

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik
Tübingen**

Abteilung Innere Medizin II

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. L. Kanz

**Analyse des Expressionsmusters des differentiell in
dendritischen Zellen exprimierten Genes Osteoactivin
(Dc-Hil)**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Mark-Alexander Schwarzbich aus
Ludwigsburg

2010

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. P. Brossart

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. F. Grünebach

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	Seite I
Abkürzungsverzeichnis.....	Seite V
Abbildungsverzeichnis.....	Seite XII
Tabellenverzeichnis.....	Seite XIV

1. Einleitung.....	Seite 1
1.1 Dendritische Zellen.....	Seite 1
1.1.1 Überblick über Herkunft und Aufgaben von.....	Seite 1
dendritischen Zellen	
1.1.2 Herkunft und Entwicklung von dendritischen.....	Seite 3
Zellen, Subtypen	
1.1.2.1 Dendritische Zellen der Maus.....	Seite 3
1.1.2.2 Dendritische Zellen des Menschen.....	Seite 5
1.1.2.3 Charakterisierung der Subtypen von.....	Seite 6
dendritischen Zellen	
1.1.3 Gewinnung von dendritischen Zellen in vitro.....	Seite 8
1.1.4 Molekulare Mechanismen in Steuerung und.....	Seite 9
Funktion von dendritischen Zellen	
1.1.4.1 Antigenaufnahme und Prozessierung.....	Seite 9
1.1.4.2 Steuerung des Zytoskelettes.....	Seite 10
1.1.4.3 Immunostimulation und Reifung von.....	Seite 10
dendritischen Zellen	
1.1.4.4 Tolerogene Effekte und unreife dendritische Zellen.....	Seite 13
1.1.4.5 Molekulare Mechanismen in reifen und unreifen.....	Seite 15
dendritischen Zellen	
1.2 Identifizierung differentiell exprimierter Gene.....	Seite 16
mittels cDNA Subtraktion	
1.3 Osteoactivin (DC-HIL).....	Seite 18
1.3.1 Struktur und Expression von Osteoactivin (DC-HIL).....	Seite 18
1.3.2 Wachstum und Reparatursprozesse.....	Seite 20
1.3.3 Rolle im Immunsystem.....	Seite 21

1.3.4 Bedeutung für die Onkologie.....	Seite 22
1.4 Zielsetzung der Arbeit.....	Seite 24
2. Material und Methoden.....	Seite 26
2.1 Material.....	Seite 26
2.1.1 Geräte.....	Seite 26
2.1.2 Verbrauchsmaterialien.....	Seite 28
2.1.3 Medien, Reagenzien und Antikörper.....	Seite 29
2.1.4 Puffer und Lösung.....	Seite 34
2.2 Methoden.....	Seite 36
2.2.1 Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut.....	Seite 36
2.2.2 Zellzählung.....	Seite 37
2.2.3 In vitro Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten.....	Seite 38
2.2.4 Isolation verschiedener Leukozytensubpopulationen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS).....	Seite 39
2.2.5 Durchflusszytometrie.....	Seite 39
2.2.6 Isolation von RNA.....	Seite 41
2.2.7 Konzentrationsbestimmung von RNA.....	Seite 41
2.2.8 Abbau von RNA durch DNase.....	Seite 41
2.2.9 Reverse Transkriptase–Polymerasekettenreaktion (RT-PCR).....	Seite 42
2.2.10 Agarosegelelektrophorese.....	Seite 44
2.2.11 Quantitative RT-PCR nach dem Lightcycler®-Prinzip.....	Seite 45
2.2.12 Zellyse.....	Seite 47
2.2.13 Proteinkonzentrationsbestimmung.....	Seite 48
2.2.14 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	Seite 49
2.2.15 Western Blot.....	Seite 50
2.2.16 Stripping von Nitrozellulosemembranen.....	Seite 52

3. Ergebnisse	Seite 54
3.1 Nachweis der differentiellen Expression des Genes Osteoactivin (DC-Hil) in dendritischen Zellen und Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression auf Transkriptionsebene	Seite 54
3.1.1 Phänotyp der verwendeten Zellen.....	Seite 55
3.1.2 Nachweis der differentiellen Expression von Osteoactivin (DC-HIL) mittels RT-PCR	Seite 64
3.1.3 Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in dendritischen Zellen auf Transkriptionsebene	Seite 65
3.2 Nachweis der differentiellen Expression des..... Genes Osteoactivin (DC-Hil) in dendritischen Zellen und Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression auf Translationsebene	Seite 66
3.3 Untersuchung der Expression von Osteoactivin..... (DC-HIL) in Lymphozyten und dendritischen Zellen des peripheren Blutes	Seite 68
3.3.1 Phänotyp der untersuchten Zellen	Seite 69
3.3.2 Expression von Osteoactivin in Lymphozyten und dendritischen Zellen des peripheren Blutes	Seite 75
3.4 Untersuchung der Osteoactivin-Expression..... mittels quantitativer RT-PCR	Seite 76
3.5 Untersuchung der Osteoactivin-Expression mittels anti-Osteoactivin Sekundärfärbung	Seite 77
3.5.1 Titration des Primärantikörpers bei anti-Osteoactivin Sekundärfärbung	Seite 78
3.5.2 Anti-Osteoactivin-Sekundärfärbung von..... verschiedenen DC-Typen	Seite 80
3.6. Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen Zeitpunkten der IL 10 Zugabe auf die Osteoactivin-Expression	Seite 82

4. Diskussion	Seite 86
4.1 Differentielle Expression von Osteoactivin (DC-HIL)	Seite 87
in dendritischen Zellen	
4.2 Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression	Seite 87
von Osteoactivin (DC-HIL)	
4.3 Einfluss inhibitorischer Substanzen auf die	Seite 88
Expression von Osteoactivin (DC-HIL)	
4.4 Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in	Seite 89
Lymphozyten und dendritischen Zellen des peripheren Blutes	
5. Zusammenfassung	Seite 91
Literaturverzeichnis	Seite 93
Danksagung	Seite 103
Lebenslauf	Seite 104

Abkürzungsverzeichnis

A	a	Adenosine
	aa	Aminosäure
	Abb.	Abbildung
	AG	Aktiengesellschaft
	AP-1	<i>Activating Protein 1</i>
	APS	Ammonium persulfat
	APC	<i>antigen presenting cell(s)</i>
	Arg	Arginin
	ARG	<i>Abl-related gene</i>
	Asp	Aspartat
B	B	Belgien
	BCA	<i>bicinchoninic acid assay</i>
	BCL-2	<i>B-cell CLL/lymphoma</i>
	BDCA	<i>Blood Dendritic Cell Antigen</i>
	BSA	Bovines Serumalbumin
C	°C	Grad Celsius
	C	Kohlenstoff
	c	Cytidine
	CCL	<i>cc chemokine ligand</i>
	CCR	cc chemokine receptor
	CD	<i>cluster of differentiation</i>
	CDAA	cholinedefizienten, L-Amino Säure-definierten Diät
	cDNA	<i>copy DNA</i>
	Cdc42	<i>Cell division cycle 42</i>
	c-Fos	<i>V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
	CH	Schweiz
	Cl	Chlorid
	CLA	<i>cutaneous leukocyte antigen</i>
	CLP	<i>common lymphoid progenitor(s)</i>
	cm	Centimeter
	CML	chronisch myeloische Leukämie

	CMP	<i>common myeloid progenitor(s)</i>
	Co.	Compagnie
	C _p	<i>Crossing Point</i>
	CpG	Dinukleotid Cytidine/Guanosine
	CTLA-4	<i>Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4</i>
	CTL	zytotoxische T-Lymphozyten
	CXCR	<i>cxc chemokine receptor</i>
D	D	Deutschland
	DC	<i>dendritic cell(s)</i>
	DC-HIL	<i>dendritic cell-associated heparan sulfate proteoglycan-integrin ligand</i>
	DC-LAMP	<i>dendritic cell lysosome-associated membrane glycoprotein</i>
	DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin</i>
	DDC	dermale dendritische Zellen
	ddH ₂ O	zweifachdestilliertes Wasser
	DEC-205	<i>dendritic and epithelial cells, 205 kDa</i>
	DEPC	Diethylpyrocarbonat
	DK	Dänemark
	DMSO	Dimethylsulfoxid
	DNA	Desoxyribonukleinsäure
	ds	doppelsträngig
	DTH	<i>delayed type hypersensitivity</i>
	DTT	Dithiothreitol
E	EBV	Ebstein-Barr Virus
	ECL	<i>Enhanced chemiluminescence</i>
	EDTA	Ethylendiamintetraacetat
	ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
	ERK	<i>extracellular signal-regulated kinases</i>
	et al.	et alii
F	FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i>
	FAM	Fluorescein
	FCS	<i>fetal calf serum</i>

	FIN	Finnland
	FITC	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)
	Flt3L	<i>Fms-related tyrosine kinase 3 ligand</i>
	FoxP3+	<i>Forkhead Box P3</i>
	FRET	Förster Resonanz-Energie-Transfer
	FSC	forward scatter
G	µg	Mikrogramm
	g	Gramm bzw. Guanosine
	GalNac	N-Acetylgalactosamin
	GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
	GBM	Glioblastoma Multiforme
	G-CSF	<i>Granulocyte colony-stimulating factor</i>
	GCDC	<i>Germinal Center Dendritic Cell(s)</i>
	GIST	Gastrointestinaler Stromatumor
	GlcNAC	N-Acetylglucosamin
	Gly	Glycine
	GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage-colony stimulating factor</i>
	GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
	GPNMB	<i>glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B</i>
H	HCC	Hepatocelluläres Karzinom
	HCl	Wasserstoffchlorid
	HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)- 1-piperaziny)-ethansulfonsäure
	HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
	H ₂ O	Wasser
	HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
	HSP	<i>heat shock protein</i>
	HSPG	Heparan-Sulfat-Proteoglykane
I	ICAM	<i>Intercellular adhesion molecule</i>
	Id	<i>Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein</i>
	IDC	interstitielle dendritische Zellen
	IDO	Indoleamin 2,3- Dioxygenase

Abkürzungsverzeichnis

	IFN	Interferon
	Ig	Immunglobulin
	IL	Interleukin
	ILT	<i>immunoglobulin-like transcript</i>
	Inc.	<i>Incorporation</i>
	IP	<i>IFN-γ-inducible protein</i>
	IPC	<i>interferon-producing-cells</i>
	IRAK	<i>interleukin-1 receptor-associated kinase</i>
	IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
	ITAM	<i>immunoreceptor tyrosine-based activation motif</i>
	ITIM	immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif
J	JNK	<i>C-Jun N-terminal kinase</i>
K	kb	Kilobasenpaare
	kDa	kiloDalton
L	μ l	Mikroliter
	l	Liter
	LC	<i>langerhans cell(s)</i>
	Lck	<i>leukocyte-specific protein tyrosine kinase</i>
	LOX-1	<i>lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1</i>
	LMP	<i>large multifunctional peptidase</i>
	LPS	Lipopolysaccharid
	Ltd.	<i>private company limited by shares</i>
M	M	molar (mol/Liter)
	mA	Miliamper
	MAP	<i>mitogen activated protein</i>
	MACS	Magnetic-activated cell sorting
	MCM	<i>monocyte-conditioned medium</i>
	mDC	myeloide dendritische Zellen
	MDC	<i>macrophage-derived chemokine (MDC)</i>
	MerTK	<i>C-mer proto-oncogene tyrosine kinase</i>
	MgCl	Magnesiumchlorid
	MHC	<i>major histocopatibility complex</i>

Abkürzungsverzeichnis

	min	Minuten
	MIP	<i>Macrophage Inflammatory Protein</i>
	mL	Mililiter
	MLR	<i>mixed lymphocyte reaction</i>
	mM	milimolar (miliMol/Liter)
	mm	Milimeter
	MMP	Matrix Metalloprotease
	moDCs	monocyte derived dendritic cell(s)
	mRNA	<i>messenger RNA</i>
	MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response gene 88 (MyD88)</i>
N	NaCl	Natriumchlorid
	NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
	NFκB	<i>nuclear factor-kappa B</i>
	Ng	Nanogramm
	NK-Zellen	natürliche Killer-Zellen
	nm	Nanometer
	NP-40	Nonylphenoxypolyethoxyethanol
P	PALS	periarterioläre lymphatische Scheiden
	Pam3Cys	<i>N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysine</i>
	PARC	<i>pulmonary and activation-regulated chemokine</i>
	PBGD	Porphobilinogen Deaminase
	PBMNC	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
	PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
	PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
	pDC	plasmazytoide dendritische Zellen
	PD-L	<i>Programmed death ligand</i>
	PDS	<i>Pigment Dispersion Syndrome</i>
	PDGF-R	<i>platelet-derived growth factor receptor</i>
	PE	Phycoerythrin
	PenStrep	Penicillin/Streptomycin
	PGE2	Prostaglandin E 2

	PKD	<i>Polycytic Kidney Disease Domäne</i>
	PLC	Phospholipase C
	PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
	PolyI;C	<i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i>
	PRR	<i>Proline-riche-Region</i>
	pT α	<i>pre-t-cell receptor α chain</i>
R	R848	Resiquimod
	Rac	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate</i>
	RANK	<i>Receptor Activator of Nuclear Factor κ B</i>
	RelB	<i>V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3</i>
	Rho	<i>Ras homolog gene family</i>
	RIPA	<i>Radio Immunoprecipitation Assay</i>
	RNA	Ribonukleinsäure
	rpm	<i>rounds per minute</i>
	RPMI	Roswell Park Memorial Institut: 1640-Zellkulturmedium
	RT-PCR	<i>Reverse Transcription PCR</i>
S	SCF	<i>stem cell factor</i>
	SDS	Natriumdodecylsulfat
	SDS-PAGE	<i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
	siRNA	<i>small interfering RNA</i>
	SP1	<i>Spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi 1</i>
	Spi-B	<i>Spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi b</i>
	Src	<i>V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog</i>
	SSC	<i>side scatter</i>
	SSH	<i>subtractive suppression hybridization</i>
	stat	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
	STI571	Imatinib

Abkürzungsverzeichnis

T	t	Thymidine
	Tab.	Tabelle
	TAE	Tris-Acetat-EDTA-Puffer
	TAP	<i>transporter associated with antigen processing</i>
	Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
	TARC	<i>thymus and activation-regulated chemokine</i>
	TBS	<i>TRIS-buffered saline</i>
	TBST	<i>TRIS-buffered saline with Tween</i>
	TCR	<i>T-cell receptor</i>
	TEMED	Tetramethylethylenediamine
	TGF	<i>transforming growth factor</i>
	T _H 1/T _H 2	T-Helferzellen Typ I/T-Helferzellen Typ II
	TLR	<i>toll like receptor</i>
	™	<i>Trademark</i>
	TNF α	<i>tumor necrosis factor α</i>
	TRADD	<i>TNFRSF1A-associated via death domain</i>
	TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>
	TRANCE	<i>TNF-related activation-induced cytokine</i>
	Treg	regulatorische T-Lymphozyten
	TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	U	Unit
	USA	<i>United States of America</i>
V	V	Volt

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1:	Abbildung einer dendritischen Zelle in Interaktion mit einem Conidium.	Seite 3
Abb. 1.2:	Prinzip der Subtractive Suppression Hybridization (SSH).	Seite 18
Abb. 1.3:	Schematische Darstellung der Domain-Struktur des Proteins. Osteoactivin und seiner Spleißvariante.	Seite 20
Abb. 2.1:	Funktionsweise der Hydrolysesonden bei Realtime PCR	Seite 46
Abb. 2.2:	Aufbau des Blottingsystems.	Seite 51
Abb. 3.1:	Phänotypisierung von durch MACS gewonnenen CD14+ Monozyten.	Seite 56
Abb. 3.2:	Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen unreifen dendritischen Zellen.	Seite 57
Abb. 3.3:	Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen, mit LPS behandelten reifen dendritischen Zellen.	Seite 58
Abb. 3.4:	Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen unreifen, mit DMSO behandelten dendritischen Zellen.	Seite 59
Abb. 3.5:	Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen mit Pam3Cys behandelten, reifen dendritischen Zellen.	Seite 60
Abb. 3.6:	Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen mit PolyI:C behandelten, reifen dendritischen Zellen.	Seite 61
Abb. 3.7:	Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen mit R848 behandelten, reifen dendritischen Zellen.	Seite 62

Abb. 3.8:	Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen mit STI571 behandelten, dendritischen Zellen.	Seite 63
Abb. 3.9:	Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen mit IL10 behandelten dendritischen Zellen.	Seite 64
Abb. 3.10:	Differentielle Expression des Gens Osteoactivin.	Seite 65
Abb. 3.11:	Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression von Osteoactivin (DC-HIL).	Seite 66
Abb. 3.12:	Differentielle Expression und Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression von Osteoactivin (DC-HIL)	Seite 68
Abb. 3.13	Phänotypisierung von mittels MACS gewonnenen CD3+ T-Lymphozyten.	Seite 71
Abb. 3.14	Phänotypisierung von mittels MACS gewonnenen CD3+ T-Lymphozyten.	Seite 72
Abb. 3.15	Phänotypisierung von mittels MACS gewonnenen blood DCs.	Seite 73
Abb. 3.16	Phänotypisierung von mittels MACS gewonnenen BDCA1+ (CD1c+) blood DCs.	Seite 74
Abb. 3.17	Phänotypisierung von mittels MACS gewonnenen BDCA2+ blood DCs.	Seite 75
Abb. 3.18	Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in Lymphozyten und dendritischen Zellen des peripheren Blutes	Seite 76
Abb. 3.19:	Graphische Darstellung des Verhältnisses der Konzentrationen von GPNMB und PBGD cDNA aus verschiedenen DC-Typen.	Seite 77
Abb. 3.20:	Titration von Primärantikörper bei anti-Osteoactivin Sekundärfärbung	Seite 79

