschlagen, damit sie nicht austrocknen konnte, und in eine Filmkassette gelegt. In einer Dunkelkammer wurde dann ein Röntgenfilm aufgelegt, um die verschiedenen Banden darzustellen.

3.8 Stripping

Um die Nitrozellulosemembran mehrfach benutzen zu können und andere Proteine zu detektieren, wurden die Primär- und Sekundär-Antikörper folgendermaßen entfernt:

Die Membran wurde in 200 ml auf 70°C erwärmten *Stripping*-Puffer mit 1,4 ml β -Mercaptoethanol gegeben und für 3 x 10 min inkubiert. β -Mercaptoethanol löst dabei die Antikörper von der Membran.

Anschließend wurde die Membran 5 x 10 min in TBS 0,5% Tween gewaschen, um β -Mercaptoethanolreste von der Membran zu entfernen. Die Nitrozellulosemembran wurde erneut für eine Stunde bei RT geblockt.

Danach konnte die Membran mit neuen Antikörpern behandelt werden.

4. Ergebnisse

4.1.1 Ansetzen der Versuche mit LY294002 und TLR-Liganden

Um die Wirkung von LY 294002 auf dendritische Zellen zu untersuchen, wurden die Monozyten aus peripherem Blut isoliert, für eine Woche im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert. An Tag 0, 2, 4, und 6 wurde GM-CSF und IL-4 hinzugefügt.

Pro Ansatz wurden 1 x 10⁸ Zellen eingesetzt.

Versuchsansatz :

Die DC wurden an Tag 5 mit verschiedenen TLR-Liganden stimuliert. An Tag 7 wurden sie mit LY294002 in verschiedenen Konzentrationen (10 µm, 20 µm, 80 µm) behandelt. An Tag 8 wurden sie geerntet und für die verschiedenen Versuche verwendet.

Tabelle 4.1 Schematische Darstellung des Versuchansatzes :

	1	2	3	4
	IL-4/GM-CSF	IL-4/GM-CSF	IL-4/GM-CSF	IL-4/GM-CSF
d5	+ TLR-L 2	+ TLR-L 2	+ TLR-L 2	+ TLR-L 2
d7	+ DMSO	+ LY 10µm	+ LY 20µm	+ LY 80µm

	5	6	7	8
	IL-4/GM-CSF	IL-4/GM-CSF	IL-4/GM-CSF	IL-4/GM-CSF
d5	+ TLR-L 3	+ TLR-L 3	+ TLR-L 3	+ TLR-L 3
d7	+ DMSO	+ LY 10µm	+ LY 20µm	+ LY 80µm

	9	10	11	12
	IL-4/GM-CSF	IL-4/GM-CSF	IL-4/GM-CSF	IL-4/GM-CSF
d5	+ TLR-L 4	+ TLR-L 4	+ TLR-L 4	+ TLR-L 4
d7	+ DMSO	+ LY 10µm	+ LY 20µm	+ LY 80µm

	13	14	15	16
	IL-4/GM-CSF	IL-4/GM-CSF	IL-4/GM-CSF	IL-4/GM-CSF
d5	+ TLR-L 7	+ TLR-L 7	+ TLR-L 7	+ TLR-L 7
d7	+ DMSO	+ LY 10µm	+ LY 20µm	+ LY 80µm

Die TLR-Liganden wurden in bei beiden Versuchsansätzen in folgenden Konzentrationen eingesetzt:

TLR- Ligand 2 (Pam3Cys) 5µg/ml (50 µl /10 ml Medium)

TLR- Ligand 3 (Poly I:C) 50 µg/ml (50 µl /10 ml Medium)

TLR- Ligand 4 (LPS) 100 ng/ml (1 µl /10 ml Medium)

TLR- Ligand 7 (R848) 2 µg/ml (20 µl /10ml Medium)

Pro Gewebekulturflasche (75 cm²) wurden 1 x 10⁸ DC in 10 ml Medium kultiviert.

4.1.2 Die Rolle von GM-CSF und IL-4 bei der Generierung der DC

GM-CSF, das dem Kulturmedium an den Tagen 0, 2, 4 und 6 zugegeben wurde, spielt eine wichtige Rolle bei der Reifung von DC, aber auch von Monozyten/ Makrophagen und Granulozyten. (Caux et al. 1992; Inaba et al. 1992) In dieser Arbeit wurde GM-CSF in einer Konzentration von 100 ng/ml verwendet.

Auch *in vivo* stimuliert GM-CSF die Proliferation von DC, Monozyten und Granulozyten, und findet deshalb klinische Anwendung in der adjuvanten Therapie von Tumorpatienten. (Demir et al. 2003; Kiertscher et al. 2003)

IL-4 führt zur Reifung und Differenzierung von DC. In diesen Versuchen wurde IL-4 wie GM-CSF an den Tagen 0, 2, 4, und 6 in einer Konzentration von 20 ng/ml eingesetzt. In früheren Arbeiten konnte bereits festgestellt werden, dass IL-4 *in vitro* die Lebensdauer von DC verlängert und außerdem zu einer geringeren Proliferation von CD14⁺ Zellen führt, was die Anzahl von DC in der Kultur erhöht. (Rougier et al. 1998)

In vivo wirkt IL-4 als anti-inflammatorisches Zytokin, indem es überschießende Entzündungsreaktionen verhindert, und spielt eine Rolle bei der B-Zell Aktivierung und der IgE Produktion.

4.2 Die Auswirkung von LY294002 auf die Reifung der mit TLR-Liganden stimulierten DC

Um festzustellen, in wie weit LY294002 den Phänotyp der DC verändert, wurden DC, die nach dem oben beschriebenen Versuchsansatz kultiviert und dabei mit unterschiedlichen Konzentrationen LY294002 behandelt worden waren mittels Durchflusszytometrie analysiert.

Bei CD14 handelt es sich um ein Oberflächenmolekül, das vor allem auf Monozyten exprimiert wird. Durch die Behandlung mit GM-CSF und IL-4 werden aus Monozyten dendritischen Zellen generiert. (Rougier et al. 1998) Um diesen Schritt zu überprüfen, wurden Zellen mit anti-CD14 angefärbt und der Phänotyp im FACS bestimmt.

Bei allen DC, die mit TLR-L stimuliert worden waren, konnte keine oder eine nur sehr geringe Expression von CD14 gemessen werden. Exemplarisch wird hier die CD14 Expression bei mit den TLR-L 2 und 4 behandelten Zellen dargestellt.

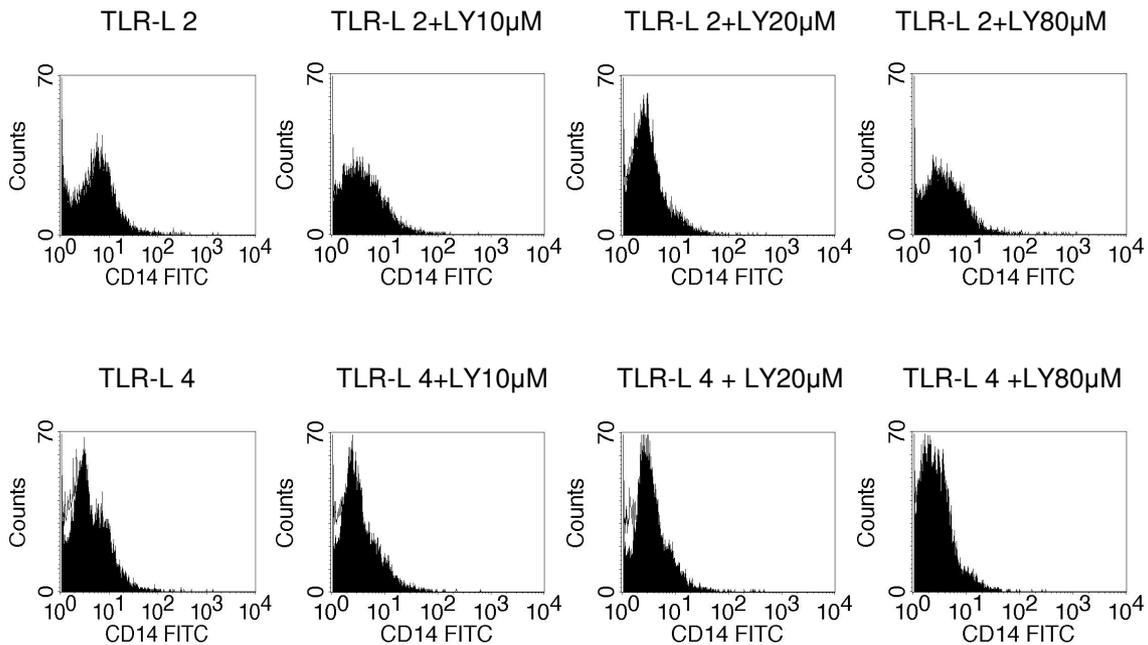


Abbildung 4.2.1

Aus Monozyten generierte DC wurden mit dem TLR-L 2 oder 4 stimuliert und anschließend mit LY294002 behandelt. Die Zellen wurden mit anti-CD14 gefärbt und im FACS gemessen.

Das Oberflächenmolekül CD1a gehört zur Klasse der CD1 Moleküle, die auf Grund ihrer ähnlichen Proteinstruktur mit den MHC I-Molekülen verwandt sind. CD1a Moleküle, die auch von reifen dendritischen Zellen exprimiert werden, sind in der Lage, Antigene zu präsentieren. (Blumberg et al. 1995; Melian et al. 1996) In dieser Arbeit wurde überprüft, inwieweit die Expression von CD1a bei den mit LY294002 behandelten Zellen verändert war. Exemplarisch sind hier DC dargestellt, die mit TLR-L 2 stimuliert wurden.

Es konnte gezeigt werden, dass die CD1a Expression mit zunehmender Konzentration von LY294002 inhibiert wurde. Jedoch war der Rückgang der CD1a Expression bei den übrigen TLR-L weniger eindeutig, als es bei anderen CD Markern beobachtet wurde.

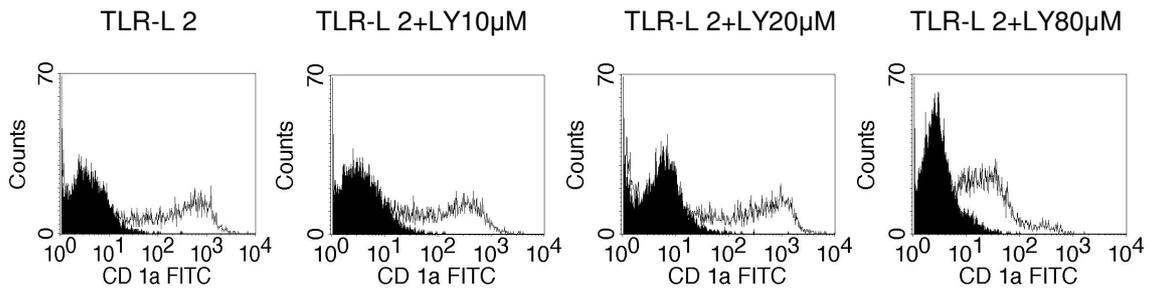


Abbildung 4.2.2

Aus Monozyten generierte DC wurden mit TLR-L 2 stimuliert und mit LY294002 in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Anschließend wurden sie mit anti-CD1a gefärbt und im FACS gemessen.