Abb. 3.21:	Graphische Darstellung der Differenz der geometrischen Mittelwerte bei FACS-Titration für anti-Osteoactivin-Sekundärfärbung.	Seite 80
Abb. 3.22:	Anti-Osteoactivin Sekundärfärbung von verschiedenen DC-Typen.	Seite 81
Abb. 3.23:	Graphische Darstellung der Differenz der geometrischen Mittelwerte bei anti-Osteoactivin-Sekundärfärbung von verschiedenen DC-Typen.	Seite 82
Abb. 3.24:	Einfluss von verschiedenen Zeitpunkten der IL 10 Zugabe auf die Osteoactivin-Expression.	Seite 84
Abb. 3.25:	Graphische Darstellung der Differenz der geometrischen Mittelwerte bei anti-Osteoactivin-Sekundärfärbung zur Bestimmung des Einflusses von verschiedenen Zeitpunkten der IL10 Zugabe auf die Expression von Osteoactivin	Seite 85

Tabellenverzeichnis

Tab. 1.1:	TLR-Rezeptoren und Liganden	Seite 12
Tab. 2.1:	Verwendete Geräte	Seite 26
Tab. 2.2:	Verwendete Verbrauchsmaterialien	Seite 28
Tab. 2.3:	Verwendete Medien, Reagenzien und Antikörper	Seite 29
Tab. 2.4:	Verwendete Puffer und Lösungen	Seite 34
Tab. 2.5:	Zur DC-Reifung bzw. Inhibition eingesetzte Substanzen	Seite 38
Tab. 2.6:	Zusammensetzung des cDNA- Mastermixes	Seite 43
Tab. 2.7:	Zusammensetzung des PCR- Mastermixes	Seite 43
Tab. 2.8:	PCR-Programme	Seite 44
Tab. 2.9:	Ansatz für Realtime-PCR	Seite 47
Tab. 2.10:	Lightcycler®-Einstellungen	Seite 47
Tab. 2.11:	Zusammensetzung Trenngel 10% (SDS-PAGE)	Seite 50
Tab. 2.12:	Zusammensetzung Sammelgel (SDS-PAGE)	Seite 50
Tab. 2.13:	Zusammensetzung des Stripping - Puffers (SDS-PAGE)	Seite 53
Tab. 3.1:	Phänotypisierung von durch MACS gewonnenen CD14+ Monozyten	Seite 55
Tab. 3.2:	Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen DC	Seite 55
Tab. 3.3:	Phänotypisierung von durch MACS gewonnenen CD3+ T-Lymphozyten	Seite 69
Tab. 3.4:	Phänotypisierung von durch MACS gewonnenen CD20+ B-Lymphozyten	Seite 69

Tab. 3.5:	Phänotypisierung von durch MACS gewonnenen blood DCs	Seite 70
Tab. 3.6:	Phänotypisierung von durch MACS gewonnenen BDCA1+ (CD1c+) blood DCs	Seite 70
Tab. 3.7:	Phänotypisierung von durch MACS gewonnenen BDCA2+ blood DCs	Seite 70
Tab. 3.8:	Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenz bei FACS-Titration für anti-Osteoactivin Sekundärfärbung.	Seite 79
Tab. 3.9:	3.10: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenz bei anti-Osteoactivin Sekundärfärbung verschiedener DC-Typen.	Seite 82
Tab. 3.10:	Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenz bei anti-Osteoactivin Sekundärfärbung zur Bestimmung des Einflusses von verschiedenen Zeitpunkten der IL10 Zugabe auf die Expression von Osteoactivin.	Seite 85

1. Einleitung

1.1 Dendritische Zellen.

Dendritische Zellen (DC) gehören zu den professionell antigen-präsentierenden Zellen (APC). Durch ihre zentrale Rolle in der Induktion spezifischer Immunantworten sind sie von großer Bedeutung für das Immunsystem. Sie wurden erstmals von Paul Langerhans im Jahre 1868 beschrieben. Er hatte diejenigen dendritischen Zellen entdeckt, die in der Epithelschicht der Haut vorkommen, hielt diese jedoch für kutane Nervenzellen. Heute werden die von ihm beschriebenen Zellen als „Langerhanszellen“ bezeichnet. [59] Der Begriff der „Dendritischen Zellen“ selbst wurde erst von Ralph M. Steinman und Zanvil A. Cohn im Jahre 1973 mit der Entdeckung der dendritischen Zellen im heutigen Sinne eingeführt. Den Namen erhielten sie auf Grund ihrer baumartigen Zytoplasmafortsätze. [100]

1.1.1 Überblick über Herkunft und Aufgaben von dendritischen Zellen

DCs sind spezialisiert auf die Aufnahme und Prozessierung von Antigenen und deren Präsentation an die Zellen des adaptiven Immunsystems. Sie stammen von den *cluster of differentiation* (CD) 34+ hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Ihre Vorläufer gelangen mit dem Blutstrom in praktisch alle Gewebe des Organismus, wo sie sich zu Langerhanszellen, dermalen DCs bzw. interstitiellen DCs entwickeln, die in einem unreifen Zustand verharren und auf Pathogenkontakt warten. In diesem Zustand sind sie zwar gut zur Antigenaufnahme und -prozessierung geeignet, besitzen aber nur geringe immunostimulatorische und migratorische Fähigkeiten [8],[16],[21],[58]. Treffen DCs auf Pathogene, so können sie diese aufnehmen, prozessieren und Antigene auf ihrer Oberfläche präsentieren. Sie werden nun in einen reifen Zustand überführt. Sie verlieren ihre phagozytischen/endozytischen Rezeptoren und durchlaufen eine Reorganisation des Zytoskelettes. Sie steigern die Oberflächendichte von *major histocompatibility complex* (MHC) Typ II, Adhäsionsmolekülen und costimulatorischen Molekülen. Sie gewinnen die Fähigkeit zur Migration und zur Stimulation von T-Lymphozyten. Aus dem

peripheren Gewebe gelangen sie nun entweder über den Blutstrom oder über den afferenten Lymphfluss zu den sekundär lymphatischen Organen, wo sie gezielt in die T-Zell-Zonen einwandern [16],[21].

Dendritische Zellen kontrollieren, vor allem über die Steuerung von T-Lymphozyten, die Induktion spezifischer Immunantworten *in vivo*. Ihre Immunogenität ist dabei von ihrem Reifegrad und dadurch indirekt vom Kontakt mit verschiedenen exogenen und endogenen Faktoren abhängig. Treffen dendritische Zellen auf Substanzen, die eindringende Pathogene oder eine Entzündungsreaktion anzeigen, führt dies zu ihrer Ausreifung. Kontakt mit solchen Sekundärsignalen wie z.B. *toll like receptor* (TLR)-Liganden ist als „*danger*“-Signal notwendig für die Induktion spezifischer Immunantworten [67],[69].

Dendritische Zellen präsentieren aber nicht nur Fremdartigene sondern auch Auto-Antigene des Organismus auf ihrer Oberfläche und können zur Selbst-Toleranz des Organismus beitragen. Es ist bekannt, dass unreife dendritische Zellen eher immunoinhibitorische Eigenschaften besitzen. Diese können nach Stimulation mit Substanzen wie Interleukin (IL) 10 oder *transforming growth factor* (TGF) β noch gesteigert werden. Man vermutet dass eine „*steady state*“ Migration von mit Autoantigenen beladenen dendritischen Zellen wichtig für die Hemmung autoreaktiver T-Lymphozyten in den sekundär lymphatischen Organen ist. Auch finden sich dendritische Zellen im Thymus und sind hier an der Apoptoseinduktion autoreaktiver T-Zellen beteiligt [13],[57],[63],[65],[76],[88],[102],[103].

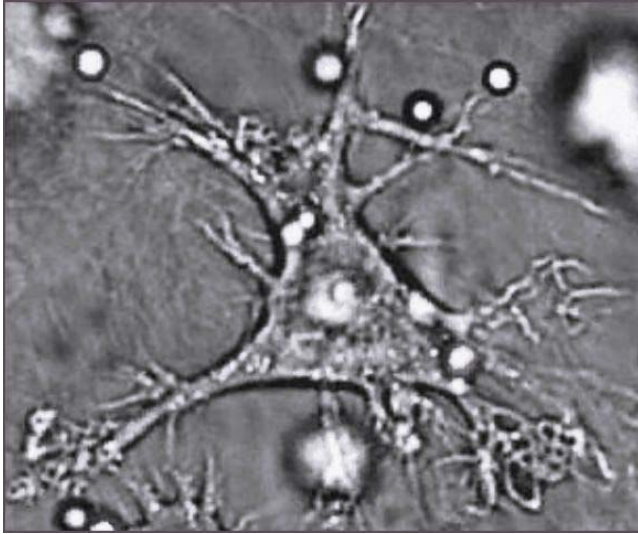


Abb. 1.1: Abbildung einer dendritischen Zelle in Interaktion mit einem Conidium aus "Environmental Dimensionality Controls the Interaction of Phagocytes with the Pathogenic Fungi *Aspergillus fumigatus* and *Candida albicans*"; Autoren: Judith Behnsen, Priyanka Narang, Mike Hasenberg, Frank Gunzer, Ursula Bilitewski, Nina Klippel, Manfred Rohde, Matthias Brock, Axel A. Brakhage, Matthias Gunzer. Creative Commons Attribution 2.5 License.

1.1.2 Herkunft und Entwicklung von dendritischen Zellen, Subtypen

Dendritische Zellen stammen von den CD34+ hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks ab. Sie müssen von den folliculären dendritischen Zellen unterschieden werden, die in den Keimzentren der Lymphfollikel vorkommen und eine Rolle bei der B-Zell-Reifung spielen. Dabei handelt es sich nicht um Leukozyten sondern um Zellen, die dem Stroma entstammen [53].

Die genaue Entwicklung der dendritischen Zellen ist unbekannt. Zwar gibt es viele in vitro Studien zur DC-Entwicklung, doch die Übertragbarkeit auf die Vorgänge in vivo ist ungeklärt.

1.1.2.1 Dendritische Zellen der Maus

Die heute gängigen Hypothesen bezüglich der Entwicklung stammen größtenteils aus Experimenten an der Maus. Hier werden zwei Entwicklungslinien unterschieden: Eine myeloide und eine lymphoide Linie. In vitro Studien konnten zeigen, dass sich aus *common myeloid progenitors* (CMP) unter Einfluss von *granulocyte-macrophage-colony stimulating factor*

(GM-CSF) sowohl Granulozyten, Monozyten als auch myeloide DCs entwickeln können. Es handelt sich dabei um eine CD8 α - DC-Subpopulation, die sowohl CD4⁺ als auch CD4⁻ negative Zellen umfasst. Diese Zellen exprimieren CD11b, CD11c und MHC Typ II, nicht jedoch das Oberflächenmolekül *dendritic and epithelial cells, 205 kDa* (DEC-205) (CD205). Sie kommen in der Milz der Maus in der Marginalzone vor, wandern jedoch unter dem Einfluss von inflammatorischen Stimuli wie LPS in die periarteriolären lymphatischen Scheiden (PALS) ein. Der Transfer von common lymphoid progenitors (CLP) in einen bestrahlten Wirt führte hingegen zur Entwicklung von T-Zellen, B-Zellen, Natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) und lymphoiden DCs. Letztere exprimieren CD11c, DEC-205 (CD205), MHC Typ II, und CD8 α . Sie kommen in der Milz der Maus in den PALS vor und machen den Hauptteil der DCs im Thymus aus [8],[16].

Die Annahme zweier getrennter Entwicklungslinien wird auch durch die Bedeutung unterschiedlicher Transkriptionsfaktoren gestützt. So konnte gezeigt werden, dass für den Transkriptionsfaktor Ikaros defizienten Mäusen die lymphoiden DCs fehlen. Dagegen besitzen die für die Transkriptionsfaktoren *V-rel reticuloendotheliosis viral oncogene homolog B, nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells 3* (RelB) oder *Spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi1* (SP1) defizienten Mäuse keine myeloiden DCs [110],[111],[112]. Andere Transkriptionsfaktoren, die für die DC-Entwicklung wichtig zu sein scheinen, sind *TNF receptor associated factor* (TRAF) 6, *Interferon regulatory factor* (IRF) 2, IRF-4, IRF-8, *Inhibitor of DNA binding 2, dominant negative helix-loop-helix protein* (Id) 2 und *Spleen focus forming virus (SFFV) proviral integration oncogene spi b* (Spi-B) [111].

Auf der anderen Seite wurde die strikte Trennung der beiden Entwicklungslinien durch Experimente in Frage gestellt, die zeigen konnten, dass sich aus CD11c⁺ myeloiden Vorläuferzellen sowohl myeloide (CD8 α -) als auch lymphoide DCs (CD8 α +) entwickeln können [68],[105].

Es wurde beobachtet, dass CD8 α - DCs eine starke Proliferation von T-Zellen auslösen können, während CD8 α + DCs die T-Zell-Proliferation inhibieren und über Fas/FasL Apoptose von CD4+ T-Lymphozyten auslösen können. Es wurde daher vermutet, dass CD8 α + DC eine Rolle bei der peripheren Toleranz und der negativen Selektion im Thymus spielen könnten, während CD8 α - DC eher eine Immunantwort auslösen. Diese Vermutung wird jedoch dadurch in Frage gestellt, dass gerade CD8 α + Zellen im Gegensatz zu CD8 α - stark IL-12 sezernieren.

In vivo konnte gezeigt werden, dass Antigen-gepulste CD8 α + DCs die Entwicklung von T-Helferzellen Typ I (T_H1) begünstigen, während CD8 α - DCs die Entwicklung von T-Helferzellen Typ II (T_H2) vorantreiben. Während CD8 α - DCs besser zur MHC Typ II-abhängigen Antigenpräsentation an CD4+ T-Zellen geeignet sind, können CD8 α + DCs besser mittels MHC Typ I Antigene an CD8+ T-Zellen präsentieren [8],[16].

1.1.2.2 Dendritische Zellen des Menschen

Im Menschen stammen die dendritischen Zellen des Gewebes von drei verschiedenen zirkulierenden Vorläufern ab: CD14+ CD11c+ Monozyten und CD14- CD11c+ myeloide DCs (mDCs), die einer myeloiden Linie entstammen, sowie CD14- CD11c- CD123+ (IL-3R α) plasmazytoide DCs (pDCs), die vermutlich einer lymphoiden Linie entstammen. Darauf weist unter anderem die Abhängigkeit ihrer Differenzierung von IL3, nicht aber GM-CSF hin. Auch ihre Expression von *pre-t-cell receptor α chain* (pT α) und die Abwesenheit der myeloiden Marker CD33 und CD13 weisen in diese Richtung. Daneben deutet auch die Blockierung der Differenzierung von T-Zellen, B-Zellen und plasmazytoiden dendritischen Zellen, nicht jedoch myeloiden Zellen, aus CD34+CD38- Prekursorzellen aus der fetalen Leber nach Transfektion mit Id-2 und Id-3 eine lymphoide Herkunft an.

Nach der anatomischen Lokalisation von dendritischen Zellen unterscheidet man die Langerhanszellen (LC) der Epidermis, die dermalen DCs (DDC) oder interstitiellen DCs (IDC), Marginalzonen DCs der Milz, interdigitierende DCs der

T-Zell-Zonen, Thymus DCs, Leber DCs, und Blut DCs. Obwohl gewisse phänotypische Unterschiede existieren, konnten bisher die Unterschiede bezüglich Herkunft, Reifung und funktionellen Eigenschaften noch nicht bestimmt werden [7],[8],[16].

Zu den myeloiden dendritischen Zellen gehören nicht nur die myeloiden Vorläuferzellen des Blutes sondern auch Gewebeformen der dendritischen Zellen wie Langerhanszellen und interstitielle DCs. Diese myeloiden oder auch als konventionelle DCs bezeichneten Zellen können T_H1 oder T_H2- Antworten auslösen, je nach ihrer Umgebung [1],[8],[68],[92].

Plasmacytoide DCs stellen einen besonderen Subtyp dar. Sie können als Reaktion auf Virusinfektionen, dem Dinukleotid Cytidine/Guanosine (CpG) und dem CD40 Liganden große Mengen Typ I Interferon (IFN) produzieren und waren daher vormals auch als *Interferon-Producing-Cells* (IPC) bekannt. PDCs scheinen die spezifische Immunantwort eher in Richtung einer T_H2-vermittelten Reaktion und damit einer Antikörper-vermittelten Immunantwort zu leiten [1],[8],[16],[26],[36],[47],[49],[62],[68],[92]. Die dendritischen Zellen der myeloiden Linie werden auch als DC1, die der plasmazytoiden Linie als DC2 bezeichnet [88].

Entwicklung und Überleben von mDCs scheint in vivo stark von GM-CSF abhängig zu sein. Für pDCs dagegen ist eher die Stimulation mit IL3 und CD40L von Bedeutung. *Fms-related tyrosine kinase 3 ligand* (Flt3L) steigert in Versuchspersonen sowohl die Zahl von mDCs als auch pDCs, während *granulocyte colony-stimulating factor* (G-CSF) nur die der pDCs steigerte [92]. Für die Entwicklung von LCs scheint TGF- β eine zentrale Rolle zu spielen [111].

1.1.2.3 Charakterisierung der Subtypen von dendritischen Zellen

Dendritische Zellen kommen im Körper nur in sehr geringen Mengen vor. Bis heute konnte kein spezifischer Marker für dendritische Zellen identifiziert werden. Sie werden durch Zusammenspiel einer Vielzahl von Faktoren, wie Morphologie, Zytokine-Sekretion, immunostimulatorische Kapazität,

Chemokinerezeptor-Profil und Migration auf chemotaktische Reize charakterisiert. Dendritische Zellen exprimieren typischerweise hohe Mengen von *Human leukocyte antigen* (HLA) DR in der Abwesenheit von „*lineage markers*“ wie CD14 (Monozyten/Macrophagen), CD3 (T-Zellen), CD19, CD20, und CD24 (B-Zellen), CD56 (NK-Zellen) und CD66b (Granulozyten). Das Muster der Oberflächenmoleküle wird auch durch den Reifegrad bestimmt. CD 1a wird hauptsächlich auf unreifen DCs exprimiert, CD83 auf reifen DCs. CD83 spielt wahrscheinlich eine Rolle bei der T-Zell-Stimulation [8],[60].

Man unterscheidet im peripheren Blut des Menschen plasmazytoide und myeloide DCs. Bei den myeloiden dendritischen Zellen differenziert man die CD4+CD1a+CD11c^{high} *Blood Dendritic Cell Antigen* (BDCA) 1(CD1c) -Zellen, die etwa 0.6% der PBMCs ausmachen, und die CD4+CD1a-CD11c^{low} BDCA-3+CD141+ Zellen, die weniger als <0.05% der PBMCs darstellen. BDCA-1+ myeloide dendritische Zellen exprimieren CD2, CD11b, CD13, CD32, CD33, CD64, CD45RO und CD116, während die BDCA-3+ Zellen CD13, CD33, CD45RO und CD116 exprimieren, nicht jedoch CD2, CD11b, CD32 und CD64. Myeloide dendritische Zellen exprimieren TLR2-TLR8 sowie die C-Typ-Lektine *dendritic cell-specific ICAM3-grabbing nonintegrin* (DC-SIGN) (CD 209), *dendritic cell lysosome-associated membrane glycoprotein* (DC-LAMP) (CD208), Mannose Rezeptor (CD 206) und DEC-205 (CD205) [1],[8],[68],[92].

Zu den myeloiden oder konventionellen dendritischen Zellen gehören nicht nur die im Blut zirkulierenden myeloiden Precursoren sondern auch die LCs und DDCs bzw. IDCs. Langerhanszellen sind charakterisiert durch die elektronenmikroskopische Nachweisbarkeit von Birbeck-Granula sowie die Expression des C-Typ Lektins Langerin (CD 207) und von E-Cadherin. Ihre Vorläufer im peripheren Blut tragen das Molekül cutaneous leukocyte Antigen (CLA) .Dem gegenüber wird CD11b nur auf DCDs/IDCs und aus Monozyten angezüchteten DCs (moDCs) exprimiert, nicht jedoch auf Langerhanszellen. Während man CD1a in fast allen Zellen der Gruppe der myeloiden oder konventionellen dendritischen Zellen findet, kommen die anderen Typen der CD1 Familie nur auf moDCs und DCDs/IDCs, nicht jedoch in LCs vor [88].

Bei den plasmacytoiden DCs handelt es sich um CD11c-CD4+ CD45RA+CD123(IL-3R α)+*immunoglobulin-like transcript* (ILT)3+ILT1- Zellen, die etwa 0.4% der PBMCs ausmachen. Sie exprimieren TLR 7, TLR 9 und 10 und die C-Typ-Lektine BDCA-2 und BDCA-4 sowie Dectin1 [1],[8],[16],[26],[36],[49],[47],[62],[68],[92].

1.1.3 Gewinnung von dendritischen Zellen in vitro

In vitro können DCs durch Behandlung von CD34+ hämatopoetischen Stammzellen mit verschiedenen Zytokinkombinationen, die GM-CSF, Flt3L, CD40 Ligand, TNF α , *stem cell factor* (SCF) oder TGF β enthalten, gewonnen werden[16],[20]. Neben ihrer physiologischen Herkunft aus CD 34+ hämatopoetischen Stammzellen können myeloide dendritische Zellen auch aus CD14+ Blutmonozyten generiert werden. Dazu werden diese mit einer Mischung aus den Zytokine IL4/ IL13 und GM-CSF behandelt [9] [16],[23],[93]. Blut-Monozyten können durch Plastikadhärenz gewonnen werden oder auch durch positive oder negative Selektion [94]. Diese, aus Monozyten angezüchteten, DCs (moDCs) befinden sich in einem unreifen Zustand, der, wie man glaubt, am ehesten dem Zustand der peripheren DCs ähnelt. Sie sind ähnlich effektiv in der Antigenaufnahme und Prozessierung wie reife DCs, zeigen jedoch geringere immunostimulatorische Eigenschaften [8],[14],[17],[77],[91].

Unreife DC scheinen eher zur Induktion von Antigen-spezifischerToleranz zu führen [33],[51]. Die Immunogenität von unreifen DCs kann durch Behandlung mit Substanzen wie *tumor necrosis factor α* (TNF α) und IL1, TLR-Liganden, CD40 Ligand, monocyte-conditioned medium (MCM) oder MCM mimic, das IL-1 β , TNF α , IL6, Prostaglandin E 2 (PGE2) enthält, erhöht werden [8],[9],[16],[58],[94],[102].

1.1.4 Molekulare Mechanismen in Steuerung und Funktion von dendritischen Zellen

1.1.4.1 Antigenaufnahme und Prozessierung

Die Aufnahme von Antigenen durch dendritische Zellen kann durch rezeptorvermittelte Endozytose mittels C-Typ-Lektinen (z.B. DEC-205 and DC-SIGN), die Spezifität für Glykane wie Mannose-Strukturen, Lewis-Antigene, N-Acetylglucosamine (GlcNAc), N-Acetylgalactosamine (GalNAc) oder β -Glucane besitzen, erfolgen. Auch durch die Fc γ -Rezeptoren Typ I und II (CD 64, CD32), „scavenger receptors“ wie *lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1* (LOX-1) und CD91, Phagozytose oder Makropinozytose ist die Aufnahme möglich. Dendritische Zellen können aber auch apoptotische und sterbende Zellen sehr effektiv mittels CD 36, Phosphatidyl-Serin-Rezeptor, Komplement-Rezeptor C1qR, der Rezeptor-Tyrosine-Kinase *C-mer proto-oncogene tyrosine kinase* (MerTK) und den Integrinen $\alpha\beta 5$ sowie $\alpha\beta 3$ aufnehmen und der Antigenprozessierung und -präsentation zuführen [2],[27],[50],[58],[61],[81],[90]. Nach Aufnahme werden die antigenen Peptide in den Endosomen zu Fragmenten abgebaut und schließlich die Antigenfragmente mittels MHC Typ II präsentiert. Dazu muss zunächst die invariante Kette (Ii) von MHC II abgebaut werden, die normalerweise die Peptidbeladung blockiert [44].

Exogene Antigene können jedoch durch Phagozytose und Makropinozytose auch Zugang zum Zytosol erhalten und mittels Abbau durch Proteasomen und mit Hilfe von *transporter associated with antigen processing* (TAP) ins Endoplasmatische Retikulum gelangen, wo sie in MHC Typ I eingebaut und präsentiert werden. Dies wird als „*crosspriming*“ bezeichnet und scheint vor allem in vivo eine große Rolle beim Priming von zytotoxischen T-Lymphozyten gegen Antigene zu spielen, die nicht von APCs synthetisiert werden. Dazu gehören z.B. Antigene von solchen intrazellulären Organismen wie Epstein-Barr Virus (EBV), die APCs selbst nicht infizieren [3],[10],[15].

Lipidantigene können mit Hilfe von CD1-Molekülen präsentiert werden, die mit β 2-Mikroglobulin heterodimerisieren und strukturelle Ähnlichkeit mit MHC I besitzen [52],[72].

1.1.4.2 Steuerung des Zytoskelettes

Die komplexe Steuerung der für die DC-Funktionen wichtigen Zytoskelettbestandteile ist weitestgehend unbekannt. Die Rho GTPasen *Cell division cycle 42* (Cdc42), *Ras-related C3 botulinum toxin substrate* (Rac) und *Ras homolog gene family* (Rho) scheinen an der Regulation der dendritischen Fortsätze von dendritischen Zellen und von spezialisierten Aktin-reichen Adhäsionsplaques in unreifen dendritischen Zellen, die als Podosomen bezeichnet werden, beteiligt zu sein. Rac und Cdc42 scheinen auch für effiziente Makropinozytose und Endozytose notwendig zu sein [19],[42],[104],[109].

1.1.4.3 Immunostimulation und Reifung von dendritischen Zellen

DCs haben immunostimulatorische Fähigkeiten, wie sich in der *mixed lymphocyte reaction* (MLR) als auch in der Fähigkeit, antigensepezifische T-Lymphozyten zu primen, zeigen lässt. Diese Eigenschaften werden nach Behandlung mit aktivierenden Stimuli verstärkt [14],[32],[91].

Um Antigene zu erkennen, müssen T-Lymphozyten zunächst einen „immunologische Synapse“ mit APCs bilden. Dazu ist Kontakt zwischen in MHC Molekülen präsentierten Antigenfragmenten und spezifischen T-Zell-Rezeptoren notwendig. Beteiligt sind auch assoziierte Moleküle wie CD4 bzw. CD8 und auch CD3 und ζ , die *immunoreceptor tyrosine-based activation motives* (ITAM) für die Interaktion mit Proteinkinase vom *V-src sarcoma (Schmidt-Ruppin A-2) viral oncogene homolog* (Src)-Typ wie *leukocyte-specific protein tyrosine kinase* (Lck) bietet. Diese führen letztendlich zur Aktivierung der Phospholipase C (PLC) γ -Kaskade und Ras-Kaskade, sowie von CD45, welches die Aktivierung von Src-Kinasen erlaubt. Über Transkriptionsfaktoren wie *nuclear factor-kappa B* (NF κ B), *Nuclear factor of activated T-cells* (NFAT)

und *Activating Protein 1* (AP-1) werden schließlich die Wirkungen vermittelt. Im Bereich der „immunologischen Synapse“ werden auch costimulatorische Moleküle konzentriert, die für die effektive Auslösung einer T-Zellantwort notwendig sind. Gut untersucht ist insbesondere die Interaktion zwischen CD28 auf der Oberfläche von T-Lymphozyten und B7.1 und B7.2 auf der Oberfläche von APCs. Umgeben ist die Zone von einem Ring aus Adhäsionsmolekülen, die Zell-Zell-Kontakt vermitteln [29],[34],[35],[48].

Einmal aktiviert können T-Lymphozyten selbst IL 2 produzieren, das in parakriner und autokriner Weise wirkt und ihre Proliferation und Differenzierung unterhält [58]. Jedoch spielen auch von den Antigen-präsentierenden Zellen ausgeschüttete Zytokine eine wichtige Rolle. So konnte gezeigt werden, dass Lymphozyten nach *T-cell receptor* (TCR)-Kontakt in Abwesenheit von IL12 zwar proliferieren aber keine Effektorfunktionen entwickeln. Dagegen differenzieren sie nach TCR-Stimulation in Gegenwart von IL12 zu T_H1-Zellen, die *Infγ* und TNFβ ausschütten. In Abwesenheit von IL12 aber Gegenwart von *cc chemokine ligand* (CCL)17 oder CCL22 differenzieren sie hingegen zu T_H2 Zellen, die IL4, IL5, IL6, IL10 und IL13 produzieren.

Die DC-T-Zell Interaktion funktioniert in reziproker Art und Weise: Über Oberflächenmoleküle wie CD40/CD40L, *Receptor Activator of Nuclear Factor κ B* (RANK)/ *TNF-related activation-induced cytokine* (TRANCE), OX40 (CD134)/OX40 Ligand oder 41BB (CD137)/41BB-L stimulieren T-Lymphozyten wiederum DCs und erhöhen ihrer immunostimulatorischen Fähigkeiten und IL12-Produktion, sowie ihre Lebensspanne. Letzteres geschieht insbesondere durch Regulation von *B-cell CLL/lymphoma* (BCL-2) [1],[16],[58].

Neben ihrem indirekten Einfluss auf B-Lymphozyten über Stimulation von T-Helferzellen können dendritische Zellen B-Zellen auch direkt beeinflussen. So können sie die Differenzierung von *memory* B-Zellen und aktivierten naiven B-Zellen zu Immunoglobulin (Ig)-sezernierenden Plasmazellen durch Sekretion von IL12 und löslichem IL6 Rezeptor α gp80 steigern, der an lösliches IL6 bindet. Auch können sie die Bildung von IgA durch B-Zellen mittels TGFβ

fördern. In den Keimzentren der Lymphfollikel finden sich ebenfalls dendritische Zellen, sogenannte *Germinal Center Dendritic Cells* (GCDC), die von den follikulären dendritischen Zellen unterschieden werden müssen. Diese scheinen hier an der Steuerung der B-Zell-Differenzierung und Proliferation beteiligt zu sein [8].

Auch an der Steuerung des angeborenen Immunsystems sind dendritische Zellen beteiligt. So sind sie durch Abgabe von Substanzen wie $\text{INF}\alpha$, IL12, IL15 oder IL18 zur Induktion von NK-Zellen befähigt [8],[39].

Die Ausreifung von dendritischen Zellen wird durch Stimulation mit Substanzen wie $\text{TNF}\alpha$, TLR-Liganden (z.B. Lipopolysaccharid (LPS), CpG, doppelsträngige (ds) Ribonukleinsäure (RNA)), PGE_2 , $\text{Inf } \gamma$, IL1 oder CD40 erreicht, die ein Eindringen von Pathogenen und/oder eine Entzündungsreaktion signalisieren. Wichtig für die Reifung ist die Signaltransduktion von TLR und IL1, die durch die *Myeloid differentiation primary response gene 88* (MyD88)- *interleukin-1 receptor-associated kinase* (IRAK)-TRAF6 Signalkaskade erfolgt, die in einer Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B und von *mitogen activated protein* (MAP) Kinasen mündet. Eine andere Signalkaskade erfolgt über Rezeptoren der TNF-Familie durch *TNFRSF1A-associated via death domain* (TRADD)/TRAF2 was schließlich ebenfalls in der Aktivierung von NF- κ B oder MAP-Kinasen-Pathways mündet [8].

Tab. 1.1: TLR-Rezeptoren und Liganden

Rezeptor	Liganden
TLR 1	Diverse Triacyl-Lipopeptide
TLR 2	Diverse Glycolipide, diverse Lipopeptide, diverse Lipoproteine, Lipoteichonsäure, Peptidoglycan , <i>heat shock protein</i> (HSP) 70, Zymosan
TLR 3	dsRNA, <i>Polyinosinic-polycytidylic acid</i> (PolyI;C)
TLR 4	Lipopolysaccharid, diverse HSPs, Heparansulfat- Fragmente, Fibrinogen, Hyaluronsäure-Fragmente
TLR 5	Flagellin

TLR 6	Verschiedene Diacyl-Lipopeptide
TLR 7	Imidazoquinoline, Loxoribine, Brompirimine, einzelsträngige RNA
TLR 8	Synthetische Substanzen, einzelsträngige RNA
TLR 9	CpG
TLR 10	Unbekannt
TLR 11	Profilin

1.1.4.4 Tolerogene Effekte und unreife dendritische Zellen

Unreife dendritische Zellen hingegen, scheinen an der Induktion antigenspezifischer Toleranz beteiligt zu sein [63]. Substanzen wie IL 10 oder TGF β können die Reifung von dendritischen Zellen unterbinden und die Toleranz-induzierenden Eigenschaften weiter verstärken. Ebenso wirkt der Kontakt mit und die Aufnahme von apoptotischen Zellen [101],[108]. Regulatorische T-Lymphozyten sind an der Regulation von Toleranz-Induktion mittels dendritischer Zellen beteiligt [107]. Wie gezeigt werden konnte, sind Antigen-gepulste unreife dendritische Zellen in der Lage, CD4+, CD25+, *Forkhead Box P3* (FoxP3)+ regulatorische T-Lymphozyten (Treg) zu induzieren, die vermutlich wesentlich an der Induktion von Selbst-Toleranz beteiligt sind, und spezifische Anergie gegen das beteiligte Antigen auszulösen [12],[55],[64]. Auch CD8+ Tregs sind beschrieben worden. Sie scheinen offensichtlich ebenfalls von unreifen DC induziert zu werden [82]. Tregs selbst auf der anderen Seite sind wiederum in der Lage, dendritische Zellen in einem unreifen Zustand zu halten und ihre tolerogene Wirkung zu unterstützen. Beteiligt daran sind wahrscheinlich die Ausschüttung löslicher Faktoren wie IL10 und TGF β , aber auch direkte Zell-Zell Interaktion wird diskutiert [63].

Beim Menschen konnte ein spezieller Subtyp von moDCs charakterisiert werden, die Indoleamin 2,3- Dioxygenase (IDO) exprimieren, ein Enzym, das am Katabolismus von Tryptophan beteiligt ist. Dies geht einher mit einer Inhibition der T-Zell-Proliferation und einer Induktion von T-Zell-Apoptose in vitro. IDO wird in DCs scheinbar durch Interaktion von B7 mit dem

inhibitorischen Molekül *Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4* (CTLA-4) induziert [38],[70],[74].

Die Ausreifung und Funktion von dendritischen Zellen kann durch das Zytokin IL10 gehemmt werden. Es handelt sich dabei um eine immunoinhibitorisch und antiinflammatorisch wirkende Substanz. In vitro hemmt es die Antigenpräsentation und Zytokinsekretion von dendritischen Zellen, Monozyten und Makrophagen [4],[5],[18],[30],[31],[37],[41],[54],[83],[98],[99],[108].

Doch ist diese Wirkung nicht nur durch die Hemmung der Reifung von dendritischen Zellen ausgelöst. In vitro mit IL10 behandelte, unreife dendritische Zellen werden in einen immunoregulatorischen Zustand versetzt, der zur antigenspezifischen Anergie von sowohl CD4+ als auch CD8+ T-Lymphozyten führt [73],[97],[108],[115]. So konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit IL10 zur Hochregulation der inhibitorischen Moleküle ILT3 und ILT4 führt. Es handelt sich um immunoinhibitorisch wirkende Ig-like Rezeptoren, die strukturell den killer cell inhibitory receptors verwandt sind und intrazellulär immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motives (ITIMs) besitzen. Auch kommt es zur Hochregulation von immunoinhibitorisch wirkenden Mitgliedern der B7 Familie wie B7-H1 (*Programmed death ligand* (PD-L)1), B7-DC(PD-L2), B7-H3 und B7-H4 [25],[63],[66]. Nolan et alii (et al.) konnten zeigen, dass mit IL10 behandelte, murine dendritische Zellen zwar sehr ineffektiv bei der Aktivierung von T-Lymphozyten sind, jedoch weiterhin die Fähigkeit zur Auslösung von Antworten des angeborenen Immunsystems besitzen. So könnte die IL10 Wirkung auf eine Verminderung der Aktivität des spezifische Immunsystems zu Gunsten des angeborenen Immunsystems abzielen [78]. Die Signalkaskaden, die die Wirkungen von Interleukin 10 auf dendritische Zellen steuern, sind noch weitestgehend unverstanden. Man weiß, dass IL-10 zu einer Aktivierung der Phosphoinositol-3 Kinase und über *Signal Transducer and Activator of Transcription* (stat) 3 zu einer Inhibition von NfκB führt [11],[46].