Bei DC SIGN handelt es sich um einen Lectin Rezeptor vom C-Typ, der auf DC und Makrophagen exprimiert wird. Bei dendritischen Zellen spielt DC SIGN eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von $CD4^+$ -T Zellen sowie bei der Erkennung von pathogenem Material. Es zeigte sich, dass LY294002 die Expression von DC SIGN verringert. (Banchereau et al. 2000; Geijtenbeek et al. 2000; McGreal et al. 2005)

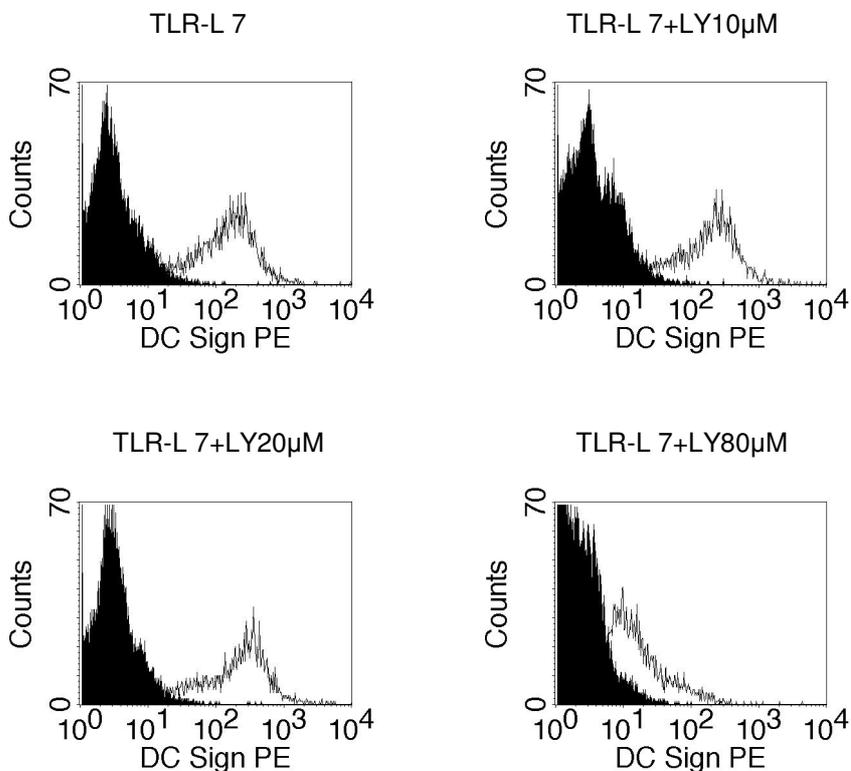


Abbildung 4.2.3

Aus Monozyten generierte DC wurden mit TLR-L 7 stimuliert und mit LY294002 behandelt. Die Zellen wurden mit anti-DC SIGN behandelt und im FACS gemessen.

Des Weiteren konnte vor allem bei mit den TLR-L 2 und 7 stimulierten DC nach der Behandlung mit LY294002 ein leichter Rückgang der Expression von CD54 festgestellt werden. Bei CD54 handelt es sich um einen Marker, der als Adhäsionsmolekül im Rahmen von Entzündungen verstärkt exprimiert wird. DC54 bewirkt die Bindung von DC an das LFA-1 Antigen (*lymphocyte-function associated antigen*) von T-Lymphozyten. (Simmons et al. 1988)

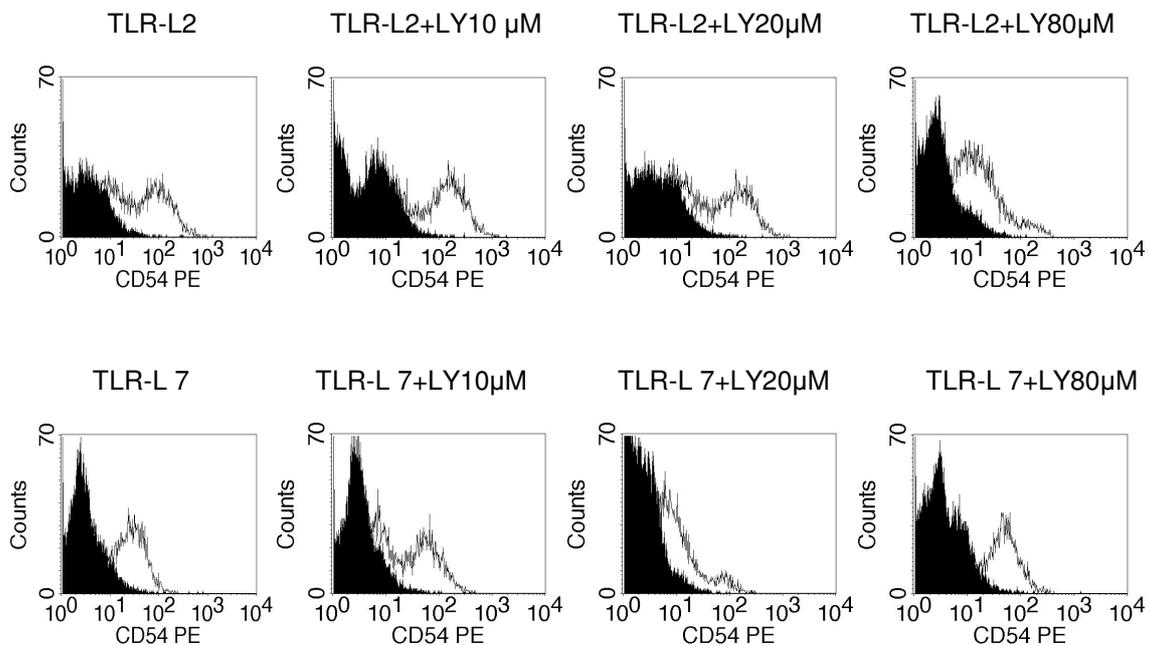


Abbildung 4.2.4

Aus Monozyten generierte DC wurden mit TLR-L 2 oder 7 stimuliert und mit LY294002 behandelt. Die Zellen wurden mit anti-CD54 behandelt und im FACS gemessen.

Der Oberflächenmarker CD83, wird nur von reifen DC exprimiert und spielt eine Rolle bei der Antigenpräsentation und zellulären Interaktion sowie der daraus folgenden Lymphozytenaktivierung. (Zhou und Tedder 1995; Lechmann et al. 2002) In den Versuchen konnte ein leichter Rückgang der CD83 Expression bei

den mit ansteigenden Konzentrationen von LY294002 behandelten DC nachgewiesen werden.

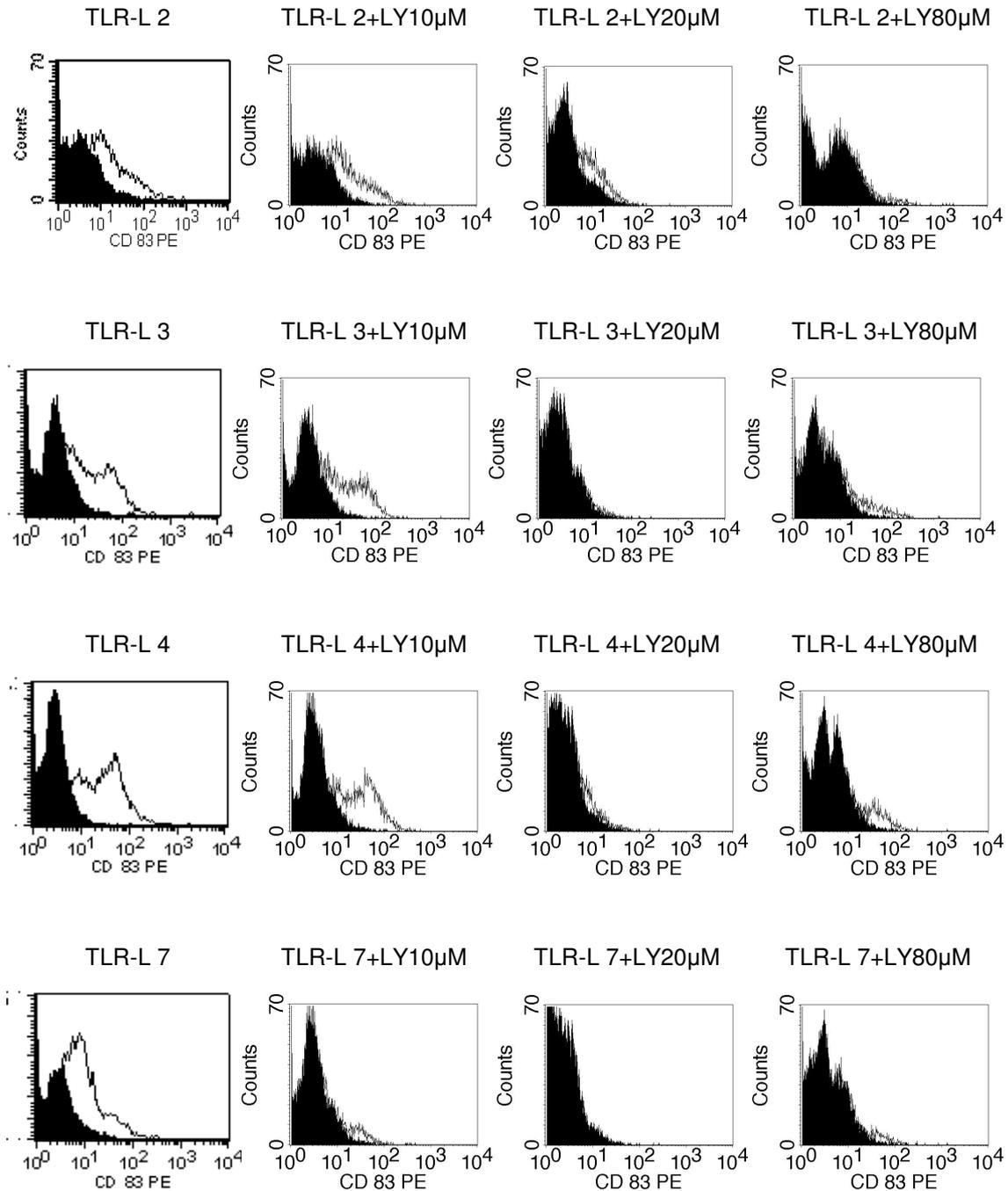


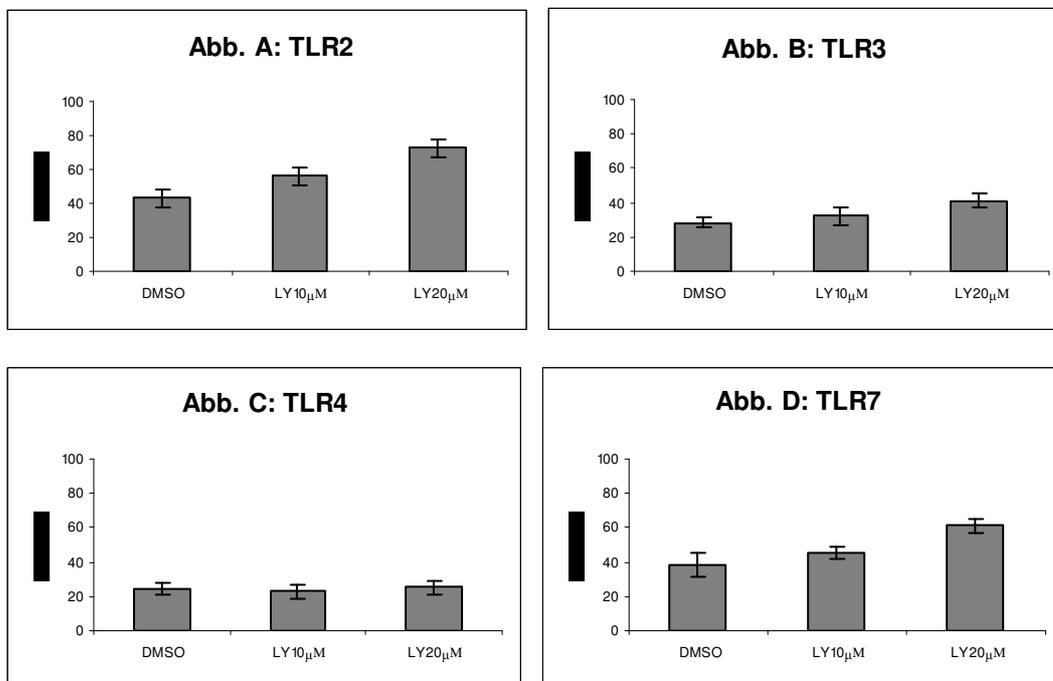
Abbildung 4.2.5

Aus Monozyten generierte DC wurden mit TLR-L 2, 3, 4 oder 7 stimuliert und mit LY294002 behandelt. Die Zellen wurden mit anti-CD83 behandelt und im FACS analysiert.