1.1.4.5 Molekulare Mechanismen in reifen und unreifen dendritischen Zellen

Im unreifen Zustand können dendritische Zellen Rezeptoren für inflammatorische Zytokine wie *cc chemokine receptor* (CCR) 1, CCR2, CCR5, CCR6, *cxc chemokine receptor* (CXCR) 1, CXCR3 und CXCR 4 exprimieren, die sie zum Ort eines Entzündungsgeschehens leiten. Dort können sie mittels *Intercellular adhesion molecule* (ICAM) 2 und Interaktion mit P- und E-Selectinen, die auf aktiviertem Endothel exprimiert werden, eindringen. Nach Aktivierung verlieren sie diese Fähigkeit und exprimieren stattdessen CCR7, den Rezeptor für *Macrophage Inflammatory Protein* (MIP) 3 β und CCL21, welcher Migration in die afferenten Lymphknoten vermittelt, wo sie auf T-Lymphozyten treffen. Desweiteren schütten sie auch Zytokine wie CCL18, *macrophage-derived chemokine* (MDC), *thymus and activation-regulated chemokine* (TARC), *pulmonary and activation-regulated chemokine* (PARC) und *IFN- γ -inducible protein* (IP) 10 aus, welche naive und Memory T-Zellen anziehen [1],[16].

Die Ausreifung von dendritischen Zellen erhöht ihre Fähigkeit zur Antigenprozessierung und -präsentation. In reifen dendritischen Zellen wird über eine Hochregulation der *ATP-dependent vacuolar proton pump* und damit einhergehender gesteigerter Aktivität von lysosomalen Hydrolasen der Abbau der invarianten Kette (Ii) von MHC Typ II gesteigert. Der proteolytische Abbau von Ii wird durch das Verhältnis zwischen Cathepsin S und seinem Inhibitor Cystatin c reguliert. Durch die Reifung wird die Expression von Cystatin C herunterreguliert und dadurch der Abbau von Ii gesteigert. Auch werden vermehrt Tubuli gebildet, die dem Transport zur Zelloberfläche dienen. DC-Reifung steigert auch die Synthese von TAP und von Komponenten der Immunoproteasomen wie *large multifunctional peptidase* (LMP) 2 und LMP7 [1],[8].

Nach der Reifung exprimieren dendritische Zellen vermehrt Adhäsionsmoleküle wie CD11a, CD11c, CD50, CD54 und CD58, die Zellkontakt vermitteln, sowie die costimulatorischen Moleküle CD80(B7.1), Cd86(B7.2), Dectin, CD40,

OX40L und 4-1BBL, die eine wichtige Rolle bei der DC-T-Zell Interaktion spielen [8],[16],[28],[43],[77],[86].

Auch sind reife DC in der Lage Zytokine wie TNF α , IL 6, IL12, IL15 und IL 18 auszuschütten, die an der Aktivierung von Lymphozyten beteiligt sind [8]. Das Zytokinprofil unterliegt dabei strenger Kontrolle und hängt vom Typ der Stimulation, dem DC-Subtyp, sowie der lokalen Umgebung der Zellen ab. So bewirken z.B. LPS und Flagellin, die TLR4 bzw. TLR5 stimulieren, in murinen DCs die über Phosphorylierung von p38 und *C-Jun N-terminal kinase* (JNK) 1/2 Kinasen die Ausschüttung von IL 12 und damit eine T_H1 Antwort. Im Gegensatz dazu bewirken TLR2 Agonisten wie *N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyll-[S]-seryl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysine* (Pam3Cys) und klassische T_H2 Stimuli wie Antigene aus Schistosomeneiern eine Phosphorylierung von *extracellular signal-regulated kinases* (ERK) 1/2, was in einer Stabilisierung des Transkriptionsfaktors *V-fos FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog* (c-Fos), einem Suppressor von IL-12, mündet und zu einer T_H2-Antwort führt. Ein anderes Beispiel ist, dass pDCs, nicht aber mDCs, nach Stimulation von TLR9 durch CpG große Mengen Typ I IFN als Antwort auf virale Infektionen produzieren [1],[58].

1.2 Identifizierung differentiell exprimierter Gene mittels cDNA Subtraktion

Im Vorfeld der vorliegenden Arbeit wurden Kandidatengene für eine differentielle Expression in humanen dendritischen Zellen identifiziert. Dazu wurde das cDNA Subtraction Kit „Clontech PCR-Select™“ der Firma Clontech Laboratories Inc eingesetzt, das nach dem Prinzip der *subtractive suppression hybridization* (SSH) arbeitet. Diese ermöglicht es, zwei unterschiedliche mRNA-Populationen, in diesem Fall von Monozyten und moDCs, zu vergleichen und diejenigen Gene zu identifizieren, die nur im zu testenden Zelltyp exprimiert werden.

Das Prinzip der SSH ist in der Abbildung 1.3 dargestellt. Aus den RNA-Proben der zu untersuchenden Zelltypen wird jeweils *copy DNA* (cDNA) synthetisiert. Die cDNA aus dem zu untersuchenden Zelltyp wird dabei als *tester cDNA*, die aus der Vergleichsprobe als *driver cDNA* bezeichnet. Die *tester cDNA* wird nun mit einem 4-Basen-schneidenden Restriktionsenzym, hier Rsa I, behandelt, dass zur Entstehung von stumpfen Enden führt. Sie wird dann in zwei Proben aufgeteilt, die jeweils mit einem unterschiedlichen Adaptor ligiert werden. Den Adaptoren fehlt am 5' Ende die Phosphatgruppe, sodass sie sich jeweils nur am 5' Ende eines bestehenden Strangs anlagern können. Es wird nun jeder Probe getrennt *driver cDNA* im Überschuss zugesetzt, die Doppelstränge denaturiert und die Hybridisierung erlaubt. Dabei kommt es zur Normalisierung der einzelsträngigen *tester cDNAs*, da die Hybridisierung einer Kinetik zweiter Ordnung folgt, also umso schneller je höher die jeweilige Konzentration ist.

In einem zweiten Schritt werden die beiden Proben nun gemischt und erneuter Hybridisierung unterworfen. Die dabei entstehenden Hybride (e) tragen unterschiedliche Adaptoren an beiden Enden, was ihre exponentielle Amplifikation durch PCR mit Primern gegen die Adaptoren erlaubt. Sie entsprechen den differentiell in den zu untersuchenden Zellen exprimierten Genen. Hybrid (c) wird nur linear amplifiziert und fällt daher nicht ins Gewicht, die anderen Hybride können nicht amplifiziert werden.

Die so angereicherte cDNA der differentiell exprimierten Gene kann nun kloniert, die positiven Kolonien können selektiert und die enthaltenen cDNA sequenziert und identifiziert werden.

Mit dieser Technik wurde auch das Gene Osteoactivin (DC-HIL) als Kandidat für eine differentielle Expression in dendritischen Zellen identifiziert, mit dem sich die vorliegende Arbeit befasst.

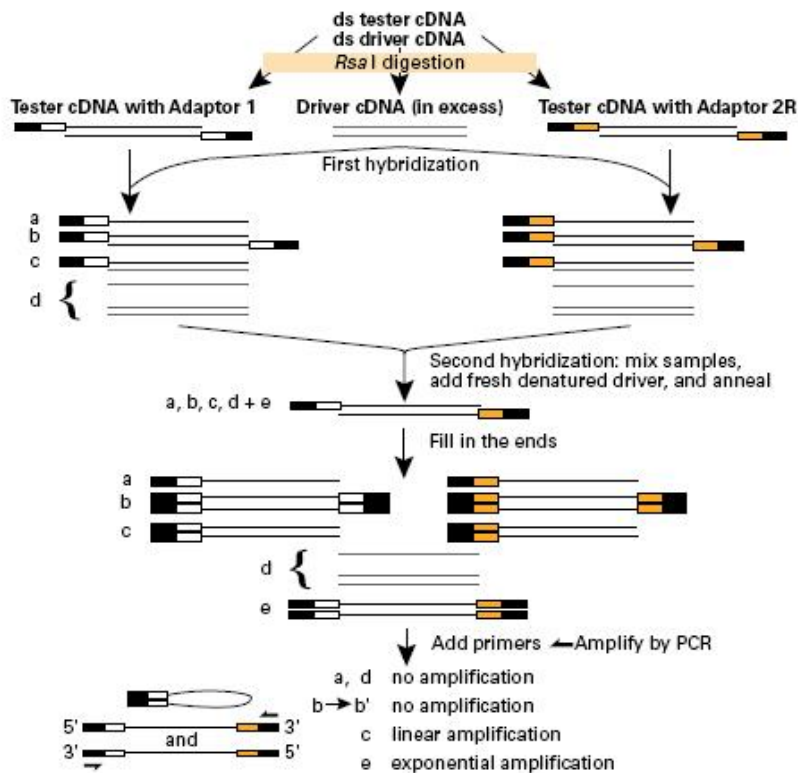


Abbildung 1.2: Prinzip der Subtractive Suppression Hybridization (SSH). Aus der Produktbeschreibung der Firma Clontech Laboratories Inc., www.clontech.com

1.3 Osteoactivin (DC-HIL)

1.3.1 Struktur und Expression von Osteoactivin (DC-HIL)

Verschiedene Synonyme werden verwendet um das Gen Osteoactivin zu bezeichnen. Dazu gehören auch *glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B* (GPNMB) und *dendritic cell-associated heparan sulfate proteoglycan-integrin ligand* (DC-HIL). Osteoactivin zeigt eine gewisse Homologie zum pMEL17 Precursor, einem Melanozyten-spezifischen Protein. Seine Expression wurde für Melanomzelllinien beschrieben. Hier findet es sich vor allem in solchen Linien mit niedrigem Metastasepotential. Daher wird es auch als GPNMB bezeichnet.

Das Gen Osteoactivin (DC-HIL) ist beim Menschen auf dem Chromosom 7p15 lokalisiert. Vom daraus entstehenden *messenger RNA* (mRNA)-Produkt existieren zwei verschiedenen Spleißvarianten: Die längere Isoform a, deren Translation zu einem Protein von 572 Aminosäuren (aa) Länge (63,9 kiloDalton (kDA)) führt, und eine kürzere Isoform b, deren Translationsprodukt eine Länge von 560 aa (62,6 kDA) besitzt [114]. Möglicherweise existiert auch eine am 3' verkürzte Variante, die zu einem Protein ohne den zytoplasmatischen Teil und die Transmembrandomäne von Osteoactivin (DC-HIL) führt [85].

Das Gen wird im menschlichen Körper vor allem in der Epidermis der Haut und den Haarfollikeln, im Nervensystem, in Osteoblasten und in APCs exprimiert. In der Zelle ist es auf der Zellmembran oder auch in endosomal/melasomalen Kompartimenten lokalisiert [114].

Beim Genprodukt des Osteoactivins (DC-Hil) handelt es sich um ein Typ I Transmembran Protein. Dies sind Proteine mit einer einzelnen Transmebrandomäne, deren N-Terminus nach extrazellulär orientiert ist, während der C-Terminus sich auf der cytoplasmatischen Seite befindet. In seinem extrazellulären Anteil findet sich ein RGD-Motiv (Aminosäuresequenz Arg-Gly-Asp), wobei es sich um eine Erkennungs- und Bindungsstelle für Integrine handelt. Auch findet sich eine Ig-artige *Polycytic Kidney Disease Domäne* (PKD), die typischerweise an Protein-Protein- oder Protein-Kohlehydrat-Interaktionen beteiligt ist. Direkt im Anschluss findet sich eine sogenannte *Proline-riche-Region* (PRR), die ebenfalls Protein-Protein-Interaktionen vermittelt. Am N-Terminus des Proteins findet sich ein mögliches Heparin bindendes Motiv mit der Sequenz BBXB (B für basische Aminosäuren, X für beliebige Aminosäuren). Auch lassen sich 12 N-Glycosilierungsstellen feststellen [24] [25],[113]. Im Intrazellulären Anteil finden sich zwei 2 lysosomale Targeting Motive (Dileucin) [113].

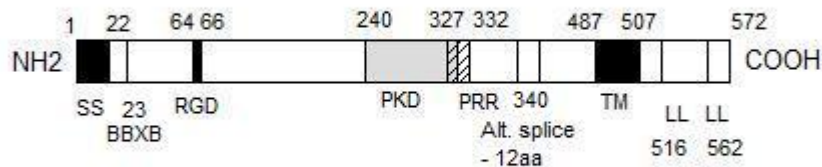


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Domain-Struktur des Proteins Osteoactivin und seiner Spleißvariante. NH2: Amino Terminus; SS: Signal Sequenz; BBXB: Heparin-bindendes Motiv; RGD: RGD Tripeptid; PKD, Polycystic Kidney Disease Domain; PRR: Proline Rich Region TM: Transmembran Segment; LL: Lysosomales Targeting Motiv Dileucin; COOH: Carboxyl terminus. Nummern der Aminosäuren werden oberhalb und unterhalb der Struktur angegeben. Alt. Splice: Einschub von 12 Aminosäuren durch alternatives Spleißen.

1.3.2 Wachstum und Reparatonsprozesse

Gemäß den bisherigen Untersuchungen scheint Osteoactivin eine Rolle bei Wachstums- und Reparatonsprozessen zu spielen. So ist bekannt, dass es in Osteoblasten exprimiert wird. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression im Osteopetrose-Modell in der Ratte gesteigert ist. Seine Funktion in Osteoblasten scheint in der Förderung der Osteoblastendifferenzierung und Stimulation von Differenzierungsmarkern wie Alkalische Phosphatase oder Osteocalcin zu bestehen. Osteoactivin fördert die Produktion und Mineralisation der ossären Matrix [89],[95].

Des Weiteren ist bekannt, dass Osteoactivin eine Rolle in Reparatons- und Fibrosierungsprozessen zu spielen scheint. So wird es vermehrt auf dem Sarkolem von denervierten Skelettmuskeln der Maus exprimiert. Hier scheint es die Expression von Kollagen Typ I, Matrix Metalloprotease (MMP) 3 und MMP9 in einwandernden Fibroblasten und fibroblastenartigen Zellen zu fördern [79]. Auch wird es in der Leber exprimiert, insbesondere in den Kupfferschen Sternzellen und Sinusoidalzellen. Seine Expression ist in der Leber der Ratte nach akuter Schädigung durch CCl₄ vermehrt. Auch konnte gezeigt werden,

dass es in der menschlichen Leber vermehrt bei Zuständen wie der fulminanten Hepatitis, Paracetamol-Vergiftung, Leberzirrhose, Hepatitis B und C exprimiert wird [45]. Gesteigerte Expression von Osteoactivin konnte auch in der Niere der Ratte nach unilateraler Ureterobstruktion beschrieben werden, hier vor allem in den dilatierten Epithelzellen der Tubuli und in interstitiellen Fibroblasten [75].

1.3.3 Rolle im Immunsystem

Ripoll et al. konnten zeigen, dass Osteoactivin in Makrophagen der Maus und auch in menschlichen Makrophagen exprimiert wird. Es wurde festgestellt, dass inflammatorische Signale wie LPS, CpG oder INF γ die Expression in Makrophagen der Maus steigern können. In GPNMB/V5 transfizierten RAW264.7 Zellen zeigte sich die Expression von Osteoactivin vor allem perinukleär im Bereich des Golgi-Apparates. Subsequente Behandlung mit LPS und INF γ führt zur Relokation vom Golgi-Apparat zur Zellperipherie. Im Überstand der so behandelten Zellen war ebenfalls Osteoactivin nachweisbar, nicht jedoch die am C-terminus mit V5 markierte Variante. Unter Umständen wird eine am C-Terminus verkürzte Variante sezerniert [85].

Die Osteoactivin-Überexpression führt zur verminderten LPS/Inf γ induzierten IL6 und IL12p40 Sekretion und zur Reduktion der NO-Freisetzung. Ripoll et al. schlossen hieraus, dass Osteoactivin als negativer Feedback-Regulator der inflammatorischen Reaktion von Makrophagen dient, was auch dadurch unterstrichen wird, dass inflammatorische Reaktionen in GPNMB-defizienten Mäusen in gesteigertem Maße beobachtet werden konnten [85].

Chung et al. konnten zeigen, dass Osteoactivin (DC-HIL) an einen Liganden an der Oberfläche aktivierter Maus T-Lymphozyten binden kann und als negativer Regulator der T-Zell Aktivität dient. Seine Bindung führte unter anderem zur verminderten Aktivierung von T-Lymphozyten, verminderter IL2-Sekretion und verminderter Proliferation von T-Lymphozyten. Es konnte gezeigt werden, dass *small interfering RNA* (siRNA) Knockdown von Osteoactivin in dendritischen Zellen der Maus zur einer verminderten T-Zell-Stimulation durch diese führt [25]. Die Bindung von Osteoactivin an die Lymphozytenoberfläche der Maus

erfolgt über den Liganden Syndecan-4, ein Typ I Transmembran Heparan-Sulfat-Proteoglykan, wobei vor allem die Bindung an die PKD-Domäne eine entscheidende Rolle zu spielen scheint. Die PKD defiziente Mutante verliert ihre immunoinhibitorische Eigenschaften [24].

Shikano et al. stellten fest, dass Osteoactivin die Bindung von dendritischen Zellen der Maus an Endothelzellen vermitteln kann. Das Erkennen und die lose Bindung der Oberfläche scheint dabei über Heparan-Sulfat-Proteoglykane (HSPG) vermittelt zu werden, die potentiell mit mehreren möglichen Bindungsstellen des Osteoactivins interagieren können (BBXB, PKD). So konnte gezeigt werden, dass die Bindung durch Heparin und Fucoidan unterdrückt werden kann. Die feste Adhäsion scheint im Gegensatz dazu durch Interaktion von RGD mit Integrinen vermittelt zu werden. Diese ist in der RGD-defizienten Mutante gestört [96].

Es ist des weiteren bekannt, dass eine Punktmutation in Osteoactivin die Variante *Pigment Dispersion Syndrome* (PDS) des altersabhängigen pigmentären Glaukoms im DBA/2J Mausmodell auslöst. Gemäß der ursprünglichen Hypothese wird die Entstehung der Erkrankung durch Störungen in melasomalen Prozessen vermittelt. Neuere Befunde zeigen jedoch, dass auch eine Störung von immunosuppressiven Prozessen an der Pathogenese beteiligt ist. So konnte gezeigt werden, dass der Humor aqueosus im DBA/2J Mausmodell seine immunosuppressiven Eigenschaften verliert. Auch büßt das Auge sein immunologisches Privileg ein (Auslösung von *delayed type hypersensitivity* (DTH) nach Injektion von Antigenen in die Vorderkammer, Wachstum von Tumoren nach intraoculärer Injektion wird unterdrückt). Es kommt zu einer Störung der Blut/Augen-Schranke mit Akkumulation von Leukozyten in der Iris und Augenvorderkammer [71].

1.3.4 Bedeutung für die Onkologie

Osteoactivin wird in Zelllinien des malignen Melanoms, in Gliomen, Mammakarzinoms, Magenkarzinoms und Pankreaskarzinoms überexprimiert. Im Allgemeinen fördert die starke Expression hier Invasivität und

Metastasepotential, mit Ausnahme des maligne Melanoms, wo die Expression vor allem in solchen Linien mit niedrigem Metastasepotential beschrieben wurde.

Im Mausmodell konnte die gesteigerte Invasivität und das erhöhte Metastasepotential durch Osteoactivin demonstriert werden. Hierbei wurde ein humanes Tumormodell bestehend aus transformierten Astrocyten (die sogenannte thr glioma line) eingesetzt. Für sich genommen zeigten diese Zellen nach intrakranieller Implantation im immunodefizienten Mausmodell keine Invasivität, jedoch hohe Invasivität nach Einbringen von Osteoactivin. Auch zeigten solche Zellen hohes Metastasepotential nach subkutaner Implantation im immunodefizienten Mausmodelle [84].

Osteoactivin wird auch in Glioblastoma multiforme (GBM) Zellen exprimiert. Hohe Expression korreliert hier mit schlechterer Überlebensrate. Eventuell ist Osteoactivin hier als Prognosemarker oder gar als potentielles Target für gezielte Therapieansätze geeignet [56].

Osteoactivin wird auch verstärkt exprimiert in beginnendem Hepatocellulären Karzinom (HCC) in Ratten, die einer cholindefizienten, L-Amino Säure-definierten (CDAA) Diät ausgesetzt werden. Im menschlichem HCC und in umgebendem zirrhotischen Gewebe konnte ebenfalls gesteigerte Expression gezeigt werden. Osteoactivin Überexpression scheint dabei auch die Beweglichkeit, Invasivität und das Metastasepotential von Ratten-Hepatomzellen zu steigern [80].

Im Mausmodell wird Osteoactivin zudem selektiv in aggressiven, Knochenmetastasen auslösenden Mammakarzinomzellen exprimiert. Es scheint hier ebenfalls die Beweglichkeit, Invasivität und das Potential für Knochenmetastasen zu fördern [87].

Auch in Melanomzelllinien wird Osteoactivin exprimiert. Hier findet es sich vor allem in solchen Linien mit niedrigem Metastasepotential. Es bietet sich als

potentielles therapeutisches Target an. Antibody-Drug-Konjugate mit Monomethylauristatin E wurden bereits entwickelt [106].

1.4 Zielsetzung der Arbeit

Obwohl die groben Umrisse der Entwicklung und Funktion von dendritischen Zellen bekannt sind und ihre zentrale Rolle im Immunsystems gewürdigt wurde, ist die Erforschung und Charakterisierung von dendritischen Zellen noch längst nicht abgeschlossen. Viele Moleküle, die eine entscheidende Rolle in der Vermittlung der spezifischen Funktionen von dendritischen Zellen spielen könnten, sind weiterhin wenig oder unerforscht.

Interessant für die weitere dahingehende Untersuchung sind vor allem solche Gene, die differentiell in dendritischen Zellen exprimiert werden, jedoch nicht in anderen Leukozytensubpopulationen zu finden sind. Mit der Entschlüsselung des menschlichen Genoms und durch die subtraktive cDNA-Analyse ist es nun möglich, weitere neue Gene dieser Art zu identifizieren.

Ziel der vorliegende Arbeit ist es, die differentielle Expression des Genes Osteoactivin (DC-HIL) in dendritischen Zellen zu untersuchen. Zunächst soll die differentielle Expression in dendritischen Zellen im Vergleich zu Monozyten, einer ihrer Vorläuferpopulationen, verifiziert werden. Dazu wird zum einen die Expression auf mRNA Ebene mit Hilfe von *Reverse Transcription PCR* (RT-PCR) untersucht, zum anderen die Expression auf Protein-Ebene mit Hilfe von Western-Blot. Da die Entwicklung und die funktionellen Eigenschaften von dendritischen Zellen stark durch die Stimulation mit bestimmten Zytokinen bzw. die Behandlung mit spezifischen Inhibitoren beeinflusst wird, soll auch der Einfluss dieser auf die Expression von Osteoactivin Gegenstand dieser Untersuchungen sein. Auch soll die Expression in verschiedenen Subpopulationen von dendritischen Zellen des peripheren Blutes, der am leichtesten zugänglichen und verfügbaren Art menschlicher dendritischer Zellen, und die Expression in Lymphozyten untersucht werden.

Ein besseres Verständnis der Rolle von Osteoactivin (DC-HIL) in der Physiologie von dendritischen Zellen könnte in Zukunft zu einem besseren Verständnis der dendritischen Zellen, ihrer molekularen Mechanismen und ihrer Rolle innerhalb des Immunsystems beitragen. Da dendritische Zellen häufig auch in in vitro und in vivo Modellen sowie in klinischen Studien zur Induktion spezifischer T-Zell-Antworten eingesetzt werden, kann durch ein besseres Verständnis der Biologie von dendritischen Zellen vielleicht langfristig eine Verbesserung dieser Anwendungen erzielt werden.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Tab. 2.1: Verwendete Geräte

Produkt	Hersteller
Brutschrank NuAire™ US AutoFlow	NuAire™ Inc., Plymouth, USA
Durchflusscytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg, D
Fotometer RNA/DNA Calculator Gene Quant™ II	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, D
Gefrierschrank –85°C UF 300	Napco, Winchester, USA
Gelelektrophoresekammer	Appligene, Heidelberg, D
Heizblock Unitek™ HBS 130	Peqlab, Erlangen, D
Heiz- und Magnettührer: RCT Basic IKA®	VWR International GmbH, Bruchsal, D
Kühlschrank Kombination 4°C und -20°C	Liebherr, Ochsenhausen, D
Lightcycler® Gerät für Realtime PCR	Roche Applied Science, Indianapolis, USA
Magnetic cell separators: MidiMACS und QuatroMACS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Mikropipetten 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Eppendorf, Hamburg, D
Mikropipetten 10µl, 20µl, 200µl, 1000µl	Gilson Inc., Middleton, USA
Mikroskop Olympus MO21	Olympus Optical GmbH, Hamburg, D
Minishaker MS2 IKA-Works	IKA-Works Inc., Wilmington, USA
Mini Trans Blot Cell	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow	Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim, D
Neubauer Zählkammer 0,1 mm Tiefe	Sigma, Deisenhofen, D

Material und Methoden

PCR-Gerät Gene Amp PCR System 9600	PerkinElmer Life Science, Zaventem, B
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Integra Biosciences AG, Baar, CH
Reinluftwerkbank Heraeus Hera Safe HS 18/2	Heraeus, Hanau, D
Schüttelbank KM-2 Akku	Edmund Bühler GmbH, Hechingen, D
Schüttelbank Plymax 1040	Heidolph, Schwabach, D
SDS-PAGE-Kammer Mini-Protean 3 electrophoresis system	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Spannungsgerät EPS 200	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, D
Spannungsgerät EPS 300	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, D
Spannungsgerät EPS 601	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg, D
UV-Reader Biometra Bio Doc Analyze	Whatman Biometra GmbH, Göttingen, D
Wasserbad GFL	GFL, Burgwedel, D
Wasserbad WB/OB 7-45 W-BU 45	Memmert, Schwabach, D
Western Blot Kammer Mini	Bio Rad Laboratories GmbH, München, D
Zentrifuge Eppendorf 5417 R	Eppendorf, Hamburg, D
Zentrifuge Heraeus 1.0 R	Heraeus, Hanau, D
Zentrifuge Multifuge 3 S-R	Heraeus, Hanau, D

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Tab. 2.2 Verwendete Verbrauchsmaterialien:

Produkt	Hersteller
96-Loch-Platte Cellstar® F-shape, with lid, TC-Plate	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Autoradiographiefilm Kodak Biomax Light Film 13 x 18 cm	Kodak, Rochester, USA
500-PP-Reaktionsgefäße Cellstar® 1,5 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen, D
Combitips Plus 0,5ml	Eppendorf, Hamburg, D
Einwegspritzen Injekt 5 ml, 10 ml, 20 ml	Braun, Melsungen, D
Falcon® Blue Max™, 50 ml Blue Cups	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Falcon® 5ml Polystyrene Round-Bottom Tube	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Handschuhe SafeSkin Satin Plus®	Kimberley Clark, Roswell, USA
Kanülen Microlance 3 26G 0,3/0,45x13	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Kanülen Sterican 0,9x70 mm	Braun, Melsungen, D
Lightcycler® Kapillaren 20 µl	Roche Applied Science, Indianapolis, USA
MACS-Säule MACS Column LS	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach, D
Microtubes 0.2 ml (PCR Softstrips)	Biozym Scientific, Olendorf, D
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell, Dassel, D

Pasteurpipette 3 ml, Einweg	Carl Roth GmbH & Co., Karlsruhe, D
Pipetten Serological Pipet 2 ml Falcon	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA
Pipetten Stripette 5 ml, 10 ml, 25 ml, 50 ml	Corning GmbH, Kaiserslautern, D
Pipettenspitzen blau 1,0 ml und gelb 0,2 ml	Sarstedt AG & Co., Nürmbrecht, D
Whatman-Papier	BioRad Laboratories GmbH, München, D
Zellkulturflasche Falcon® Tissue 0.2 µm Vented Blue Plug Seal Cup 275 ml	Becton Dickinson, Franklin Lakes, USA

2.1.3 Medien, Reagenzien und Antikörper

Tab. 2.3 Verwendete Medien, Reagenzien und Antikörper

Produkt	Hersteller
30% Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)	Serva Electrophoresis, Heidelberg, D
Ammoniumpersulfat	Roth, Karlsruhe, D
Aprotinin (2 mg/ml)	Sigma, St. Louis, USA
Anti-CD3 Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
Anti-CD19 Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
Anti-CD14 Microbeads	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
Antikörper horseradish peroxidase- conjugated anti-mouse IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D
Antikörper horseradish peroxidase- conjugated anti-goat IgG	Santa Cruz Biotechnology Inc., Heidelberg, D
Antikörper goat anti-human Osteoactivin IgG, polyklonal	RnD Systems, Minneapolis, USA
Antikörper mouse anti-human Osteoactivin IgG, monoclonal	RnD Systems, Minneapolis, USA

Material und Methoden

Antikörper goat anti-mouse PE, F(ab') ₂	Dako, Glostrup, DK
Antikörper mouse anti-GAPDH IgG	HyTest Ltd., Turku, FIN
Antikörper mouse IgG	BD Biosciences, San Jose, USA
Antikörper mouse IgG2b	Dako, Glostrup, DK
β-Mercaptoethanol	Sigma, St. Louis, USA
BCA Protein Assay Reagent Kit	Pierce, Peribo Science, Bonn, D
Bromphenolblau	Sigma, St. Louis, USA
BSA	Roche, Mannheim, D
cDNA-Set: Superscript™ III, first strand synthesis system for RT-PCR	Invitrogen, Karlsruhe, D
DMSO	Sigma, St. Louis, USA
DNA-free™ Kit	Applied Biosystems, Darmstadt, D
DTT	Roth, Karlsruhe, D
ECL™ plus detection reagent	Amersham Biosciences Europe, Freiburg, D
EDTA 0.5 M	Sigma, St. Louis, USA
FACS-Antikörper mouse Anti-CD1a FITC	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
FACS-Antikörper mouse Anti-CD14 FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Antikörper mouse Anti-CD19 FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Antikörper mouse Anti-CD86 FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Antikörper mouse Anti-HLA-DR FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Antikörper mouse IgG1 FITC	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Antikörper mouse Anti-CD3 PE	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Antikörper mouse Anti-CD14 PE	BD Biosciences, San Jose, USA

Material und Methoden

FACS-Antikörper mouse Anti-CD19 PE	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Antikörper mouse Anti-CD56 PE	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Antikörper mouse Anti-CD80 PE	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Antikörper mouse Anti-CD83 PE	Immunotech, Marseille, Frankreich
FACS-Antikörper mouse Anti-CD123 PE	BD Biosciences Pharmingen, San Diego, USA
FACS-Antikörper mouse Anti-HLA-DR PE	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Antikörper mouse IgG1 PE	BD Biosciences, San Jose, USA
FACS-Antikörper mouse Anti-CD1c (BDCA1) PE	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
FACS-Antikörper mouse Anti-BDCA2 PE	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
FACS-Antikörper mouse Anti-BDCA3 PE	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
Fetal Bovine Serum 10082	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, D
Ficoll: Biocoll Separating Solution	Biochrom AG, Berlin, D
Glycerin	Roth, Karlsruhe, D
Glycin	Roth, Karlsruhe, D
GM-CSF Leucomax	Novartis, Basel, CH
Größenmarker Bench Mark™ Prestained Protein Ladder Marker	Invitrogen, Karlsruhe, D
Größenmarker GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	MBI Fermentas, St. Leon Rot, D
Igepal CA-630	Sigma, St. Louis, USA
IL-4	R&D Systems, Wiesbaden, D
IL-10	R&D Systems, Wiesbaden, D

Material und Methoden

Lightcycler® Taqman® Mastermix	Roche Applied Science, Indianapolis, USA
LPS (Lipopolysaccharid, TLR-4-Ligand)	Sigma, St. Louis, USA
Medium RPMI 1640 with Glutamax 11875	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, D
MACS Blood Dendritic Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
MACS BDCA-2 Dendritic Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
MACS CD1c (BDCA1) Dendritic Cell Isolation Kit	Miltenyi Biotech, Bergisch Gladbach, D
Medium X-Vivo 20	Bio Whittaker, Wakersville, USA
Mercaptoethanol	Sigma Chemical Co., St. Louis, USA
Natriumdeococholat	Roth, Karlsruhe, D
Natriumorthovanadat	Roth, Karlsruhe, D
Pam ₃ Cys (N-Palmitoyl-S-[2,3-bis(palmitoyloxy)-(2RS)-propyl]-[R]-cysteinyl-[S]-seryl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysyl-[S]-lysine, TLR-2-Ligand)	EMC microcollections GmbH, Tübingen, D
PBS: Dulbeccos Phosphate Buffered Saline 0,0095 M (PO ₄)	Bio Whittaker Europe, Verviers, B
PCR-Set: Amplitaq	Perkin Elmer, Boston, USA
Penicillin-Streptomycin 100 ml	Invitrogen Gibco™, Karlsruhe, D
PMSF	Sigma, St. Louis, USA
Poly I:C (Polyinosinic:polycytidylic acid, TLR-3-Ligand)	Sigma, St. Louis, USA
Primer beta-2-Mikroglobulin Forward 5'gggttcatccatccgacat3' Reverse 5'gatgctgcttacatgtctcga3'	zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Frank Grünebach (Molekulare Diagnostik, Innere Medizin II, Universitätsklinik Tübingen)

Primer C261 (Osteoactivin) Forward 5'actggcctgtttgttccac3' Reverse 5'tcctggggtgttgaatcat3'	zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Frank Grünebach (Molekulare Diagnostik, Innere Medizin II, Universitätsklinik Tübingen)
Primer GPNMB für Realtime PCR Left 5'aaaccaccccttcttagc3' Right 5'tggcagtttcatcaggaatc3'	zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Frank Grünebach (Molekulare Diagnostik, Innere Medizin II, Universitätsklinik Tübingen)
Primer PBGD für Realtime PCR Left 5'cgcatctggagttcaggagta3' Right3' ccaggatgatggcactga3'	zur Verfügung gestellt von PD Dr. rer. nat. Frank Grünebach (Molekulare Diagnostik, Innere Medizin II, Universitätsklinik Tübingen)
R 848 (Resiquimod, TLR-7-Ligand)	InvivoGen, San Diego, USA
Reliant ®Gele System, 4% NuSieve ® 3:1 Plus Agarose	Lonza, Basel, CH
RNeasy Mini Kit	Qiagen GmbH, Hilden, D
SDS	Roth, Karlsruhe, D
Slim Fast Schokolade	Slim Fast Deutschland GmbH, Wiesbaden, D
Imatinib (STI 571)	Novartis Pharmaceuticals, Basel, CH
TEMED	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, D
TRIS	Roth, Karlsruhe, D
Trypanblau	Seromed, Biochrom AG, Berlin, D
Tween® 20	Sigma, St. Louis, USA
Universal Probe Library Sonde #1 für Realtime PCR	Roche Applied Science, Indianapolis, USA
Universal Probe Library Sonde #18 für Realtime PCR	Roche Applied Science, Indianapolis, USA

Alle verwendeten Reagenzien, die in dieser Tabelle nicht explizit erwähnt werden, wurden von den Firmen Merck (Hohenbrunn, D), Roth (Karlsruhe, D), Serva (Heidelberg, D) und Sigma (St. Louis, USA) bezogen.