4.3 LY 294002 induziert Apoptose bei dendritischen Zellen

Bei Einwirkung von toxischen Stoffen werden Zellen apoptotisch. Dieser Zustand lässt sich bei der Apoptosemessung quantifizieren.

Die DC wurden an Tag 5 mit LY294002 in den Konzentrationen 10 μ M und 20 μ M behandelt und an Tag 7 mit den verschiedenen TLR-Liganden 2, 3, 4, oder 7 stimuliert. Die Zellen wurden nach dem Ernten mit Propidiumjodid angefärbt, inkubiert und die apoptotischen Zellen anschließend in der Durchflußzytometrie gezählt.



Abbildungen 4.3.1 A - D

Aus Monozyten generierte DC wurden mit den verschiedenen TLR-L 2, 3, 4 oder 7 stimuliert und anschließend mit den angegebenen Konzentrationen LY 294002 behandelt. Die Ergebnisse wurden im FACS gemessen. In der Abbildung werden die apoptotischen Zellen in Prozent angegeben.

In Abbildung 4.3.1 wird deutlich, dass die Anzahl apoptotischen Zellen mit steigender Konzentration von LY294002 zunimmt.

Dabei variiert die Apoptoserate abhängig vom TLR-Liganden, der zur Stimulation verwendet wurde. Die meisten apoptotischen Zellen konnten mit 72,4% bei DC, die mit TLR 2 stimuliert worden waren, gemessen werden.

Es lässt sich also darstellen, dass LY294002, als selektiver Inhibitor der PI-3-Kinase, in Signaltransduktionkaskaden der DC eingreift und Apoptose induziert.

4.4 LY 294002 inhibiert die Migrationsfähigkeit von DC

Dendritische Zellen besitzen die Fähigkeit im Gewebe zu migrieren. Dabei werden sie von Signalstoffen wie zum Beispiel Mip-3 β zum Entzündungsgeschehen geleitet.

Zur Untersuchung der Migrationsfähigkeit wurden DC verwendet, die an Tag 5 mit je einem der TLR-Liganden 2, 3, 4, oder 7 stimuliert, und an Tag 7 mit verschiedenen Konzentrationen von LY294002 behandelt worden waren.

Daraufhin wurde die Migration, wie im Methodenteil beschrieben, durchgeführt und die Anzahl der migrierten Zellen per FACS gemessen.

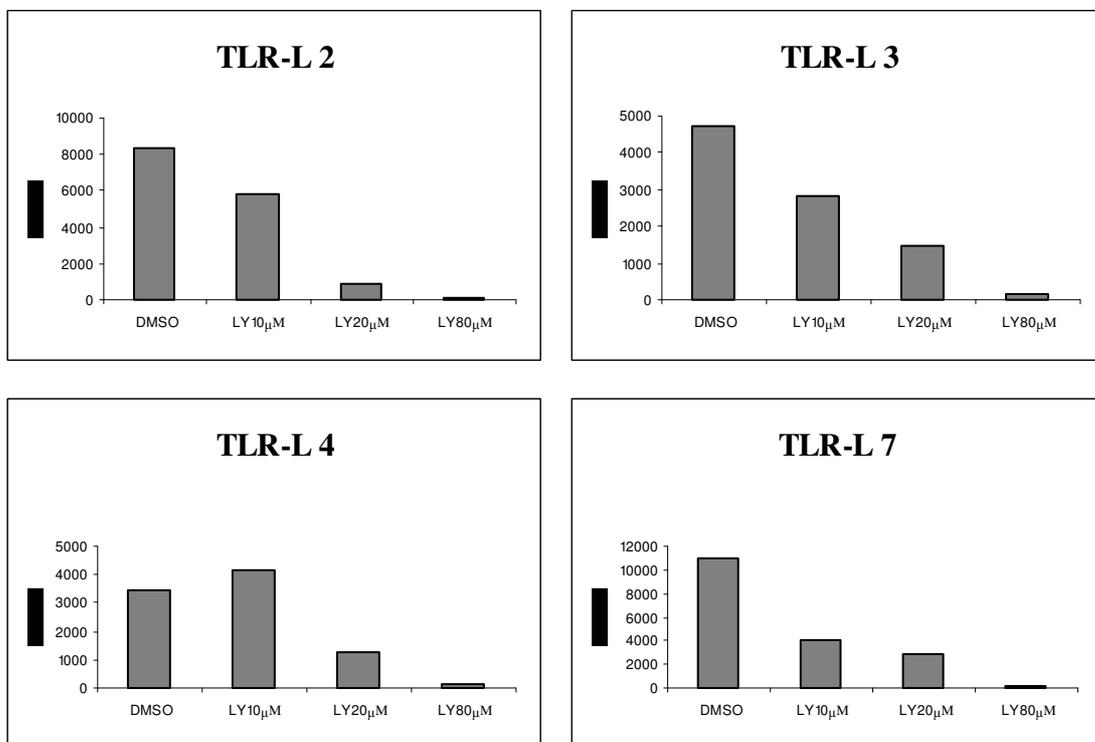


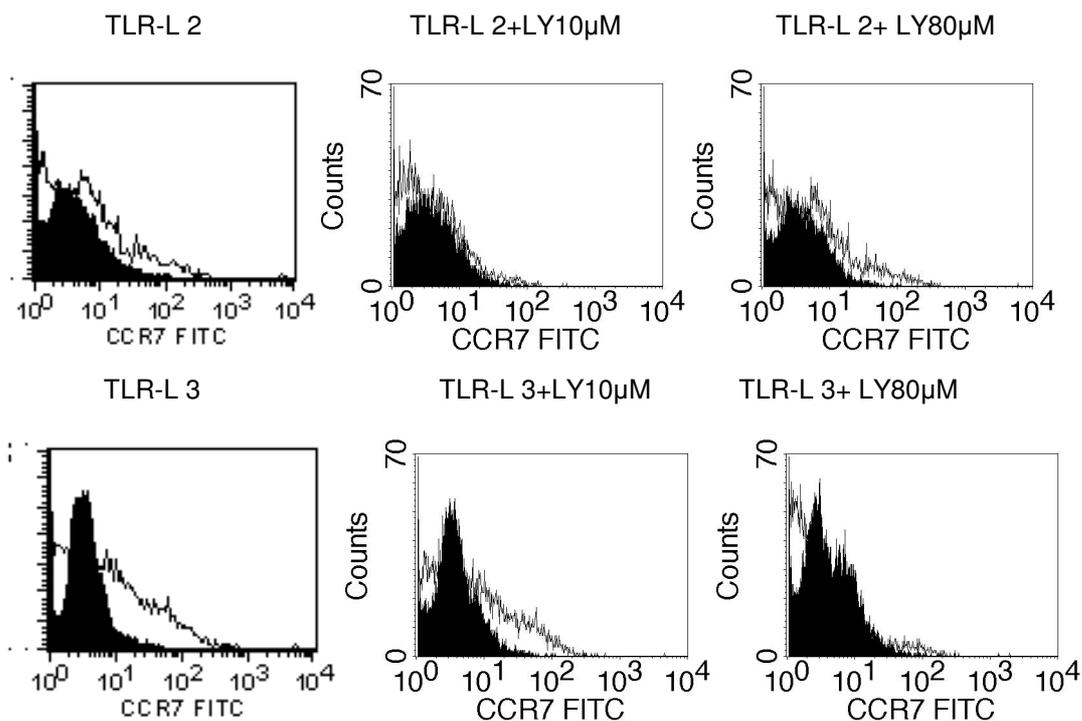
Abbildung 4.4.1

Aus Monozyten generierte DC wurden mit den TLR-L 2, 3, 4 oder stimuliert, und mit den angegebenen Konzentrationen LY294002 behandelt. Die DC Migration wurde nach 3 h Inkubation im FACS gemessen. In der Abbildung wird die Zahl der migrierten Zellen angegeben.

In Abbildung 4.4.1 ist zu sehen, dass DC, die nur mit TLR-Liganden stimuliert wurden, eine hohe Migrationsbereitschaft zeigen. Bei zunehmenden Konzentrationen von LY294002 nimmt die im FACS gemessene Zahl der migrierten DC ab. Bei sehr hohen LY294002 Konzentrationen von 80 μ M konnten kaum noch migrierte Zellen gemessen werden.

Unter anderem spielt der CCR7 Rezeptor eine Rolle bei der Migration dendritischer Zellen. Bei dem CCR7 Rezeptor handelt es sich um einen Chemokinrezeptor, der durch spezielle Chemokine stimuliert wird und daraufhin die dendritischen Zellen zur Migration

anregt. Um festzustellen, ob es bei den in der Migration gehemmten Zellen auch zu einer verringerten Expression des CCR7 Rezeptors kommt, wurden DC mit TLR-L und LY294002 behandelt, mit einem fluoreszierenden anti-CCR7 Antikörper markiert und die Expression von CCR7 im FACS analysiert.



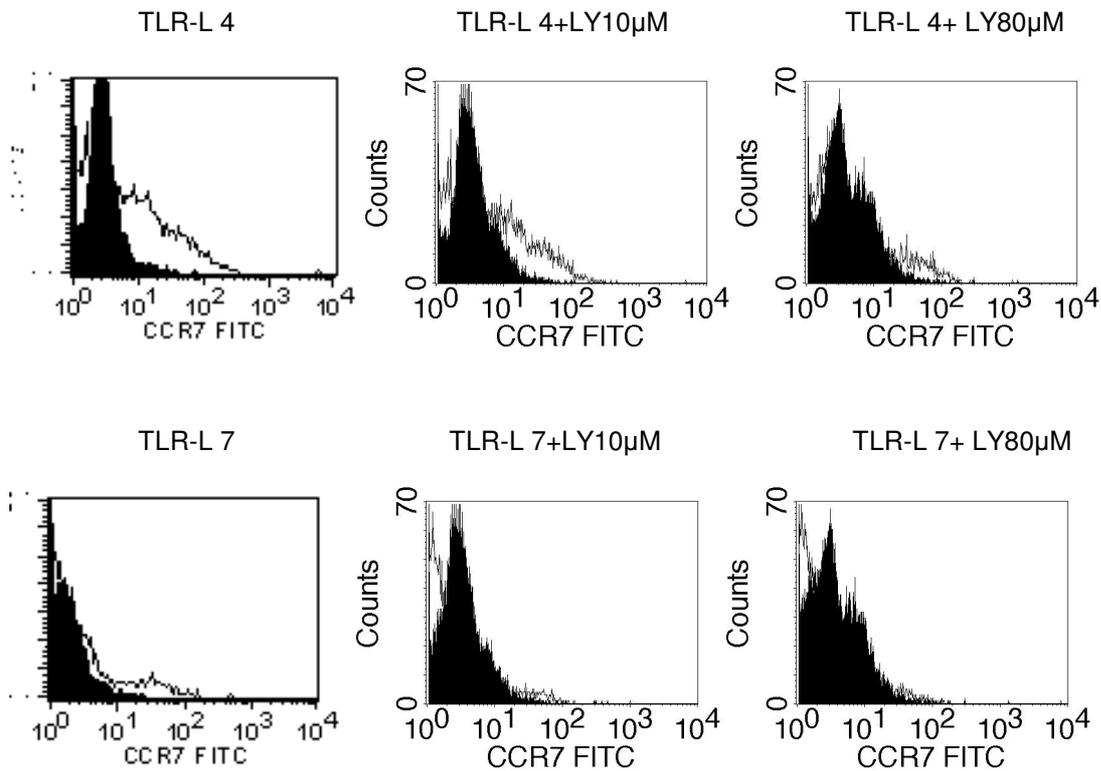


Abbildung 4.4.2

Aus Monozyten generierte DC wurden mit den TLR-L 2, 3, 4, oder 7 stimuliert und mit LY294002 in unterschiedlichen Konzentrationen (10 μ M, 80 μ M) behandelt. Anschließend wurden die DC mit anti-CCR7 gefärbt und im FACS gemessen.

4.5 LY294002 reduziert die allo-stimulatorische Fähigkeit von DC

Reife DC sind in der Lage, bei Antigenkontakt zu den Lymphknoten zu migrieren und dort naive T-Lymphozyten zu Wachstum und Proliferation zu stimulieren.

Auf diesem Prinzip basiert die MLR: Es wurde überprüft in wie weit speziell vorbehandelte DC noch in der Lage waren T-Lymphozyten zur Proliferation anzuregen. Dabei wurden die T-Lymphozyten mit ³H-Thymidin angefärbt und mittels Durchflußzytometrie analysiert.

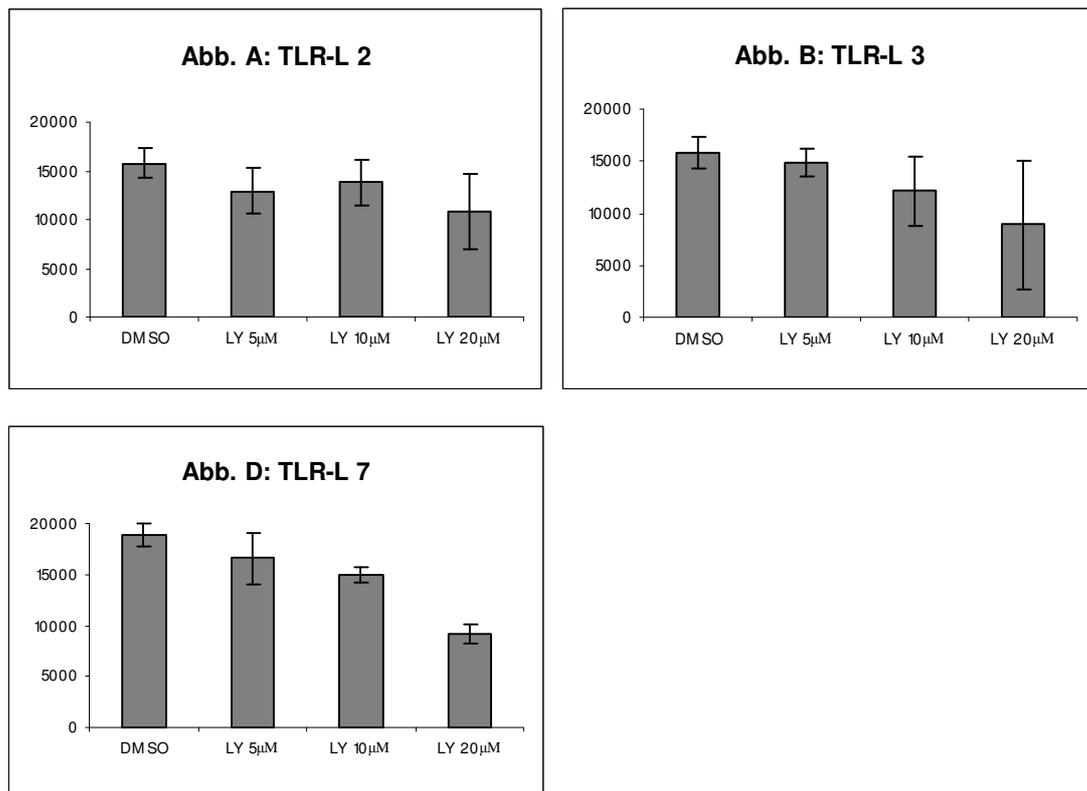


Abbildung 4.5.1 A-D

Aus Monozyten generierte DC wurden mit den TLR-Liganden 2, 3 oder 7 stimuliert und mit verschiedenen Konzentrationen LY294002 (5 μ M, 10 μ M, 20 μ M) behandelt. Danach wurden die Zellen geerntet und als Stimulatoren für einen MLR verwendet. Die allogene T-Zell Proliferation wurde an Tag 5 durch die 3 H-Thymidin Aufnahme gemessen.

4.6 Die Auswirkung von LY294002 auf intrazelluläre Signalwege

4.6.1 LY294002 blockiert die Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren

Die Stimulation der DC mit den TLR-Liganden löst in den Zellen spezifische Prozesse aus, die zur Aktivierung von verschiedenen Genen führen. Allen TLR-L gemeinsam ist die Aktivierung von NF- κ B, wobei besonders TLR-L 4 zu einer starken Expression von NF- κ B führt.

Zur NF- κ B Familie gehört unter anderem auch RelB, das eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von DC spielt.

Um zu untersuchen, in wie weit apoptotisch wirkende Substanzen wie LY294002 Einfluss auf das Vorhandensein von Transkriptionsfaktoren in dendritischen Zellen haben, wurden Kernextrakte über SDS-Page aufgetrennt, von diesen Westernblots angefertigt und die Expression von RelB untersucht. Besonders bei DC, die mit den TLR-Liganden 4 oder 7 stimuliert worden waren, konnte bei steigenden Konzentrationen von LY294002 eine verringerte Expression von RelB nachgewiesen werden.

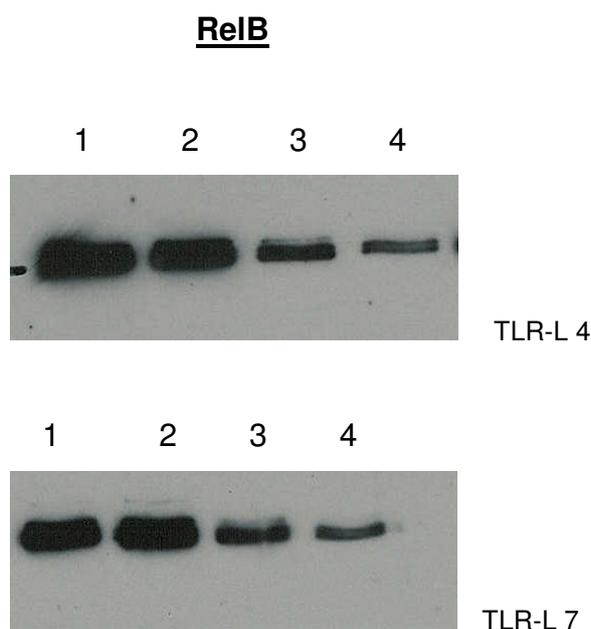


Abbildung 4.6.1.1 Analyse von Kernextrakten auf Expression von RelB.

(1) DC mit TLR-L 4/7 (2) DC mit TLR-L 4/7 + 10 µM

(3) DC mit TLR-L 4/7 + 20 µM LY (4) DC mit TLR-L 4/7 + 80 µM LY

Die Abbildung 4.6.1.1 zeigt, dass DC, die mit den TLR-L 4 oder 7 behandelt wurden, eine starke Expression von NF-κB zeigen. Bei einer geringen Konzentration von LY294002 von 10 µM zeigt sich bereits eine verminderte Expression im Westernblot.

Des Weiteren wurden auch die Transkriptionsfaktoren der Interferon-Regulator-Faktor-Familie (IRF) untersucht, die eine große Bedeutung bei der Immunität

gegenüber viralen Infekten haben. Dabei werden IRF in Folge der viralen Infektion spezifisch aktiviert, phosphoryliert und wandern dann in den Kern, wo sie an Promotoren binden, die die antivirale Genexpression steuern. Durch diese Aktivierungskaskade kommt es zur Ausschüttung von IFN.

Die Familie der IRF besteht aus den Faktoren IRF 1 bis IRF 7, IRF 8/ICSBP und ISGF3.

Um zu untersuchen in wie weit LY294002 Einfluss auf die Aktivität der IRF hat, wurden Kernextrakte der DC über SDS-Page aufgetrennt, von diesen Westernblots angefertigt und auf die Aktivität von IRF 3 und IRF 8 untersucht.

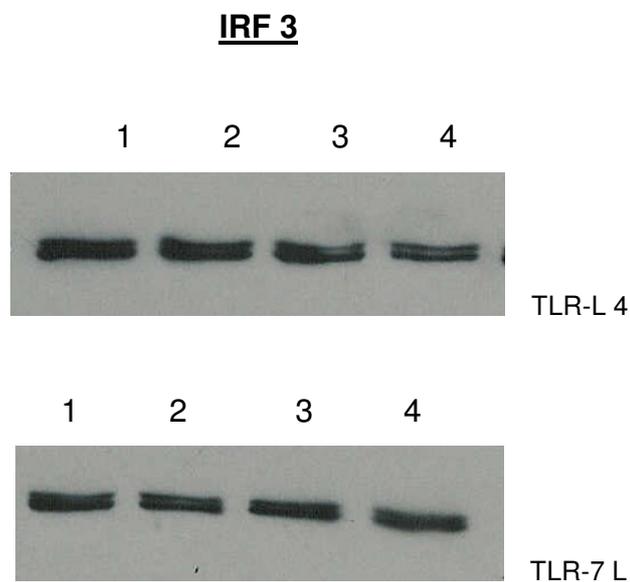


Abbildung 4.6.1.2 Analyse von Kernextrakten mit TLR-L 4/7 auf Expression von IRF 3

(1) DC mit TLR-L 4/7 (2) DC mit TLR-L 4/7 + 10 μ M LY

(3) DC mit TLR-L 4/7 + 20 μ M LY (4) DC mit TLR-L 4/7 + 80 μ M LY

IRF 8

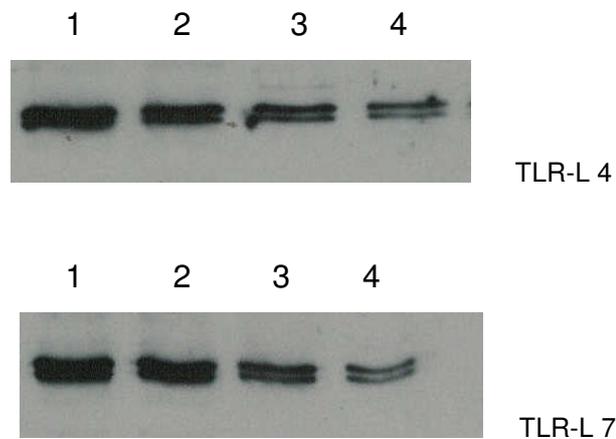


Abbildung 4.6.1.3 Analyse von Kernextrakten mit TLR-L 4/7 auf Expression von IRF 8
(1) DC mit TLR-L 4/7 (2) DC mit TLR-L 4/7 + 10 μ M LY
(3) DC mit TLR-L 4/7 + 20 μ M LY (4) DC mit TLR-L 4/7 + 80 μ M LY

In den Abbildungen 4.6.1.2 und 4.6.1.3 erkennt man, dass eine steigende Konzentration von LY294002 zu einer Abnahme der Expression vor allem von IRF 8 führt. Bei IRF 3 zeigte sich keine signifikante Abnahme der Expression, was darauf zurückzuführen ist dass IRF 3 über den MyD88 unabhängigen Signalweg aktiviert wird.