2.1.4 Puffer und Lösung

Tab. 2.4 Verwendete Puffer und Lösungen

<i>Eingesetzt bei</i>	<i>Name</i>	<i>Zusammensetzung</i>
Western Blotting	<i>Radio Immunoprecipitation Assay (RIPA)-Lysepuffer</i>	1% Igepal CA-630 0,5% Natriumdeoxycholat 0,1% Natriumdodecylsulfat (SDS) 2 mM Ethylendiamintetraacetat (EDTA) In <i>phosphate buffered saline</i> (PBS)

Western Blotting	Nonylphenoxypolyethoxy-ethanol (NP40)-Lysepuffer	0,05 M 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure (HEPES) pH 7,5 150 mM NaCl 1% Igepal CA-630 2 mM EDTA 10% Glycerin 2 mg/ml Aprotinin 1 mM Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF) In PBS
Durchflusszytometrie	<i>fluorescence activated cell sorting</i> (FACS)-Puffer	0,5% BSA In PBS
Magnetische Zellsortierung	<i>magnetic-activated cell sorting</i> (MACS)-Puffer	0,5% BSA 2 mM EDTA In PBS
Agarose-Gelelektrophorese	Ladepuffer, 6fach	0,15% Bromphenolblau 0,15% Xylencyanol 1 mM EDTA pH 8,0 30% Glycerin
Western-Blotting	Transferpuffer für <i>sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> (SDS-Page)	192 mM Glycin 25 mM Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) 0,1 % SDS 20% Methanol
Western-Blotting	Laufpuffer für SDS-Page	192 mM Glycin 25 mM TRIS 0,1 % SDS

Western-Blotting	Probenpuffer für SDS-Page, 3fach	0,18 M Tris-HCl pH 6,8 28% Glycerin 0,001% Bromphenolblau 6% SDS
Western Blotting	<i>TRIS-buffered Saline</i> (TBS)	10 mM Tris-HCL pH 8,0 140 mM NaCl
Western-Blotting	0,5 % <i>TRIS-buffered saline with Tween</i> (TBST)	10 mM Tris-HCL pH 8,0 140 mM NaCl 5% Tween 20
Western-Blotting	3% TBST	10 mM Tris-HCL pH 8,0 140 mM NaCl 3% Tween 20 In H ₂ O
Agarose-Gelelektrophorese	Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)	40 mM Tris 13 mM Essigsäure pH 8,0 1 mM EDTA pH 8,0

2.2 Methoden

2.2.1 Isolation von mononukleären Zellen aus peripherem Blut

Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMNC) wurden aus *buffy coats* von freiwilligen Spendern der Blutspendezentrale Tübingen gewonnen. Hierzu wurden die *buffy coats* zunächst im Verhältnis 1:4 mit PBS verdünnt. Im Anschluss wurden 50 ml Falcon® Kunststoffröhrchen mit jeweils 12 ml Ficollösung befüllt und vorsichtig mit 35 ml des verdünnten *buffy coats* überschichtet. Dabei wurde auf eine möglichst glatte Trennschicht zwischen den beiden entstehenden Phasen geachtet. Die Falcon® Kunststoffröhrchen wurden nun in der Zentrifuge Multifuge 3 S-R für 18 Minuten bei 1800 rpm (Bremskraft und Beschleunigung 2) zentrifugiert. Durch diesen Schritt trennten sich die PBMNCs, die eine geringere Dichte aufweisen als Ficoll und daher an der Oberfläche der Ficollschicht verblieben, von den übrigen Blutzellen

(Erythrozyten, Granulozyten, Thrombozyten, Zelltrümmer), die sich auf Grund der höheren Dichte am Boden absetzten. Als oberste Schicht fand sich ein Plasmaüberstand, welcher nun vorsichtig mit Hilfe einer Absauganlage auf 2-3 cm oberhalb der PBMNC-Schicht abgenommen wurde. Nun konnten die PBMCs mit einer Einweg-Pasteurpipette aufgenommen und in 50 ml Falcon® Kunststoffröhrchen gesammelt werden. Diese neuen Kunststoffröhrchen wurden nun jeweils mit PBS auf 50 ml aufgefüllt und in der Zentrifuge Multifuge 3 S-R bei 1500 rpm (Bremskraft und Beschleunigung 8) für 5 min zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde zweimalig durchgeführt. Im Anschluss wurde die erhaltenen PBMNCs in jeweils 10 ml Nährmedium (Roswell Park Memorial Institut: 1640-Zellkulturmedium (RPMI 1640), 10% *fetal calf serum* (FCS), 2% Penicillin/Streptomycin (PenStrep)) aufgenommen und ihre Zahl mit Hilfe einer Neubauerzählkammer bestimmt.

2.2.2 Zellzählung

Für die Bestimmung der Zellzahl wurden 10 µl der Zellsuspension mit 10 µl Trypanblau und 80 µl RPMI gemischt, was einer Verdünnung von 1:10 entspricht. Erwies sich diese als nicht ausreichend zur Durchführung des Zählvorganges, so konnten 10 µl der Mischung mit 20 µl RPMI weiter auf 1:30 verdünnt werden. Da Trypanblau nur die Zellmembran beschädigter Zellen durchdringen kann, ist unter dem Mikroskop eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen möglich. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-Zählkammer unter dem Mikroskop Olympus MO21 durch Bestimmung der durchschnittlichen Zellzahl in den 16-Felder Eckquadraten. Hieraus lässt sich die Gesamtzellzahl nach folgender Formel berechnen:

durchschnittliche Zellzahl in Eckquadrat $\times 10^4$ $\times 10$ (bzw.30, je nach verwendeter Verdünnung) \times Volumen der Zellsuspension [ml] = Gesamtzellzahl

* Neubauer-Zahl

2.2.3 In vitro Generierung von dendritischen Zellen aus Monozyten

Dendritische Zellen wurden in vitro aus Monozyten generiert. Die eingesetzten Monozyten können entweder durch Plastikadhärenz oder durch magnetische Zellsortierung (siehe 2.2.4) aus PBMNCs isoliert werden. Zur Gewinnung durch Plastikadhärenz werden zwischen 7×10^7 und 1×10^8 PBMNCs in einer Zellkulturflasche Falcon® Tissue 0.2µm Vented Blue Plug Seal Cup 275 ml für 2 Stunden in 10 ml X-VIVO inkubiert (T=37°C, 5,0% CO₂). Nach Abschluss der Inkubation haften die Monozyten am Boden der Zellkulturflasche, die übrigen Zellen können durch dreimaliges Spülen mit 10 ml PBS entfernt werden. Nach Gewinnung der Monozyten werden diese in einer Zellkulturflasche Falcon® Tissue 0.2µm Vented Blue Plug Seal Cup 275 ml in 10 ml Nährmedium (RPMI 1640, 10% FCS, 2% PenStrep) für 7 Tage kultiviert. Um die Differenzierung zu unreifen dendritischen Zellen zu bewirken, wird jeweils an den Tagen 0, 2, 4 und 6 nach Beginn der Zellkultur GM-CSF (100 ng/ml) und IL4 (20 ng/ml) zugegeben. Bei einigen Experimenten wurden zusätzliche Substanzen (siehe Tabelle 2.5) jeweils 24 Stunden vor Ernte der Zellen zugegeben.

Tab. 2.5: Zur DC-Reifung bzw. Inhibition eingesetzte Substanzen

Stimulus	Funktion	Konzentration
Dimethylsulfoxid (DMSO)	als Kontrolle eingesetzt	2 µl/ml
Pam3Cys	TLR2L	5,00 µg/ml
LPS	TLR4L	1,00 µg/ml
Poly I:C	TLR3L	50,00 µg/ml
Resiquimod (R848)	TLR7L	2 µg/ml
STI 571 (Imatinib)	Inhibitor der DC-Funktion	1,77 µg/ml
IL-10	Inhibitor der DC-Funktion	0,01 µg/ml

2.2.4 Isolation verschiedener Leukozytensubpopulationen mittels magnetischer Zellsortierung (MACS)

Für die Isolation verschiedener Leukozytensubpopulationen (Monozyten, B-Lymphozyten, T-Lymphozyten, DC aus peripherem Blut) wurde die Methode der magnetische Zellsortierung der Firma Miltenyi Biotec verwendet. Die Durchführung erfolgte dabei nach den Protokollen des Herstellers. Die Arbeitsschritte erfolgten dabei auf Eis bzw. bei 4° Celsius. Das Prinzip der Methode besteht in der Inkubation der zu sortierenden Zellen in Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmoleküle, die an magnetische *beads* gekoppelt sind. Bei Passage durch ein äußeres Magnetfeld können die so markierten Zellen gezielt von den übrigen getrennt werden. Bei der positiven Zellsortierung werden mit Antikörpern gegen ein bestimmtes Oberflächenmolekül (z.B. CD14, CD3, CD19 etc.) markierte Zellen selektiert. Nach der Inkubation werden die Zellen über eine metallhaltige Säule (MACS Column LS) geleitet, die sich in einem äußeren Magnetfeld befindet. Nach mehreren Waschschritten mit MACS-Puffer verbleiben nur die markierten Zellen in der Säule und können nun ebenfalls mit Hilfe von MACS-Puffer nach Entfernung aus dem Magnetfeld eluiert werden. Eine andere Möglichkeit der magnetischen Zellsortierung stellt die Zelldepletion dar. Hierbei werden die nicht erwünschten Zellen mit einem Gemisch aus verschiedenen Antikörpern markiert und so aus der Zellsuspension entfernt. Eine Kombination aus beiden Methoden ist die Grundlage für die Isolierung von dendritischen Zellen des peripheren Blutes mit Hilfe der Kits der Firma Miltenyi Biotec.

2.2.5 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie dient der Analyse großer Zellzahlen. Hierbei werden die Zellen einzeln durch eine Kapillare gesaugt und passieren dabei einen Laserdetektor. Die dabei entstehende Streuung des Laserlichtes kann gemessen werden und erlaubt Rückschlüsse auf die Identität der Zellen. Die Streuung in Vorwärtsrichtung (*forward scatter*) erlaubt dabei Rückschlüsse auf die Größe der Zelle, während die Streuung in 90° Richtung (*side scatter*)

Aufschluss über die Granularität der Zellen gibt. Zusätzlich kann die Zelloberfläche mit Antikörpern gegen spezifische Oberflächenmoleküle beschickt werden, die mit verschiedenen Flurochromen (hier Fluoresceinisothiocyanat (FITC) und Phycoerythrin (PE)) markiert sind. Dadurch ist eine genauere Zuordnung der untersuchten Zellen zu den verschiedenen Zellpopulationen möglich. Für die Durchführung des Verfahrens wurden zwischen 5×10^4 und 1×10^5 Zellen pro Analyseröhrchen (Falcon® 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube) eingesetzt. Die Zellsuspension wurde bei 1500 rpm für 5 Minuten zentrifugiert, der Überstand dekantiert und die Zellen in der zurücklaufenden Flüssigkeit wiederaufgenommen. Es wurden nun jeweils 20 µl mouse-IgG Antikörper hinzugegeben und für 5 bis 10 Minuten inkubiert um die F_c-Rezeptoren zu blockieren, was eine unspezifische Bindung der Flurochrom-markierten Antikörper verhindert. Es wurden nun die FITC und PE markierten Antikörper in die für die Analyse vorgesehenen Röhrchen (Falcon® 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tube) vorgelegt und jeweils 100 µl der Zellsuspension hinzugegeben. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten im Dunkeln bei Raumtemperatur wurde jeweils 1 ml FACS-Puffer hinzugegeben und im Anschluss bei 1500 rpm für 5 min abzentrifugiert. Das erhaltenen Zellpellet wurde 100 µl FACS-Puffer und 100 µl Formaldehydlösung zur Fixierung aufgenommen und der Analyse mittels des Durchflusscytometers FACSCalibur zugeführt.

Die Analyse von Oberflächenmolekülen ist mittels Durchflusszytometrie auch durch eine Sekundärfärbung möglich. Der an die Oberfläche gebundene Primärantikörper wird dabei durch einen gegen ihn gerichteten Flurochrom-markierten Sekundärantikörper visualisiert. Es wurden dabei zwischen 1×10^5 und 2×10^5 Zellen pro Ansatz verwendet. Die Färbung erfolgte in Falcon® 5 ml Polystyrene Round-Bottom Tubes. Nach Zentrifugation bei 1500 rpm für 5 min wurde der Überstand dekantiert und die Zellen in der zurücklaufenden Flüssigkeit resuspendiert. Es erfolgte die Zugabe von 10 µl Primärantikörperlösung. Nach einer Inkubationszeit von 1 h bei 4 °C wurde die Lösung mit 1 ml FACS-Puffer versetzt und zentrifugiert. Dieser Waschschrift wurde nochmals wiederholt. Nach Wiederaufnahme in der zurücklaufenden

Flüssigkeit erfolgte die Zugabe von 15 µl Sekundärantikörperlösung und die Inkubation bei 4°C für 30 min. Nach erneutem Waschschrift wurde das Zellpellet in 100 µl FACS-Puffer und 100 µl Formaldehyd-Lösung aufgenommen und mittels Durchflusszytometrie am Durchflusszytometer FACScalibur analysiert.

2.2.6 Isolation von RNA

Die Isolation der Gesamt-RNA aus verschiedenen Leukozytenpopulationen erfolgte mit dem RNeasy Mini Kit der Firma Qiagen nach dem Protokoll des Herstellers. Die Methode beruht auf der Bindung von RNA-Strängen von 200 oder mehr Basenpaaren an eine Siliziumdioxid-Säulenmembran (Säulenchromatographie). Zuvor wurden die Zellen durch ein Gemisch aus RLT-Puffer und β-Mercaptoethanol lysiert. Alle Zellbestandteile mit Ausnahme der RNA wurden durch mehrere Waschschriffe entfernt und die verbleibende RNA schließlich mit Hilfe von RNase-freiem Wasser eluiert. Pro Säule können bis zu 100 µg RNA isoliert werden.

2.2.7 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration der gewonnenen RNA-Proben erfolgte photometrisch mit Hilfe des RNA/DNA Calculator Gene Quant II. Nach der Kalibrierung des Nullpunktes mit RNase-freiem Wasser, wurde die Lichtabsorption bei 260 nm und 280 nm gemessen. Aus dem Quotienten OD_{260}/OD_{280} kann auf die Reinheit der Probe geschlossen werden. Er sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Die Konzentration der RNA wurde aus OD_{260} automatisch vom Gerät berechnet.

2.2.8 Abbau von Verunreinigungen von RNA-Proben durch DNase

Um minimale Verunreinigungen der RNA-Proben mit DNA, die eventuell das Ergebnis der RT-PCT verfälschen könnten, zu beseitigen, wurde ein Abbau mit DNase durchgeführt. Dazu wurde das DNA-freeTM Kit der Firma Applied Biosystems nach dem Protokoll des Herstellers eingesetzt. Das Prinzip besteht im Abbau verbleibender DNA-Verunreinigungen durch rekombinante DNase I. Dieses Enzym kann im Anschluss durch eine DNase-Inaktivierungsreagenz

inaktiviert und gebunden werden. Nach Zentrifugation findet sich das Enzym am Boden des Eppendorf-Cups in Form eines Pellets und kann dann wieder von der eigentlichen RNA-Probe getrennt werden.

2.2.9 Reverse Transkriptase–Polymerasekettenreaktion (RT-PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion dient der gezielten exponentiellen Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen. Hierzu werden zwei Primer benötigt, kurze Oligonukleotide die zu einer Sequenz am 3' Ende jeweils eines der beiden Stränge des zu amplifizierenden Abschnittes komplementär sind. Sie lagern sich hier an und dienen als Angriffspunkt der thermostabilen DNA-Polymerase. Durch einen sich ständig wiederholenden Zyklus aus unterschiedlichen Temperaturstufen kommt es zur Denaturierung des DNA-Doppelstranges, Primeranlagerung und Polymerisation eines neuen komplementären Stranges aus im Überschuss vorliegenden Nukleotidtriphosphaten. Der Reversen Transkriptase-PCR (RT-PCR) liegt dasselbe Prinzip zu Grunde, jedoch muss die zu analysierende RNA zunächst mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Als Primer werden in dieser Reaktion Oligo-dt-Nukleotide eingesetzt, die sich komplementär dem Poly-a-Schwanz der RNA anlagern können. Der gewünschte Abschnitt der cDNA kann schließlich mit Hilfe von PCR amplifiziert werden.

Der Ansatz der cDNA-Synthese erfolgte in 0.2 ml Microtubes (PCR Softstrips). Um die Vergleichbarkeit der Ergebnisse zu gewährleisten, wurde bei der cDNA-Synthese jeweils die gleiche Menge RNA für alle untersuchten Proben eingesetzt. Das verwendete Volumen wurde mit Diethylpyrocarbonat (DEPC)-Wasser auf 10,75 µl aufgefüllt. Jeder Probe wurden im Anschluss 1 µl Oligo-dt-Primer und 1 µl dNTP-Mix (10 mM) hinzugefügt. Der so gewonnene Ansatz wurde im Thermocycler Gene Amp PCR System 9600 5 min auf 65 °C erhitzt und im Anschluss kurz auf Eis gekühlt. Jedem Reaktionsgefäß wurden nun 7,25 µl cDNA-Mastermix (Tabelle 2.6) zugesetzt. Es folgte die Synthese im Thermocycler Gene Amp PCR System 9600: Erhitzung auf 42 °C für 50 min, Erhitzung auf 70 °C für 15 min, schließlich Abkühlung auf 12 °C. Die so gewonnen cDNA wurde direkt weiterverwendet oder bei -20° Celsius gelagert.

Tabelle 2.6: Zusammensetzung des cDNA-Mastermixes

Volumen pro Ansatz	Reagenz
4 µl	5x RT-Puffer + 25 mM MgCl
2 µl	0,1 M Dithiothreitol (DTT)
1 µl	RNAse-Out (40 IU/ml)
0,25 µl	Superscript-RT (50 IU/µl)

Aus den so gewonnenen cDNA-Proben konnte im Anschluss eine gezielte Amplifikation mittels PCR erfolgen. Zunächst wurde eine Kontroll-PCR mit Primern für die DNA-Sequenz des β_2 -Mikroglobulins durchgeführt. Dieses kommt in allen Zellen in etwa gleichen Konzentrationen vor, sodass es einen direkten Vergleich der eingesetzten cDNA-Mengen erlaubt. Im Anschluss erfolgte der eigentliche Analyseschritt durch PCR mit Primern für die DNA-Sequenz des Osteoactivin (DC-HIL).