5. Diskussion

Dendritische Zellen, die auf Grund ihrer bäumchenartigen Ausläufer (lat. dendriticus = verzweigt) ihren Namen bekamen, wurden erstmals von Steinmann *et al* beschrieben. (Steinman und Cohn 1973). Zusammen mit den Monozyten und den B-Lymphozyten zählen sie zu den professionellen Antigen-präsentierenden Zellen (APC) des Immunsystems, und sind in der Lage, eine primäre Immunantwort zu initiieren. Dendritische Zellen werden als die potentesten der APC angesehen, da sie größere Mengen an MHC I und MHC II-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen wie B7-1 und B7-2 exprimieren als die anderen professionellen APC. (Scheinecker et al. 1998)

Auf Grund ihrer Funktion als professionelle APC spielen dendritische Zellen eine wichtige Rolle bei der Antigenprozessierung und Antigenpräsentation und sind in der Lage primäre zytotoxische T-Zellantworten zu induzieren.

Wie die meisten anderen Zellen eines Organismus sind DC in der Lage, bei einer Schädigung der Zelle einen „physiologischen Untergang der Zelle“, die Apoptose durchzuführen. Dieser Prozess wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht: Die DC wurden mit LY294002, einem Inhibitor der PI3-Kinase, behandelt, und die Wirkung dieses Stoffes auf die DC anhand verschiedener Versuche untersucht.

Beim PI3-Kinase Signalweg handelt es sich um einen in allen eukaryotischen Zellen vorkommenden Signalweg, der bei Aktivierung zur Stimulation zahlreicher zellulärer Prozesse wie Wachstum, Proliferation, Beweglichkeit und Überlebensfähigkeit der Zelle führt, während eine Inhibierung des PI3-Kinase Signalwegs zur Herunterregulierung und Apoptose der Zelle führt.

Außer dem PI3-Kinase Signalweg spielen auch der Raf/MEK/ERK Pathway (*extracellular signal-regulated kinase*) und der p38 MAPK Signalweg (*mitogen activated protein kinase*) eine wichtige Rolle bei der Regulation der verschiedenen Zellfunktionen und bei der Überlebensfähigkeit der Zellen. (McCubrey et al. 2001; Yu et al. 2004)

Die Toll-like Rezeptoren stellen einen Bestandteil der ursprünglichen Immunabwehr dar und sind sowohl bei Menschen als auch bei verschiedenen Tierarten nachweisbar. Sie sind in der Lage, krankheitsspezifische molekulare „Muster“ zu erkennen.

Die Effekte der TLR-Liganden auf Wachstum und Differenzierung von DC wurden bereits in verschiedenen Arbeiten untersucht. (Akira und Takeda 2004) Dabei stellte sich heraus, dass die verschiedenen TLR-L unterschiedlich stark auf die Reifung der DC Einfluss nehmen, je nachdem welche Oberflächenantigene von den DC exprimiert werden. (Sioud und Floisand 2007) So konnte zum Beispiel bei mit TLR-L 3 oder 4 stimulierten DC eine verminderte Phagozytoseaktivität von apoptotischen Tumorzellen nachgewiesen werden. Dieser Effekt traf jedoch nicht für die TLR-L 2 und 7 zu. (Weck et al. 2007)

Da DC im peripheren Blut nur eine Subpopulation von 0,1 – 0,9% der dort vorhandenen Leukozyten darstellen, ist deren Isolation sehr schwierig und zeitaufwendig. (Fearnley et al. 1999; Szabolcs et al. 2003) Die meisten DC im Organismus befinden sich in den primären und sekundären lymphatischen Organen, wie Milz, Thymus, Knochenmark und Lymphknoten. (Shortman und Liu 2002) Um DC in den für die Untersuchungen ausreichenden Mengen zu gewinnen, war es also nicht möglich, DC direkt aus dem Blut zu isolieren. Es bestehen jedoch diverse Möglichkeiten DC *in vitro* zu generieren, zum Beispiel aus Knochenmarkszellen (Inaba et al. 1992) oder aus Monozyten des peripheren Blutes. (Zhou und Tedder 1996)

Bei allen *in vitro* kultivierten DC ist jedoch zu bedenken, dass sich die DC-Populationen je nach verwendeten Ausgangszellen sowie den gewählten Kulturbedingungen erheblich voneinander unterscheiden können. (Ardavin et al. 2001)

In dieser Arbeit wurden ausschließlich aus Monozyten generierte DC verwendet, die mit den Zytokinen GM-CSF und IL-4 im Kulturmedium angezchtet wurden. (Sallusto und Lanzavecchia 1994; Romani et al. 1996)

Diese wurden mit unterschiedlichen Konzentrationen des PI3-K Inhibitors LY294002 behandelt und mit den TLR-Liganden 2, 3, 4 und 7 stimuliert.

Um die Auswirkungen von LY294002 auf die mit den verschiedenen TLR-Liganden stimulierten DC zu untersuchen, wurde zuerst per Durchflusszytometrie der Phänotyp untersucht:

Bei CD14 handelt es sich um ein Oberflächenmolekül, das nur bei Monozyten, nicht aber bei reifen DC exprimiert wird. Es ließ sich nachweisen, dass es zu keiner Expression von CD14 kam und somit davon auszugehen war, dass die Monozyten zu DC gereift waren.

Auch das Oberflächenmolekül CD1a, das in der Lage ist Antigene zu präsentieren, wurde bei den mit LY294002 behandelten DC geringer exprimiert. Das bedeutet, dass die DC in ihrer Funktion als APC eingeschränkt waren, und vermindert in der Lage waren, naive T-Zellen zu aktivieren.

Außerdem wurden die Auswirkungen der Behandlung mit LY294002 auf die beiden Adhäsionsmoleküle CD54 und DC-SIGN untersucht. Diese Oberflächenmoleküle spielen eine wichtige Rolle bei der Interaktion von DC mit T-Zellen. DC-SIGN ist das einzige Adhäsionsmolekül, das nur auf DC vorkommt. (Geijtenbeek et al. 2000) In dieser Arbeit konnte festgestellt werden, dass sowohl CD54 als auch DC SIGN bei steigenden Konzentrationen von LY294002 vermindert exprimiert wurden.

Durch die verminderte Expression dieser Moleküle kommt es zu einer verminderten Interaktion der DC mit den T-Zellen, wodurch eine Aktivierung der T-Zelle unwahrscheinlicher wird.

Ein weiteres Oberflächenmolekül, das durch die Behandlung mit LY294002 weniger exprimiert wurde, ist der Aktivierungsmarker CD83. Durch die Inhibierung der Expression von CD83 zeigte sich, dass die Reifung der DC unterdrückt wird.

Aufgrund dieser Veränderungen im Phänotyp, wurden die DC daraufhin funktionell analysiert.

Zunächst wurde die Apoptoserate der DC nach Behandlung mit LY294002 untersucht: Es wurde bereits beschrieben, dass eine Behandlung von Zellen mit

LY294002 zu einer erhöhten Apoptoserate, einem verminderten Wachstum der Zellen und einer geringeren Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF α führt. (Ardeshna et al. 2000; Guha und Mackman 2001; Xie et al. 2005) Auch in dieser Arbeit zeigte sich, dass es unter der Behandlung von LY294002 zu einer gesteigerten Apoptoserate kommt. Eine gesteigerte Apoptoserate von DC im Organismus führt zu einer eingeschränkten Funktionsfähigkeit des Immunsystems, was für den Organismus wiederum eine hohe Anfälligkeit für Infektionen bedeutet.

Die erhöhte Apoptoserate nach LY294002-Behandlung beschränkt sich jedoch nicht nur auf DC, sondern trifft auch auf zahlreiche andere Zellarten im Organismus zu. So zeigte sich, dass es auch bei kanzerösen Zellen zu einer gesteigerten Apoptoserate kommt. (Axelson et al. 2005) Über diesen Mechanismus wäre eine Eliminierung von kanzerösen Zellen möglich.

Eine besondere Fähigkeit von reifen DC besteht darin, nach Antigenkontakt zu den Lymphknoten zu migrieren und die dort vorhandenen T-Zellen zu aktivieren. In dieser Arbeit zeigte sich, dass die DC bei steigenden Konzentrationen von LY294002 weniger migrieren konnten. (Del Prete et al. 2004) Die eingeschränkte Migrationsfähigkeit der DC führt in vivo dazu, dass die DC nicht mehr in die Lymphknoten migrieren können, und dadurch auch nicht mehr fähig sind, die in den Lymphknoten lokalisierten T-Zellen zur Proliferation anzuregen.

Der CCR7 Rezeptor, der unter anderem auf DC exprimiert wird, spielt eine wichtige Rolle bei der Migration von DC. Er ist in der Lage Chemokine wie MIP-3 β zu binden. Die Chemokine stimulieren die DC zur Migration zu Entzündungsorten. (Moldenhauer et al. 2006; Hansson et al. 2006) Es zeigte sich, dass LY294002-Behandlung zu einer verminderten Expression des CCR7 Rezeptors führte. Dies bedeutet, dass mit LY294002 behandelten DC die auf Grund der verringerten Expression von CCR7 weniger auf Chemokine wie MIP-3 β reagieren können nicht in der Lage sind zu den Lymphknoten zu wandern und deshalb ihre Fähigkeit als APC nicht erfolgreich ausüben können.

Da die Aufgabe der APC darin besteht, nach Aufnahme von Antigenen die T-Lymphozyten zu aktivieren und zur Proliferation anzuregen, wurde anhand

eines MLR untersucht in wie weit die mit TLR-L stimulierten und mit verschiedenen Konzentrationen von LY294002 behandelten DC noch in der Lage waren T-Zellen zur Proliferation anzuregen. Wie sich zeigte, haben mit LY294002 behandelte DC stark eingeschränkte allo-stimulatorische Fähigkeiten. Das bedeutet, dass die T-Zellen nicht mehr in der Lage sind die B-Zell vermittelte Antikörperproduktion zu aktivieren, und auch ihre Aufgaben als zytotoxische T-Zellen nicht mehr effektiv ausüben können. Auch dieser Zusammenhang zeigt, dass die inhibierten DC zu einer eingeschränkten Funktionsfähigkeit des Immunsystems führen.

Der Transkriptionsfaktor IRF 3 spielt eine wichtige Rolle bei der MyD88 unabhängigen Signaltransduktion der TLR-L 3 und 4. (Yamamoto et al. 2003; Fitzgerald et al. 2003) Die Aktivierung von IRF 3 führt zur Produktion von IFN α und β , die wiederum bei der Initiierung der Immunantwort mitwirken. Die IFN β -Produktion wird jedoch auch über andere Signalwege aktiviert, da Aksoy *et al* herausfanden, dass es bei einer Inhibierung der PI3-Kinase zwar zu einer verringerten Expression von IRF 3, gleichzeitig aber auch zu einer gesteigerten Expression von IFN β kommt. Außerdem ließ sich eine gesteigerte Expression von NF- κ B nachweisen. (Aksoy et al. 2005)

Mit Hilfe von Western Blots konnte die Aktivität von IRF 3 untersucht werden. Es stellte sich heraus, dass die Expression von IRF 3 bei zunehmenden Konzentrationen von LY294002 nur geringfügig abnahm.

Bei IRF 8/ICSBP handelt es sich ebenfalls um einen Transkriptionsfaktor, der unter anderem bei der Differenzierung und der Antigenaufnahme von DC mitwirkt. (Mattei et al. 2006; Gabriele und Ozato 2007) Außerdem ist es an der IL-12 Produktion beteiligt und verfügt über eine anti-onkologische Aktivität. (Schmidt et al. 1998; Xiong et al. 2005) Auch die Aktivität von IRF 8 wurde in dieser Arbeit bestimmt. Es zeigte sich wie erwartet eine abnehmende Expression von IRF 8 bei steigenden Konzentrationen von LY294002. Dies zeigt, dass es durch die Behandlung mit LY294002 zu einem Eingriff in die Mechanismen der DC kommt und die Zellen in ihrer Funktion beeinträchtigt sind.

RelB ist ein Mitglied der NF- κ B Transkriptionsfamilie und wirkt bei der Expression von Genen, die an der Aktivierung der Immunantwort beteiligt sind, mit. Es wurde herausgefunden, dass die TLR-L eine wichtige Rolle bei der Aktivierung der NF- κ B Transkriptionsfamilie spielen. (Lyakh et al. 2000). Daher wurde in dieser Arbeit auch die Expression von RelB untersucht. Wie sich zeigte war die RelB Expression im Western Blot bei steigenden LY294002 Konzentrationen vermindert. Es besteht also eine sehr enge Verknüpfung zwischen den Signalwegen der TLR-L und den Aktivierungen, die über den PI3-K Signalweg laufen. Insofern sollten noch weitere Versuche durchgeführt werden, die die Aktivierung der NF- κ B Transkriptionsfaktoren genauer untersuchen.

Der PI3- Kinase Signalweg könnte in Zukunft eine große Bedeutung im medizinischen Bereich haben. Es wurde herausgefunden, dass verschiedenste Stoffe und Moleküle *in vivo* als auch *in vitro* den PI3-Kinase Signalweg beeinflussen. Dazu zählt z.B. Id-1 (*inhibitor of differentiation or DNA binding*), das in verschiedenen Krebszellen gefunden wurde und den PI3-Kinase Signalweg aktiviert, was bedeutet, dass es zu Wachstum und Proliferation der entarteten Zellen führt. (Li et al. 2007) Substanzen wie LY294002, die zu einer Inhibierung der PI3-Kinase führen, könnten zukünftig in solchen Zusammenhängen eine Rolle spielen, da sie in der Lage wären, maligne entartete Zellen durch Inhibierung der PI3-Kinase apoptotisch werden zu lassen. Besonders bei Krebsarten, die sehr schnell wachsen, könnte diese zukünftige Therapiemöglichkeit von besonders großer Bedeutung sein. (Chen et al. 2005)

Auf der anderen Seite zeigte sich in dieser Arbeit, dass gesunde Zellen, wie in diesem Fall DC durch die Behandlung mit LY294002 in ihrer Funktionsfähigkeit sehr stark eingeschränkt sind bzw. apoptotisch werden, und nicht mehr in der Lage sind das Immunsystem zu aktivieren. Bei einer Behandlung von kanzerösen Zellen mit PI3-K Inhibitoren, ist diese Erkenntnis von großer Bedeutung. In Zukunft sollte noch weiter nach Möglichkeiten geforscht werden z.B. durch lokale Anwendung von inhibitorischen Substanzen nur die entarteten Zellen zu eliminieren, und die gesunden Zellen zu umgehen, um

Funktionseinschränkungen und –ausfälle des Organismus so gut wie möglich zu vermeiden.

6. Zusammenfassung

Bei DC handelt es sich um die effektivsten Antigen-Präsentierenden Zellen des Immunsystems. Sie besitzen die Fähigkeit in der Peripherie Antigene aufzunehmen, diese zu prozessieren und dann zu Lymphknoten zu migrieren, wo sie die naiven T-Zellen aktivieren.

Der PI3-Kinase Signalweg spielt dabei eine wichtige Rolle bei Wachstum, Proliferation, Migration und Überlebensfähigkeit der Zelle. Mit Hilfe des PI3-Kinase Inhibitors LY294002, war es möglich, die Rolle der PI3-K bei der Aktivierung von DC mit den TLR-L 2, 3, 4, und 7 zu analysieren.

Für die Versuche wurden aus Monozyten generierte DC verwendet. Es zeigte sich, dass die mit LY294002 behandelten DC sich phänotypisch verändern. In der Durchflusszytometrie konnte eine verminderte Expression der Oberflächenmoleküle CD1a, DC SIGN, CD54 und CD83 festgestellt werden. Des Weiteren wurden die mit LY294002 behandelten DC auf ihre Migrationsfähigkeit hin untersucht. Es stellte sich heraus, dass die DC bei Inhibierung des PI3-Kinase Signalwegs weniger migrieren. Auch der CCR7 Rezeptor, der in der Lage ist migrationsstimulierende Chemokine zu binden, wird vermindert exprimiert.

Die DC waren auch bei der Aktivierung der T-Lymphozyten gehemmt, was sich im MLR nachweisen ließ. Außerdem kam es zu einer Inhibierung der Transkriptionsfaktoren IRF 3, IRF 8, und RelB. Diese Effekte werden zum Teil durch die Induktion von Apoptose bedingt.

Dies bedeutet, dass die DC durch die Behandlung mit LY294002 nicht mehr in der Lage sind, ihre Funktion als APC suffizient auszuführen. Für die Medizin könnte diese Erkenntnis von großer Bedeutung sein, da eine Inhibierung des PI3-K Signalwegs bei malignen Zellen derzeit als therapeutisches Prinzip evaluiert wird, um maligne Zellen gezielt zu eliminieren.

Andererseits ist zu bedenken, dass die Inhibierung des PI3-K Signalwegs bei gesunden Zellen die physiologischen Vorgänge des Organismus behindern würde. Die Inhibierung der DC würde bedeuten, dass die DC ihre Rolle als APC nicht mehr ausüben könnten, und der Organismus deshalb über ein defektes Immunsystem verfügen würde, was ihn für Infektionen sehr anfällig machen würde.

Zusammenfassend kann man sagen, dass diese Arbeit den Signalweg der PI3-Kinase näher untersucht, um seine Bedeutung auf Wachstum und Differenzierung von DC besser zu verstehen. Dieses Verständnis könnte in Zukunft in der Tumorthherapie eine wichtige Rolle spielen.

Abkürzungsverzeichnis

AG	Arbeitsgruppe
AK	Antikörper
AP	Ammoniumpersulfat
APC	<i>Antigen presenting cell(s)</i> (Antigen-präsentierende Zellen)
APS	Ammoniumperoxodisulfat
BCA	Bicinchoninsäure
BSA	Bovines Serumalbumin
CD	<i>Cluster(s) of differentiation</i>
CD40-L	CD40-Ligand
CLIP	<i>Class-II-associated-invariant-chain-peptide</i>
CTL	<i>Cytotoxic T lymphocyte(s)</i> (zytotoxische T-Lymphozyten)
d	<i>day</i>
DC	<i>Dendritic Cell(s)</i> (dendritische Zellen)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithiothreitol
ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
EGTA	Ethylendiamintetraacetat
EGTA	Ethylen-Bis-(Oxyethylenitrilo)-Tetraacetat
ER	Endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i> (Durchflusszytometer)
FCS	<i>fetal calf serum</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
GILT	<i>Gamma-Interferon-induced lysosomal thioreductase</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor</i>

HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> (Meerrettichperoxidase)
HSP	Hitzeschockprotein
IRF 3	<i>Interferon-regulatory Factor 3</i>
IRF 8	<i>Interferon-regulatory Factor 8</i>
IL-1R	<i>Interleukin-1 Receptor</i>
LBP	LPS-bindendes Protein
LPS	Lipopolysaccharid
LC	Langerhans-Zellen
MHC I	<i>major histocompatibility complex I</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-I)
MHC II	<i>major histocompatibility complex II</i> (Haupthistokompatibilitätskomplex-Klasse-II)
min	Minute
MIP-3 β	Makrophagen inflammatorisches Protein 3-beta
MPS	Mononukleäres phagozytierendes System
Na-O-V	<i>Natriumorthovanadat</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NP-40	Nonidet P-40
PBMNC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> (mononukleäre Zellen des peripheren Blutes)
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PDK	<i>Phosphatidylinositol-dependent kinases</i>
PE	Phycoerythrin
PI3-K	Phosphatidyl -Inositol 3 Kinase
PKB	Proteinkinase B
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PRR	<i>pattern recognition receptor</i>
RIPA	Puffer für Radioimmun-Präzipitations-Assay
RPMI	Roswell Park Memorial Institut: 1640-Zellkulturmedium

RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>Sodium dodecylsulphate</i>
SDS-PAGE	<i>Sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SSC	<i>Side scatter</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TAP	<i>Transporter associated with antigen processing</i>
TBS	<i>Tris buffered saline</i>
TBST	<i>Tris buffered saline with Tween-20</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
T _H 1	T-Helfer-Zellen-1
T _H 2	T-Helfer-Zellen-2
TLR	Toll like receptor (Toll ähnliche Rezeptoren)
TLR-L	Toll like receptor-Ligand
TNF	Tumornekrose-Faktor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>unit</i> (Einheit)

8.Literaturverzeichnis

Aderem, A. und Ulevitch, R. J. (2000) Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. *Nature* 406: 782-787.

Aderem, A. und Underhill, D. M. (1999) Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 593-623.

Akira, S. und Takeda, K. (2004) Functions of toll-like receptors: lessons from KO mice. *C. R. Biol.* 327: 581-589.

Aksoy, E., Vanden Berghe, W., Detienne, S., Amraoui, Z., Fitzgerald, K. A., Haegeman, G., Goldman, M. und Willems, F. (2005) Inhibition of phosphoinositide 3-kinase enhances TRIF-dependent NF-kappa B activation and IFN-beta synthesis downstream of Toll-like receptor 3 and 4. *Eur. J. Immunol.* 35: 2200-2209.

Alexopoulou, L., Holt, A. C., Medzhitov, R. und Flavell, R. A. (2001) Recognition of double-stranded RNA and activation of NF-kappaB by Toll-like receptor 3. *Nature* 413: 732-738.

Anderson, K. V. und Nusslein-Volhard, C. (1984) Information for the dorsal-ventral pattern of the *Drosophila* embryo is stored as maternal mRNA. *Nature* 311: 223-227.

Arcaro, A. und Wymann, M. P. (1993) Wortmannin is a potent phosphatidylinositol 3-kinase inhibitor: the role of phosphatidylinositol 3,4,5-trisphosphate in neutrophil responses. *Biochem. J.* 296 (Pt 2): 297-301.

Ardavin, C., Martinez, d. H., Martin, P., Anjuere, F., Arias, C. F., Marin, A. R., Ruiz, S., Parrillas, V. und Hernandez, H. (2001) Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol.* 22: 691-700.

Ardeshna, K. M., Pizzey, A. R., Devereux, S. und Khwaja, A. (2000) The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood* 96: 1039-1046.

Axelson, J., Lindell, M., Horlin, K. und Ohlsson, B. (2005) Inhibition of different intracellular signal cascades in human pancreatic cancer cells. *Pancreatology.* 5: 251-258.

BACH, F. und HIRSCHHORN, K. (1964) LYMPHOCYTE INTERACTION: A POTENTIAL HISTOCOMPATIBILITY TEST IN VITRO. *Science* 143: 813-814.

Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y. J., Pulendran, B. und Palucka, K. (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 18: 767-811.

Banchereau, J. und Steinman, R. M. (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 392: 245-252.

Blumberg, R. S., Gerdes, D., Chott, A., Porcelli, S. A. und Balk, S. P. (1995) Structure and function of the CD1 family of MHC-like cell surface proteins. *Immunol. Rev.* 147: 5-29.

Budd, R. C. (2001) Activation-induced cell death. *Curr. Opin. Immunol.* 13: 356-362.

Bulut, Y., Faure, E., Thomas, L., Karahashi, H., Michelsen, K. S., Equils, O., Morrison, S. G., Morrison, R. P. und Arditi, M. (2002) Chlamydial heat shock protein 60 activates macrophages and endothelial cells through Toll-like receptor 4 and MD2 in a MyD88-dependent pathway. *J. Immunol.* 168: 1435-1440.

Campos, M. A., Almeida, I. C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E. P., Procopio, D. O., Travassos, L. R., Smith, J. A., Golenbock, D. T. und Gazzinelli, R. T. (2001) Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J. Immunol.* 167: 416-423.

Cantley, L. C. (2002) The phosphoinositide 3-kinase pathway. *Science* 296: 1655-1657.

Caux, C., Dezutter-Dambuyant, C., Schmitt, D. und Banchereau, J. (1992) GM-CSF and TNF-alpha cooperate in the generation of dendritic Langerhans cells. *Nature* 360: 258-261.