Alle beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Zuerst wurden die für die PCR benötigten Reagenzien jeweils in einem PCR-Mastermix (Tabelle 2.7) zusammengestellt und davon jeweils 49 µl in jedes der verwendeten PCR-Reaktionsgefäße 0.2 ml Microtubes (PCR Softstrips) vorgelegt. Im Anschluss wurde jeweils 1 µl der entsprechenden cDNA-Probe zugesetzt und die Reaktion im Thermocycler Gene Amp PCR System 9600 gemäß dem entsprechenden PCR-Programm (Tabelle 2.8) gestartet.

Tab. 2.7: Zusammensetzung des PCR-Mastermixes

Volumen pro Ansatz für β_2 -Mikroglobulin-PCR	Volumen pro Ansatz für Osteoactivin(DC-HIL) - PCR	Reagenz
37,7 µl	32,7 µl	DEPC-Wasser
5,0 µl	5,0 µl	10X Reaction Buffer + 25mM MgCl
1,0 µl	1,0 µl	dNTP-Mix (10mM)
2,5 µl	5,0 µl	Forward Primer (10 µM)
2,5 µl	5,0 µl	Reverse Primer (10 µM)
0,3 µl	0,3 µl	Taq DNA-Polymerase (5 IU/µl)

Tab. 2.8: PCR-Programme

PCR-Programm für β_2 -Mikroglobulin- (25 Zyklen)		PCR-Programm für Osteoactivin (DC-HIL) (35 Zyklen)		Schritt
Temperatur	Dauer	Temperatur	Dauer	
94 °C	5 min	94 °C	5 min	Initiale Denaturierung Zyklus
94 °C	15 s	94 °C	30 s	
55 °C	30 s	60 °C	30 s	
72 °C	30 s	72 °C	30 s	
72 °C	5 min	72 °C	5 min	Terminale Elongation
15 °C	∞	15 °C	∞	Abkühlung

2.2.10 Agarosegelelektrophorese

Das Prinzip der Agarosegelelektrophorese beruht auf der Ausbildung von gitterartigen Strukturen der Agarosemoleküle. DNA-Fragmente werden während der Wanderung durch das Gel entsprechend ihrer molekularen Größe unterschiedlich stark zurückgehalten. Dabei ist die Wanderungstrecke der Molekülgröße umgekehrt proportional. Durch Vergleich von Banden eines Markers mit bekannter Molekülgröße lässt sich diese bestimmen. Die verwendeten Agarosegele enthalten darüber hinaus Ethidiumbromid, welches in doppelsträngige DNA interkaliert. Bei Bestrahlung mit UV-Licht wird das Ethidiumbromid nun zur Fluoreszenz angeregt und die verschiedenen Banden werden sichtbar, was ihre Dokumentation erlaubt.

Als Agarosegel wurde hier das vorgefertigte Gel Reliant ®Gele System, 4% NuSieve ® 3:1 Plus Agarose verwendet. Dieses wurde in die Gelelektrophoresekammer eingesetzt und selbige mit TAE-Puffer befüllt. Die Beladung erfolgte mit 6x Ladepuffer, als Größenmarker diente GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder. Die Gelelektrophorese erfolgte bei 90 V für 45 Minuten. Für die

Analyse und Dokumentation wurde der UV-Reader Biometra Bio Doc Analyse eingesetzt.

2.2.11 Quantitative RT-PCR nach dem Lightcycler®-Prinzip

Die konventionelle RT-PCR erlaubt lediglich eine qualitative Analyse der Expression auf mRNA-Ebene. Quantitative Messungen können unter Nutzung von Verfahren der *Realtime PCR* durchgeführt werden. Im Folgenden wurde zu diesem Zweck das Lightcycler®-Verfahren der Firma Roche Applied Science eingesetzt. Das Lightcycler®-Gerät besteht aus einem Thermocycler und einem Fluorimeter, das unter Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen die Echtzeitanalyse der Polymerasekettenreaktion erlaubt. Die zu untersuchenden Reaktionen laufen dabei in speziellen Glaskapillaren ab, die in ein Probenkarussell eingesetzt werden, welches sie zur Anrege- bzw. Deketionsvorrichtung transportiert. Ein spezielles Temperaturregulationssystem, das Heiß- bzw. Kaltluft verwendet, und das günstige Volumen-Oberflächen-Verhältnis der Kapillaren erlauben dabei einen schnellen Temperaturübergang mit bis zu 20 °C pro Sekunde und dadurch eine Durchführung der Zyklen in einem Bruchteil der Zeit einer konventionellen PCR.

Die Quantifizierung der Reaktion erfolgt durch Nutzung von Lightcycler®Sonden. Diese nutzen das Prinzip des Förster Resonanz-Energie-Transfers (FRET). Dieses Prinzip besagt, dass Energie von einem angeregten Flurochrom (dem *Reporter-Flurochrom*) strahlungsfrei durch Dipol-Dipol-Wechselwirkung auf ein anderes Flurochrom (das *Quencher-Flurochrom*) übertragen werden kann, sofern sich das Emissionsspektrum des Reporters und das Absorptionsspektrum des Quenchers überlappen, beide parallele elektronische Schwingungsebenen besitzen und sie sich in einem Abstand im Nanometerbereich befinden. Der Effekt kann durch Verminderung der Reporter-Fluoreszenz oder Steigerung der Quencher-Fluoreszenz gemessen werden.

Hier wurden Sonden aus der Universal Probe Library eingesetzt, wobei es sich um Hydrolyse-Sonden handelt. Die kurzen Oligonukleotide, deren 3' Ende auf Grund von Phosphorylierung nicht verlängert werden kann, binden an eine

Sequenz im Bereich des zu untersuchenden Amplicons. Sie tragen am 5' Ende ein Molekül Fluorescein (FAM) und am 3' Ende einen sogenannten „dark quencher“. Dieser kehrt nicht durch Emission von Licht in den Grundzustand zurück, sondern gibt stattdessen eine geringe Menge Hitze ab. Im intakten Zustand der Sonde wird die Fluoreszenz des FAM nach Anregung durch das „quenching“ fast vollständig unterdrückt. Nach Bindung an die komplementäre Sequenz wird die Sonde jedoch im Rahmen der Elongation durch die 5'-3' Exonuklease-Aktivität der Taq-Polymerase abgebaut. Das freigesetzte Fluorochrom kann nun nach Anregung bei 488 nm Licht von 518 nm Wellenlänge aussenden, und diese kann zur Quantifizierung der PCR genutzt werden.

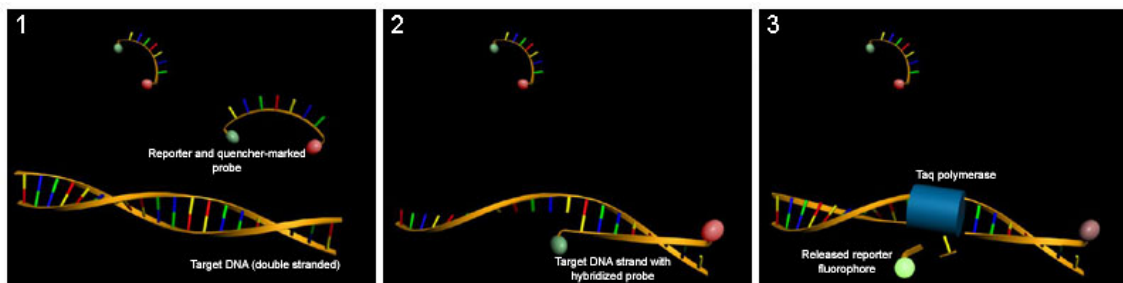


Abb. 2.1: Funktionsweise der Hydrolysesonden bei Realtime PCR. 1) Intakte Hydrolysesonde; Reporterfluoreszenz wird durch FRET „gequencht“. (2) Hybridisierung von Sonde und komplementärer DNA-Sequenz. (3) Abbau der Sonde während der Elongation. Das Reporterfluorochrom wird freigesetzt. Autor S.Jähnichen, GNU Free Documentation license, Version 1.2

Wird die gemessene Fluoreszenz gegen die Zykluszahl aufgetragen, so ergibt sich eine sigmoide Kurve. Der Punkt, an dem die gemessene Fluoreszenz erstmals die Hintergrundstrahlung übersteigt, wird als Crossing Point (C_p) bezeichnet. Die hier abgelesene Zykluszahl korreliert invers mit dem Logarithmus der eingesetzten Menge an DNA und kann daher durch Aufnahme einer geeigneten Standardgeraden zur Quantifizierung genutzt werden. Um die Vergleichbarkeit zwischen den Proben zu gewährleisten, wurde die errechnete Konzentration relativ zur Konzentration des konstant exprimierten „housekeeping genes“ Porphobilinogen Deaminase (PBGD), die einen Schritt in der Häm-synthese katalysiert, dargestellt.

Der Reaktionsansatz wurde unter Nutzung des Lightcycler® Taqman® Mastermix, der jeweiligen Primer für Realtime-PCR und der zugehörigen

Universal Probe Library Sonden wie In Tab. 2.10 dargestellt angesetzt und unter Zusatz von 5 µl der zu untersuchenden Probe in Lightcycler® Kapillaren gegeben. Die Messung erfolgte im Lightcycler® Gerät mit den in Tab. 2.11 genannten Einstellungen.

Tab. 2.9: Ansatz für Realtime-PCR

Volumen pro Ansatz für GPNMB (Osteoactivin)-PCR (Sonde #1)	Volumen pro Ansatz für PBGD-PCR (Sonde #18)	Reagenz
7,8 µl	8,3 µl	DEPC-Wasser
1,5 µl	5,0 µl	Forward Primer (20 µM)
1,5 µl	5,0 µl	Reverse Primer (20 µM)
0,2 µl	0,2 µl	Universal Probe Library Sonde
4,0 µl	4,0 µl	Lightcycler®Taqman® Mastermix

Tab. 2.10: Lightcycler®-Einstellungen

PCR-Programm für Lightcycler (45 Zyklen)		Schritt
Temperatur	Dauer	
95 °C	10 min	Pre-Inkubation
95 °C	10 s	Zyklus (Messung jeweils am Ende)
55 °C	30 s	
72 °C	1 s	
40 °	30 s	Abkühlung

2.2.12 Zellyse

Zur Gewinnung von Proteinlysaten aus den verschiedenen untersuchten Zellen wurde der RIPA-Lysepuffer eingesetzt. Kurz vor Lysebeginn wurden 2 µl/ml des

Proteaseinhibitors Aprotinin, 10 µl/ml des Proteaseinhibitors PMSF und 10 µl/ml des Proteaseinhibitors Na-Ortho-Vanadat zugesetzt. Die Suspension der zu lysierenden Zellen wurde nun bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet in 1 ml Lysepuffer pro 5×10^7 Zellen gelöst und in ein 500-PP-Reaktionsgefäße Cellstar® 1,5ml überführt. Durch 10 malige Resuspension wurde eine möglichst vollständige Lyse erreicht. Nach 10 minütiger Inkubation auf Eis wurde nochmals 10-malig resuspendiert und im Anschluss in der Zentrifuge Eppendorf 5417 R bei maximaler Geschwindigkeit für 30 Minuten bei 4° Celsius zentrifugiert. Zuletzt wurde der Überstand abgenommen und in 500-PP-Reaktionsgefäßen Cellstar® 1,5 ml bei -80° Celsius kryokonserviert. Zusätzlich wurde jeweils ein Aliquot von 5 µl Lysat entnommen und mit 20 µl RIPA-Puffer 1:5 verdünnt und ebenfalls bei -80° Celsius eingefroren.

2.2.13 Proteinkonzentrationsbestimmung

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration der verwendeten Zellysate wurde das *bicinchoninic acid assay* (BCA) Protein Assay Reagent Kit eingesetzt. 10 µl der 1:5 verdünnten Proben wurden dabei in einer 96-Loch-Gewebekulturplatte vorgelegt. Zur Erhöhung der Messgenauigkeit wurde die Konzentration jeder Probe doppelt bestimmt. Als Vergleichswerte wurden BSA-Standards mit den Konzentrationen 2 mg/ml, 1,5 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,38 mg/ml, 0,18 mg/ml und 0,09 mg/ml vorgelegt, ebenfalls jeweils zweimalig. Zusätzlich wurde RIPA-Lysepuffer aufgetragen. Da die BSA-Standards in NP-40 Lysepuffer vorlagen, wurde auch dieser auf die 96-Loch-Platte pipettiert, um später den RIPA-NP-40 Unterschied rechnerisch ausgleichen zu können. Im Anschluss wurde nun in jedes Well 200 µl des BCA-Reaktionsgemisches (Reagenz A und Reagenz B im Verhältnis 50:1) hinzugegeben. Nach einer Inkubation von 30 Minuten bei 37° Celsius wurden die Konzentrationen mit dem *Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay* (ELISA)-Reader Multi-Detektions-Reader SLT Rainbow ausgelesen.

2.2.14 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen anhand ihres Molekulargewichtes mit Hilfe eines Acrylamidgels. Durch das eingesetzte Natriumdodecylsulfat (SDS) wird den aufzutrennenden Proteinen eine negative Ladung verliehen, wobei der Quotient aus Molekulargewicht und Ladung konstant ist. Der Zusatz von Dithiothreitol (DTT) dient der Reduktion von Disulfidbrücken. Auch werden die zu untersuchenden Proben vor dem Auftragen für 4 Minuten auf 100 ° C erhitzt, um die Sekundär- und Tertiärstruktur zu zerstören. Dies erlaubt eine Auftrennung der Proteine streng nach ihrem Molekulargewicht.

Die Auftrennung der Proteine folgte dem Prinzip einer diskontinuierlichen Elektrophorese. Dies bedeutet, dass das Polyacrylamidgel aus einem Sammelgel und einem Trenngel besteht (Zusammensetzung siehe Tabellen 2.11 und 2.12). Das Sammelgel bewirkt eine Verdichtung der zu trennenden Proteine und verbessert dadurch die Trennleistung im Trenngel.

Die Herstellung eines solchen Elektrophoresegels erfolgt in 2 Schritten. Zunächst wurden die Bestandteile des Trenngeles gemischt und in die Gelkammer gefüllt. Die Oberkante wurde dabei mit Isopropanol abgedeckt, um eine glatte Polymerisationskante zu erreichen. Nach 30minütiger Polymerisation wurden die Bestandteile des Sammelgeles gemischt, in die Gelkammer gefüllt und der Kamm für die späteren Ladetaschen eingesetzt. Es folgte ein weitere 30-minütige Polymerisationsphase. Das Gel wurde in die Elektrophoresekammer eingesetzt und diese mit Laufpuffer für SDS-PAGE befüllt. Das Volumen der zu untersuchenden Proben, das einer Proteinmenge von 15 µg entsprach, wurde mit Hilfe von RIPA-Puffer auf 14 µl aufgefüllt. 7 µl einer Mischung aus 3XProbenpuffer und 30% 1M Dithiothreitol (DTT) wurde jeweils zugesetzt. Als Größenmarker wurden 7 µl des *Bench Mark™ Prestained Protein Ladder* Markers eingesetzt. Für die Elektrophorese wurde eine konstante elektrische Spannung von 120 V angelegt.

Tab. 2.11: Zusammensetzung
Trenngel 10% (SDS-PAGE)

Reagenz	Volumen (für 2 Gele)
ddH ₂ O	4,2 ml
1 M Tris pH 8,8	5,6 ml
30% Acrylamid	5 ml
10% SDS	150 µl
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	10 µl
10% Ammonium persulfat (APS)	100 µl

Tab. 2.12: Zusammensetzung
Sammelgel (SDS-PAGE)

Reagenz	Volumen (für 2 Gele)
ddH ₂ O	6 ml
2 M TRIS pH 6,7	2 ml
30% Acrylamid	6 ml
10% SDS	100 µl
TEMED	10 µl
10% APS	100 µl

2.2.15 Western Blot

Mit Hilfe des Western Blots können in der SDS-PAGE aufgetrennte Proteinbanden auf eine Nitrozellulosemembran übertragen und mit Hilfe spezifischer Antikörper identifiziert werden.

Hierzu wurde die Nitrozellulosemembran luftblasenfrei auf das Polyacrylamidgel aufgelegt und zwischen zwei Whatman-Papieren und zwei Schwämmen in die Blottingkammer eingespannt (siehe Abbildung 2.1). Die im Gel enthaltenen Proteine wandern auf Grund ihrer negativen Ladung in Richtung Anode, wo sie auf die Nitrozellulosemembran treffen.



Abb. 2.2: Aufbau des Blottingsystems

Nach Einsatz eines Kühlelements wurde die Blottingkammer mit 4 °C kaltem Transferpuffer für SDS-PAGE befüllt. Der Transfer erfolgte im Kühlraum bei 4 °C über 1 Stunde bei einer konstanten Stromstärke von 250 mA unter ständiger Agitation durch ein Rührelement.

Um die unspezifische Bindung von Antikörpern an die Nitrozellulosemembran zu verhindern, wurde diese nun für 1 Stunde bei Raumtemperatur in 4% Slimfastlösung (in 0,5% TBST) geblockt. Nun wurde die Membran über Nacht bei 4 °C im Kühlraum mit dem jeweiligen Primärantikörper inkubiert. Zur Kontrolle der gleichmäßigen Beladung wurde dabei ein aus der Maus gewonnener polyklonaler Antikörper gegen das Enzym Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase (GAPDH) eingesetzt (1:5000 in 2,5% Slimfastlösung in 0,5% TBST). Es katalysiert einen Teilschritt der Glykolyse und kommt in allen Zellen in etwa gleicher Konzentration vor, sodass es sich zum direkten Vergleich der eingesetzten Proteinmengen eignet. Zum Nachweis des

Osteoactivins (DC-HIL) erfolgte die Inkubation mit aus der Ziege gewonnenem polyklonalen Antikörper gegen Osteoactivin (1:2000 in 2,5% Slimfastlösung in 0,5% TBST). Nach dreimaliger Wäsche mit 0,5% TBST über jeweils 5 Minuten erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Sekundärantikörper über 1 Stunde bzw. 45 Minuten (für anti-goat Sekundärantikörper) bei Raumtemperatur. Bei den Sekundärantikörpern handelte es sich um *horseradish peroxidase* (HRP)-markierte anti-mouse Antikörper (1:2000 in 2,5% Slimfastlösung in 0,5% TBST) und HRP-markierte anti-goat Antikörper (1:2000 in 2,5% Slimfastlösung in 0,5% TBST). Nach erneuten Waschschritten (3x5 Minuten in 0,5% TBST und 2x5 Minuten in TBS) erfolgte die Detektion der Banden mittels *Enhanced chemiluminescence* (ECL).