Chen, Y. L., Law, P. Y. und Loh, H. H. (2005) Inhibition of PI3K/Akt signaling: an emerging paradigm for targeted cancer therapy. *Curr. Med. Chem. Anticancer Agents* 5: 575-589.

Cohen, G. M. (1997) Caspases: the executioners of apoptosis. *Biochem. J.* 326 (Pt 1): 1-16.

Decker, T., Stockinger, S., Karaghiosoff, M., Muller, M. und Kovarik, P. (2002) IFNs and STATs in innate immunity to microorganisms. *J. Clin. Invest* 109: 1271-1277.

Del Prete, A., Vermi, W., Dander, E., Otero, K., Barberis, L., Luini, W., Bernasconi, S., Sironi, M., Santoro, A., Garlanda, C., Facchetti, F., Wymann, M. P., Vecchi, A., Hirsch, E., Mantovani, A. und Sozzani, S. (2004) Defective dendritic cell migration and activation of adaptive immunity in PI3Kgamma-deficient mice. *EMBO J.* 23: 3505-3515.

Demir, G., Klein, H. O. und Tuzuner, N. (2003) Low dose daily rhGM-CSF application activates monocytes and dendritic cells in vivo. *Leuk. Res.* 27: 1105-1108.

-
- Diebold, S. S., Kaisho, T., Hemmi, H., Akira, S. und Reis e Sousa. (2004) Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science* 303: 1529-1531.
- Domin, J. und Waterfield, M. D. (1997) Using structure to define the function of phosphoinositide 3-kinase family members. *FEBS Lett.* 410: 91-95.
- Doyle, S., Vaidya, S., O'Connell, R., Dadgostar, H., Dempsey, P., Wu, T., Rao, G., Sun, R., Haberland, M., Modlin, R. und Cheng, G. (2002) IRF3 mediates a TLR3/TLR4-specific antiviral gene program. *Immunity.* 17: 251-263.
- Edwards, A. D., Diebold, S. S., Slack, E. M., Tomizawa, H., Hemmi, H., Kaisho, T., Akira, S. und Reis e Sousa. (2003) Toll-like receptor expression in murine DC subsets: lack of TLR7 expression by CD8 alpha+ DC correlates with unresponsiveness to imidazoquinolines. *Eur. J. Immunol.* 33: 827-833.
- Fearnley, D. B., Whyte, L. F., Carnoutsos, S. A., Cook, A. H. und Hart, D. N. (1999) Monitoring human blood dendritic cell numbers in normal individuals and in stem cell transplantation. *Blood* 93: 728-736.
- Febbraio, M., Hajjar, D. P. und Silverstein, R. L. (2001) CD36: a class B scavenger receptor involved in angiogenesis, atherosclerosis, inflammation, and lipid metabolism. *J. Clin. Invest* 108: 785-791.
- Fitzgerald, K. A., Palsson-McDermott, E. M., Bowie, A. G., Jefferies, C. A., Mansell, A. S., Brady, G., Brint, E., Dunne, A., Gray, P., Harte, M. T., McMurray, D., Smith, D. E., Sims, J. E., Bird, T. A. und O'Neill, L. A. (2001) Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. *Nature* 413: 78-83.
- Fitzgerald, K. A., Rowe, D. C., Barnes, B. J., Caffrey, D. R., Visintin, A., Latz, E., Monks, B., Pitha, P. M. und Golenbock, D. T. (2003) LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF. *J. Exp. Med.* 198: 1043-1055.
- Flores-Romo, L., Bjorck, P., Duvert, V., van Kooten, C., Saeland, S. und Banchereau, J. (1997) CD40 ligation on human cord blood CD34+ hematopoietic progenitors induces their proliferation and differentiation into functional dendritic cells. *J. Exp. Med.* 185: 341-349.
- Gabriele, L. und Ozato, K. (2007) The role of the interferon regulatory factor (IRF) family in dendritic cell development and function. *Cytokine Growth Factor Rev.* 18: 503-510.
- Gay, N. J. und Keith, F. J. (1991) Drosophila Toll and IL-1 receptor. *Nature* 351: 355-356.
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y. und Figdor, C. G. (2000) Identification of DC-

SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* 100: 575-585.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. und Amigorena, S. (2002) Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 621-667.

Guha, M. und Mackman, N. (2001) LPS induction of gene expression in human monocytes. *Cell Signal.* 13: 85-94.

Hansson, M., Lundgren, A., Elgbratt, K., Quiding-Jarbrink, M., Svennerholm, A. M. und Johansson, E. L. (2006) Dendritic cells express CCR7 and migrate in response to CCL19 (MIP-3beta) after exposure to *Helicobacter pylori*. *Microbes. Infect.* 8: 841-850.

Heil, F., Hemmi, H., Hochrein, H., Ampenberger, F., Kirschning, C., Akira, S., Lipford, G., Wagner, H. und Bauer, S. (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science* 303: 1526-1529.

Hemmi, H., Kaisho, T., Takeuchi, O., Sato, S., Sanjo, H., Hoshino, K., Horiuchi, T., Tomizawa, H., Takeda, K. und Akira, S. (2002) Small anti-viral compounds activate immune cells via the TLR7 MyD88-dependent signaling pathway. *Nat. Immunol.* 3: 196-200.

Hengartner, M. O. (2000) The biochemistry of apoptosis. *Nature* 407: 770-776.

Hirschfeld, M., Weis, J. J., Toshchakov, V., Salkowski, C. A., Cody, M. J., Ward, D. C., Qureshi, N., Michalek, S. M. und Vogel, S. N. (2001) Signaling by toll-like receptor 2 and 4 agonists results in differential gene expression in murine macrophages. *Infect. Immun.* 69: 1477-1482.

Hornig, T., Barton, G. M. und Medzhitov, R. (2001) TIRAP: an adapter molecule in the Toll signaling pathway. *Nat. Immunol.* 2: 835-841.

Hoshino, K., Takeuchi, O., Kawai, T., Sanjo, H., Ogawa, T., Takeda, Y., Takeda, K. und Akira, S. (1999) Cutting edge: Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the Lps gene product. *J. Immunol.* 162: 3749-3752.

Inaba, K., Inaba, M., Romani, N., Aya, H., Deguchi, M., Ikehara, S., Muramatsu, S. und Steinman, R. M. (1992) Generation of large numbers of dendritic cells from mouse bone marrow cultures supplemented with granulocyte/macrophage colony-stimulating factor. *J. Exp. Med.* 176: 1693-1702.

Kariko, K., Bhuyan, P., Capodici, J. und Weissman, D. (2004a) Small interfering RNAs mediate sequence-independent gene suppression and induce immune activation by signaling through toll-like receptor 3. *J. Immunol.* 172: 6545-6549.

Kariko, K., Ni, H., Capodici, J., Lamphier, M. und Weissman, D. (2004b) mRNA is an endogenous ligand for Toll-like receptor 3. *J. Biol. Chem.* 279: 12542-12550.

Kawai, T., Adachi, O., Ogawa, T., Takeda, K. und Akira, S. (1999) Unresponsiveness of MyD88-deficient mice to endotoxin. *Immunity.* 11: 115-122.

Kiertscher, S. M., Gitlitz, B. J., Figlin, R. A. und Roth, M. D. (2003) Granulocyte/macrophage-colony stimulating factor and interleukin-4 expand and activate type-1 dendritic cells (DC1) when administered in vivo to cancer patients. *Int. J. Cancer* 107: 256-261.

Kroemer, G., Dallaporta, B. und Resche-Rigon, M. (1998) The mitochondrial death/life regulator in apoptosis and necrosis. *Annu. Rev. Physiol* 60: 619-642.

Lechmann, M., Zinser, E., Golka, A. und Steinkasserer, A. (2002) Role of CD83 in the immunomodulation of dendritic cells. *Int. Arch. Allergy Immunol.* 129: 113-118.

Li, B., Cheung, P. Y., Wang, X., Tsao, S. W., Ling, M. T., Wong, Y. C. und Cheung, A. L. (2007) Id-1 activation of PI3K/Akt/NF κ B signaling pathway and its significance in promoting survival of esophageal cancer cells. *Carcinogenesis.*

Liu, Y. J. (2001) Dendritic cell subsets and lineages, and their functions in innate and adaptive immunity. *Cell* 106: 259-262.

Lyakh, L. A., Koski, G. K., Telford, W., Gress, R. E., Cohen, P. A. und Rice, N. R. (2000) Bacterial lipopolysaccharide, TNF- α , and calcium ionophore under serum-free conditions promote rapid dendritic cell-like differentiation in CD14⁺ monocytes through distinct pathways that activate NK-kappa B. *J. Immunol.* 165: 3647-3655.

Mattei, F., Schiavoni, G., Borghi, P., Venditti, M., Canini, I., Sestili, P., Pietraforte, I., Morse, H. C., III, Ramoni, C., Belardelli, F. und Gabriele, L. (2006) ICSBP/IRF-8 differentially regulates antigen uptake during dendritic-cell development and affects antigen presentation to CD4⁺ T cells. *Blood* 108: 609-617.

McCubrey, J. A., Steelman, L. S., Blalock, W. L., Lee, J. T., Moye, P. W., Chang, F., Pearce, M., Shelton, J. G., White, M. K., Franklin, R. A. und Pohnert, S. C. (2001) Synergistic effects of pi3k/akt on abrogation of cytokine-dependency induced by oncogenic raf. *Adv. Enzyme Regul.* 41: 289-323.

McGreal, E. P., Miller, J. L. und Gordon, S. (2005) Ligand recognition by antigen-presenting cell C-type lectin receptors. *Curr. Opin. Immunol.* 17: 18-24.

Medzhitov, R., Preston-Hurlburt, P., Kopp, E., Stadlen, A., Chen, C., Ghosh, S. und Janeway, C. A., Jr. (1998) MyD88 is an adaptor protein in the hToll/IL-1 receptor family signaling pathways. *Mol. Cell* 2: 253-258.

Melian, A., Beckman, E. M., Porcelli, S. A. und Brenner, M. B. (1996) Antigen presentation by CD1 and MHC-encoded class I-like molecules. *Curr. Opin. Immunol.* 8: 82-88.

Moldenhauer, A., Moore, M. A., Schmidt, K., Kiesewetter, H. und Salama, A. (2006) Differences in the transmigration of different dendritic cells. *Exp. Hematol.* 34: 745-752.

Nagata, S. (2000) Apoptotic DNA fragmentation. *Exp. Cell Res.* 256: 12-18.

Nicoletti, I., Migliorati, G., Pagliacci, M. C., Grignani, F. und Riccardi, C. (1991) A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J. Immunol. Methods* 139: 271-279.

O'Neill, L. A. (2003) The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal transduction. *Biochem. Soc. Trans.* 31: 643-647.

Poltorak, A., Ricciardi-Castagnoli, P., Citterio, S. und Beutler, B. (2000) Physical contact between lipopolysaccharide and toll-like receptor 4 revealed by genetic complementation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 97: 2163-2167.

Renart, J., Reiser, J. und Stark, G. R. (1979) Transfer of proteins from gels to diazobenzoyloxymethyl-paper and detection with antisera: a method for studying antibody specificity and antigen structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76: 3116-3120.

Rodriguez-Viciano, P., Marte, B. M., Warne, P. H. und Downward, J. (1996) Phosphatidylinositol 3' kinase: one of the effectors of Ras. *Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci.* 351: 225-231.

Rodriguez-Viciano, P., Warne, P. H., Dhand, R., Vanhaesebroeck, B., Gout, I., Fry, M. J., Waterfield, M. D. und Downward, J. (1994) Phosphatidylinositol-3-OH kinase as a direct target of Ras. *Nature* 370: 527-532.

Romani, N., Gruner, S., Brang, D., Kampgen, E., Lenz, A., Trockenbacher, B., Konwalinka, G., Fritsch, P. O., Steinman, R. M. und Schuler, G. (1994) Proliferating dendritic cell progenitors in human blood. *J. Exp. Med.* 180: 83-93.

Romani, N., Reider, D., Heuer, M., Ebner, S., Kampgen, E., Eibl, B., Niederwieser, D. und Schuler, G. (1996) Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* 196: 137-151.

Rougier, N., Schmitt, D. und Vincent, C. (1998) IL-4 addition during differentiation of CD34 progenitors delays maturation of dendritic cells while promoting their survival. *Eur. J. Cell Biol.* 75: 287-293.

Rubio, I., Rodriguez-Viciana, P., Downward, J. und Wetzker, R. (1997) Interaction of Ras with phosphoinositide 3-kinase gamma. *Biochem. J.* 326 (Pt 3): 891-895.

Sallusto, F. und Lanzavecchia, A. (1994) Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179: 1109-1118.

Scheinecker, C., Machold, K. P., Majdic, O., Hocker, P., Knapp, W. und Smolen, J. S. (1998) Initiation of the autologous mixed lymphocyte reaction requires the expression of costimulatory molecules B7-1 and B7-2 on human peripheral blood dendritic cells. *J. Immunol.* 161: 3966-3973.

Schmidt, M., Nagel, S., Proba, J., Thiede, C., Ritter, M., Waring, J. F., Rosenbauer, F., Huhn, D., Wittig, B., Horak, I. und Neubauer, A. (1998) Lack of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) transcripts in human myeloid leukemias. *Blood* 91: 22-29.

Schuler, G., Romani, N. und Steinman, R. M. (1985) A comparison of murine epidermal Langerhans cells with spleen dendritic cells. *J. Invest Dermatol.* 85: 99s-106s.

Schulze-Osthoff, K., Ferrari, D., Los, M., Wesselborg, S. und Peter, M. E. (1998) Apoptosis signaling by death receptors. *Eur. J. Biochem.* 254: 439-459.

Schwandner, R., Dziarski, R., Wesche, H., Rothe, M. und Kirschning, C. J. (1999) Peptidoglycan- and lipoteichoic acid-induced cell activation is mediated by toll-like receptor 2. *J. Biol. Chem.* 274: 17406-17409.

Sharpe, A. H. und Freeman, G. J. (2002) The B7-CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 116-126.

Shimazu, R., Akashi, S., Ogata, H., Nagai, Y., Fukudome, K., Miyake, K. und Kimoto, M. (1999) MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4. *J. Exp. Med.* 189: 1777-1782.

Shortman, K. und Liu, Y. J. (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Nat. Rev. Immunol.* 2: 151-161.

Simmons, D., Makgoba, M. W. und Seed, B. (1988) ICAM, an adhesion ligand of LFA-1, is homologous to the neural cell adhesion molecule NCAM. *Nature* 331: 624-627.

Sioud, M. und Floisand, Y. (2007) TLR agonists induce the differentiation of human bone marrow CD34(+) progenitors into CD11c(+) CD80/86(+) DC capable of inducing a Th1-type response. *Eur. J. Immunol.*

Soltoff, S. P., Carraway, K. L., III, Prigent, S. A., Gullick, W. G. und Cantley, L. C. (1994) ErbB3 is involved in activation of phosphatidylinositol 3-kinase by epidermal growth factor. *Mol. Cell Biol.* 14: 3550-3558.

Steinman, R. M. und Cohn, Z. A. (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* 137: 1142-1162.

Szabolcs, P., Park, K. D., Reese, M., Marti, L., Broadwater, G. und Kurtzberg, J. (2003) Absolute values of dendritic cell subsets in bone marrow, cord blood, and peripheral blood enumerated by a novel method. *Stem Cells* 21: 296-303.

Tabeta, K., Georgel, P., Janssen, E., Du, X., Hoebe, K., Crozat, K., Mudd, S., Shamel, L., Sovath, S., Goode, J., Alexopoulou, L., Flavell, R. A. und Beutler, B. (2004) Toll-like receptors 9 and 3 as essential components of innate immune defense against mouse cytomegalovirus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 101: 3516-3521.

Takeda, K., Kaisho, T. und Akira, S. (2003) Toll-like receptors. *Annu. Rev. Immunol.* 21: 335-376.

Tanchot, C., Rosado, M. M., Agenes, F., Freitas, A. A. und Rocha, B. (1997) Lymphocyte homeostasis. *Semin. Immunol.* 9: 331-337.

Toker, A. und Cantley, L. C. (1997) Signalling through the lipid products of phosphoinositide-3-OH kinase. *Nature* 387: 673-676.

Towbin, H., Staehelin, T. und Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 76: 4350-4354.

Uehori, J., Fukase, K., Akazawa, T., Uematsu, S., Akira, S., Funami, K., Shingai, M., Matsumoto, M., Azuma, I., Toyoshima, K., Kusumoto, S. und Seya, T. (2005) Dendritic cell maturation induced by muramyl dipeptide (MDP) derivatives: monoacylated MDP confers TLR2/TLR4 activation. *J. Immunol.* 174: 7096-7103.

Underhill, D. M. und Ozinsky, A. (2002) Phagocytosis of microbes: complexity in action. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 825-852.

Underhill, D. M., Ozinsky, A., Hajjar, A. M., Stevens, A., Wilson, C. B., Bassetti, M. und Aderem, A. (1999) The Toll-like receptor 2 is recruited to macrophage phagosomes and discriminates between pathogens. *Nature* 401: 811-815.

Valet, G. (2003) Past and present concepts in flow cytometry: a European perspective. *J. Biol. Regul. Homeost. Agents* 17: 213-222.

Vanhaesebroeck, B., Leever, S. J., Panayotou, G. und Waterfield, M. D. (1997) Phosphoinositide 3-kinases: a conserved family of signal transducers. *Trends Biochem. Sci.* 22: 267-272.

-
- Vermes, I., Haanen, C., Steffens-Nakken, H. und Reutelingsperger, C. (1995) A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J. Immunol. Methods* 184: 39-51.
- Vlahos, C. J., Matter, W. F., Hui, K. Y. und Brown, R. F. (1994) A specific inhibitor of phosphatidylinositol 3-kinase, 2-(4-morpholinyl)-8-phenyl-4H-1-benzopyran-4-one (LY294002). *J. Biol. Chem.* 269: 5241-5248.
- Wang, T., Town, T., Alexopoulou, L., Anderson, J. F., Fikrig, E. und Flavell, R. A. (2004) Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.* 10: 1366-1373.
- Weck, M. M., Grunebach, F., Werth, D., Sinzger, C., Bringmann, A. und Brossart, P. (2007) TLR ligands differentially affect uptake and presentation of cellular antigens. *Blood* 109: 3890-3894.
- Werling, D. und Jungi, T. W. (2003) TOLL-like receptors linking innate and adaptive immune response. *Vet. Immunol. Immunopathol.* 91: 1-12.
- Werts, C., Tapping, R. I., Mathison, J. C., Chuang, T. H., Kravchenko, V., Saint, G., I, Haake, D. A., Godowski, P. J., Hayashi, F., Ozinsky, A., Underhill, D. M., Kirschning, C. J., Wagner, H., Aderem, A., Tobias, P. S. und Ulevitch, R. J. (2001) Leptospiral lipopolysaccharide activates cells through a TLR2-dependent mechanism. *Nat. Immunol.* 2: 346-352.
- Xie, J., Qian, J., Yang, J., Wang, S., Freeman, M. E., III und Yi, Q. (2005) Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. *Exp. Hematol.* 33: 564-572.
- Xiong, H., Li, H., Kong, H. J., Chen, Y., Zhao, J., Xiong, S., Huang, B., Gu, H., Mayer, L., Ozato, K. und Unkeless, J. C. (2005) Ubiquitin-dependent degradation of interferon regulatory factor-8 mediated by Cbl down-regulates interleukin-12 expression. *J. Biol. Chem.* 280: 23531-23539.
- Yamamoto, M., Sato, S., Hemmi, H., Hoshino, K., Kaisho, T., Sanjo, H., Takeuchi, O., Sugiyama, M., Okabe, M., Takeda, K. und Akira, S. (2003) Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science* 301: 640-643.
- Yu, Q., Kovacs, C., Yue, F. Y. und Ostrowski, M. A. (2004) The role of the p38 mitogen-activated protein kinase, extracellular signal-regulated kinase, and phosphoinositide-3-OH kinase signal transduction pathways in CD40 ligand-induced dendritic cell activation and expansion of virus-specific CD8+ T cell memory responses. *J. Immunol.* 172: 6047-6056.
- Zarembek, K. A. und Godowski, P. J. (2002) Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in

leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J. Immunol.* 168: 554-561.

Zhou, L. J. und Tedder, T. F. (1995) Human blood dendritic cells selectively express CD83, a member of the immunoglobulin superfamily. *J. Immunol.* 154: 3821-3835.

Zhou, L. J. und Tedder, T. F. (1996) CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93: 2588-2592.

Danksagung

Zuerst möchte ich meinem Doktorvater Herr Prof. Dr. med Peter Brossart für seine Unterstützung während meiner Doktorarbeit und die Hilfe bei der Auswertung der Ergebnisse danken.

Ich möchte mich bei allen Mitarbeitern im Labor bedanken. Besonderer Dank gilt Stefanie Held, Anita Bringmann, Karin von Schwarzenberg und Katharina Brauer, die mir mit vielen hilfreichen Ratschläge, Erklärungen und fleißigem Korrekturlesen zur Seite standen, mit denen ich aber auch jede Menge Spaß im und außerhalb des Labors hatte .

Den MTA's, besonders Bruni Schuster , Sylvia Stephan und ,Solweig Daecke danke ich für ihre Geduld mich in die Methodik einzuarbeiten, und mir vor allem das FACS näher zu bringen.

Meinen Eltern danke ich von ganzem Herzen für ihre liebe Unterstützung während meiner gesamten Ausbildung, ihre Geduld und ihre unermüdlichen Erinnerungen, nicht zu „vergessen“ meine Doktorarbeit fertig zu schreiben.

Meinen Brüdern Stephan und Valentin Becker danke ich für ihre moralische Unterstützung, für hilfreiche Tipps und für die umfangreichen Erläuterungen zu Excel und Reference Manager.

Meinem Freund Asbjørn Christophersen möchte ich für seine Liebe und seine Unterstützung in allen Lebenslagen unendlich danken.

Lebenslauf

Angaben zur Person

Name	Caroline Renate Becker
Geburtsdatum	13.04.1981
Geburtsort	Böblingen
Nationalität:	deutsch

Schulausbildung

1987 – 1991	Grundschule Calw-Wimberg
1991 – 1995	Hermann Hesse Gymnasium Calw
1995 – 2000	Maria von Linden Gymnasium Calw-Stammheim

Studium

2000 - 2002	Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität Ulm
September 2002	Ärztliche Vorprüfung
2002-2007	Fortführung des Medizinstudiums an der Eberhard Karls Universität Tübingen
August 2003	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
September 2004	Auslandssemester an der Universidad de Alcalá, Spanien
März 2005	Annahme als Doktorandin der Medizinischen Fakultät der Eberhard Karls Universität Tübingen
März 2006	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
4. Mai 2007	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung und Approbation zur Ärztin

Praktisches Jahr

04/06-08/06	Medizinische Universitätsklinik Tübingen
08/06-10/06	Allgemeinchirurgie, Nambour General Hospital, Teaching Hospital der University of Queensland, Australien
10/06-12/06	Kolorektalchirurgie und Handchirurgie am Royal North Shore Hospital Sydney, Australien
12/06-03/07	Gynäkologie am Haukeland Universitätskrankenhaus, Bergen, Norwegen

Berufliche Tätigkeit

Seit 10/ 2007	Assistenzärztin an der Universitätsfrauenklinik Freiburg
---------------	---