Da die Sekundärantikörper mit HRP markiert sind, ist eine Detektion mit dem ECL™ Plus System möglich. Dazu wurde die Membran für eine Minute im ECL™-Reaktionsgemisch (Reagenz 1 und Reagenz 2 im Verhältnis 1:1) inkubiert. HRP oxidiert dabei das Lumigen PS-3 Acriden und regt es dadurch zur Lumineszenz an. Diese konnte durch Belichtung eines Autoradiographiefilmes in einer Röntgenkassette und anschließender Entwicklung des Films sichtbar gemacht werden. Die Nitrozellulosemembran kann im Anschluss in Frischhaltefolie verpackt bei 4° Celsius gelagert werden.

2.2.16 Stripping von Nitrozellulosemembranen

Um die sequentielle Detektion verschiedener Typen von Proteinbanden auf derselben Nitrozellulosemembran zu gewährleisten, müssen die eingesetzten Antikörper zunächst entfernt werden. Dies wird als *Stripping* bezeichnet. Die Nitrozellulosemembran wurde dazu in 70 °C heißem Stripping-Puffer (Zusammensetzung siehe Tabelle 2.13) für 3x10 Minuten inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran 5x10 Minuten in 0,5% TBST gewaschen. Es folgte erneutes Blocken in 4% Slimfastlösung in 0,5% TBST für eine Stunde und erneute Inkubation mit den jeweiligen Primär- und Sekundärantikörpern, wie unter 2.2.13 beschrieben.

Tab. 2.13: Zusammensetzung des Stripping-Puffers (SDS-PAGE)

Reagenz	Volumen
ddH ₂ O	152 ml
10% SDS	40 ml
2 M Tris/HCl ph 6,7	6,2 ml
β-Mercaptoethanol	1,4 ml

3. Ergebnisse

3.1 Nachweis der differentiellen Expression des Genes Osteoactivin (DC-Hil) in dendritischen Zellen und Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression auf Transkriptionsebene

Zum Nachweis der differentiellen Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in dendritischen Zellen wurden zunächst CD14+ positive Monozyten mittels MACS aus *buffy coats* gewonnen. Ein Teil dieser Monozyten wurde über 7 Tage in RPMI unter Zusatz von Interleukin 4 und GM-CSF an den Tagen 0, 2, 4 und 6 nach Beginn der Zellkultur kultiviert. Zu einem Teil der kultivierten Zellen wurde 24 Stunden vor Ernte LPS hinzugegeben. Die gewonnenen Zellen wurden mit Hilfe von Durchflusscytometrie auf ihren Phänotyp hin untersucht. Aus allen beschriebenen Zelltypen wurde RNA gewonnen und die Proben einem DNase-Verdau unterworfen. Aus diesen Proben wurde schließlich RT-PCR durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für die aus vier verschiedenen Spendern gewonnenen Befunde.

Zur Untersuchung des Einflusses verschiedener Stimuli auf die Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in dendritischen Zellen wurden wiederum solche aus Monozyten des peripheren Blutes, die mittels MACS aus *buffy coats* isoliert wurden, gewonnen. Die eingesetzten Monozyten wurde über 7 Tage in RPMI unter Zusatz von Interleukin 4 und GM-CSF an den Tagen 0, 2, 4 und 6 nach Beginn der Zellkultur kultiviert. 24 Stunden vor der Ernte wurden jeweils die Substanzen DMSO, Pam3Cys, LPS, PolyI;C oder R848 zugesetzt. Alternativ wurden die Substanzen STI 571 (Imatinib) oder IL10 jeweils an den Tagen 0, 2, 4 und 6 hinzugegeben (siehe auch Tabelle 2.5). Die gewonnenen Zellen wurden mit Hilfe von Durchflusscytometrie auf ihren Phänotyp hin untersucht. Aus allen beschriebenen Zelltypen wurde RNA gewonnen und die Proben einem DNase-Verdau unterworfen. Aus diesen Proben wurde schließlich RT-PCR durchgeführt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für die aus vier verschiedenen Spendern gewonnenen Befunde.

3.1.1 Phänotyp der verwendeten Zellen

Die in den Tabellen 3.1 und 3.2 dargestellten Antikörperpaneele wurden zur Charakterisierung der CD14+ Monozyten und der aus Monozyten gewonnenen dendritischen Zellen eingesetzt.

Tab. 3.1: Phänotypisierung von durch MACS gewonnenen CD14+ Monozyten

Ansatz	FITC-konjugierter Antikörper	Spezifität	PE-konjugierter Antikörper	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle
2	CD 14	Monozyten	HLA-DR	MHC Klasse II
3	CD 19	B-Zellen	CD 3	T-Zellen

Tab. 3.2: Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen DC

Ansatz	FITC-konjugierter Antikörper	Spezifität	PE-konjugierter Antikörper	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle
2	CD 1a	Unreife DC Thymozyten	CD 83	Reife DC
3	CD 14	Monozyten	HLA-DR	MHC Klasse II
4	CD 86	Costimulatorisches Molekül	CD 80	Costimulatorisches Molekül

In Abbildung 3.1 wird der Phänotyp der verwendeten mittels MACS isolierten CD14+ Monozyten dargestellt. Wie ersichtlich ist, sind die Mehrheit der verwendeten Zellen CD14/HLA DR (spezifisch für Monozyten/MHC II) positiv, jedoch CD3/CD19 (spezifisch für T-Lymphozyten/B-Lymphozyten) negativ. Es zeigt sich somit eine Reinheit der eingesetzten Monozyten von >90% mit nur minimaler Verunreinigung durch Lymphozyten.

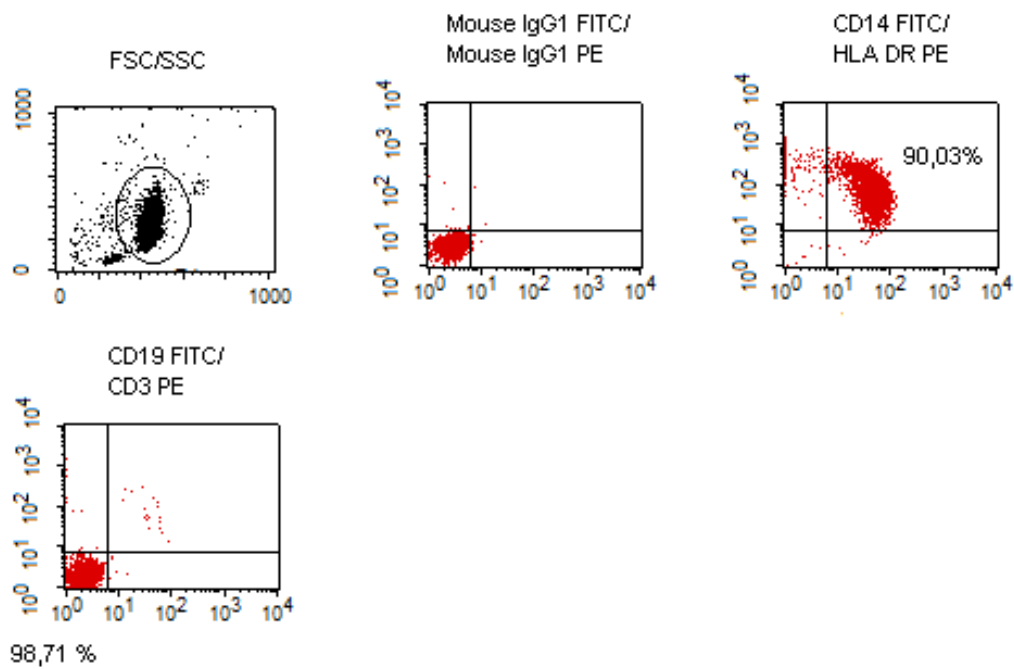


Abb. 3.1: Phänotypisierung von durch MACS gewonnenen CD14+ Monozyten. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. In der obersten Reihe in der Mitte ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Plotüberschriften geben jeweils die X/Y-Achse wieder.

In Abbildung 3.2 ist der Phänotyp der aus den Monozyten generierten unreifen dendritischen Zellen ersichtlich. In der Phänotypanalyse zeigt sich, dass 51,17% der untersuchten Zellen Träger von CD1a, einem für unreife DCs spezifisches Oberflächenmolekül, sind. Praktisch alle Zellen sind CD14 negativ und HLA-DR positiv. Des Weiteren ist ein großer Teil der untersuchten Zellen positiv für CD86, nicht jedoch für CD80. In der Gesamtschau ergibt sich ein typischer Phänotyp von unreifen dendritischen Zellen.

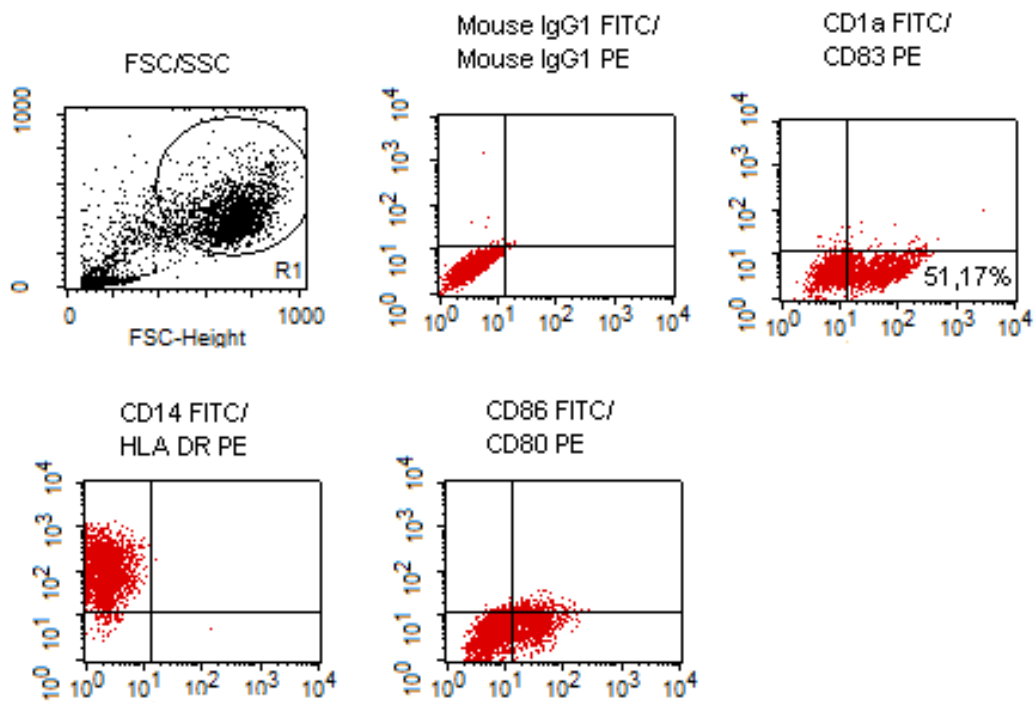


Abb. 3.2: Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen unreifen dendritischen Zellen. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. In der obersten Reihe in der Mitte ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Plotüberschriften geben jeweils die X/Y-Achse wieder.

In Abbildung 3.3 wird der Phänotyp der aus Monozyten gewonnen reifen, LPS behandelten dendritischen Zellen gezeigt. Ein Großteil der Zellen ist CD83+ (44,75%) bzw. CD1a/CD83+ (37,13%). Die untersuchten Zellen sind fast ausnahmslos CD14 negativ und HLA-DR positiv. Auch zeigt sich ein CD86/CD80+ Phänotyp. Insgesamt zeigt sich der typische Phänotyp reifer dendritischer Zellen.

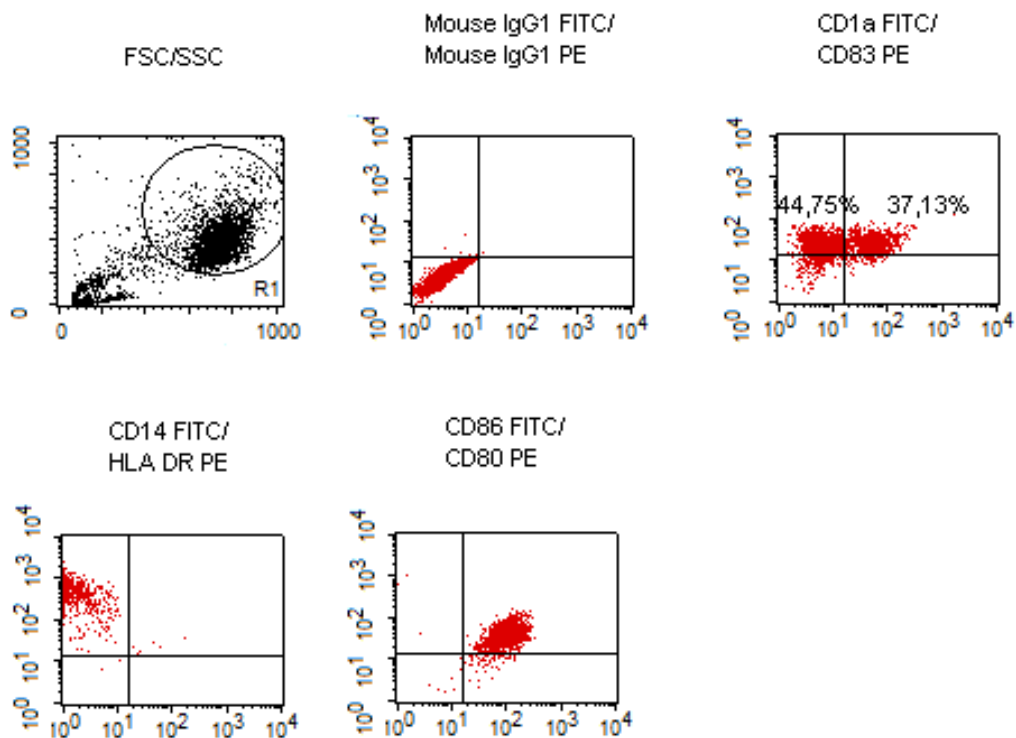


Abb. 3.3: Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen, mit LPS behandelten reifen dendritischen Zellen. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. In der obersten Reihe in der Mitte ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Plotüberschriften geben jeweils die X/Y-Achse wieder.

In Abbildung 3.4 ist der Phänotyp der aus den Monozyten generierten unreifen dendritischen Zellen, die zur Kontrolle der mit durch TLR-Liganden erreichten Ergebnisse mit DMSO behandelt wurden, ersichtlich. In der Phänotypanalyse zeigt sich, dass 74,51% der untersuchten Zellen Träger von CD1a sind. Praktisch alle Zellen sind CD14 negativ und HLA-DR positiv. Des Weiteren sind die untersuchten Zellen fast ausnahmslos sowohl für CD80 als auch 86 negativ oder nur für CD86 positiv. Insgesamt ergibt sich der Phänotyp von unreifen dendritischen Zellen.

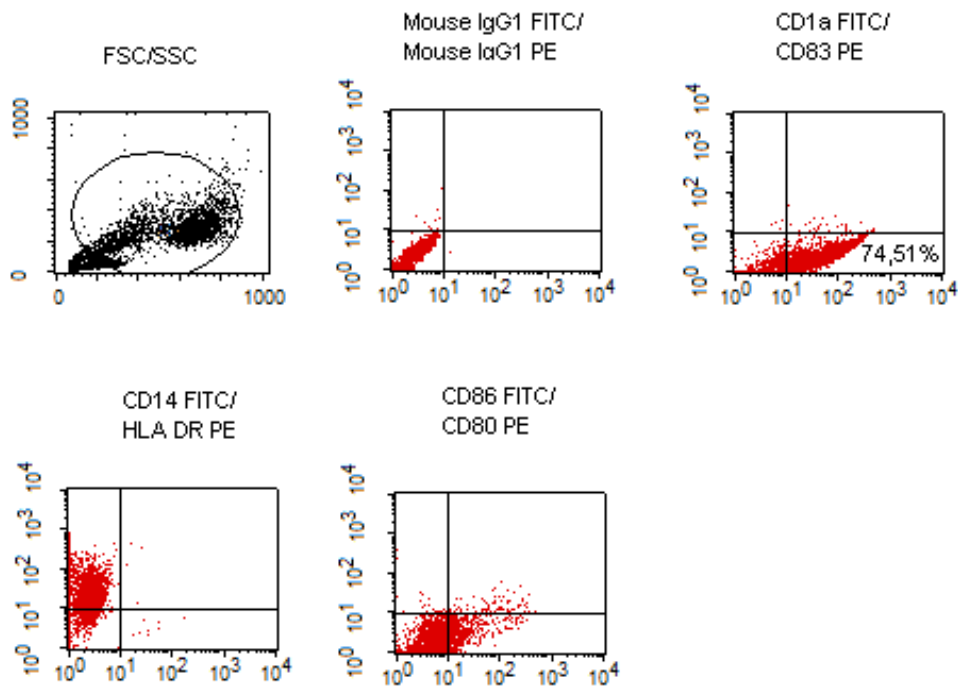


Abb. 3.4: Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen unreifen, mit DMSO behandelten dendritischen Zellen. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. In der obersten Reihe in der Mitte ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Plotüberschriften geben jeweils die X/Y-Achse wieder.

In Abbildung 3.5 wird der Phänotyp der aus Monozyten gewonnenen reifen, mit Pam3Cys behandelten dendritischen Zellen gezeigt. Ein erheblicher Teil der Zellen ist CD83+ (26,02%) bzw. CD1a/CD83+ (8,65%). Die untersuchten Zellen sind fast ausnahmslos CD14 negativ und HLA-DR positiv. Auch zeigt sich ein CD86/CD80+ Phänotyp. Insgesamt zeigt sich der Phänotyp reifer dendritischer Zellen, wenn auch schwächer ausgeprägt als nach Behandlung mit LPS.

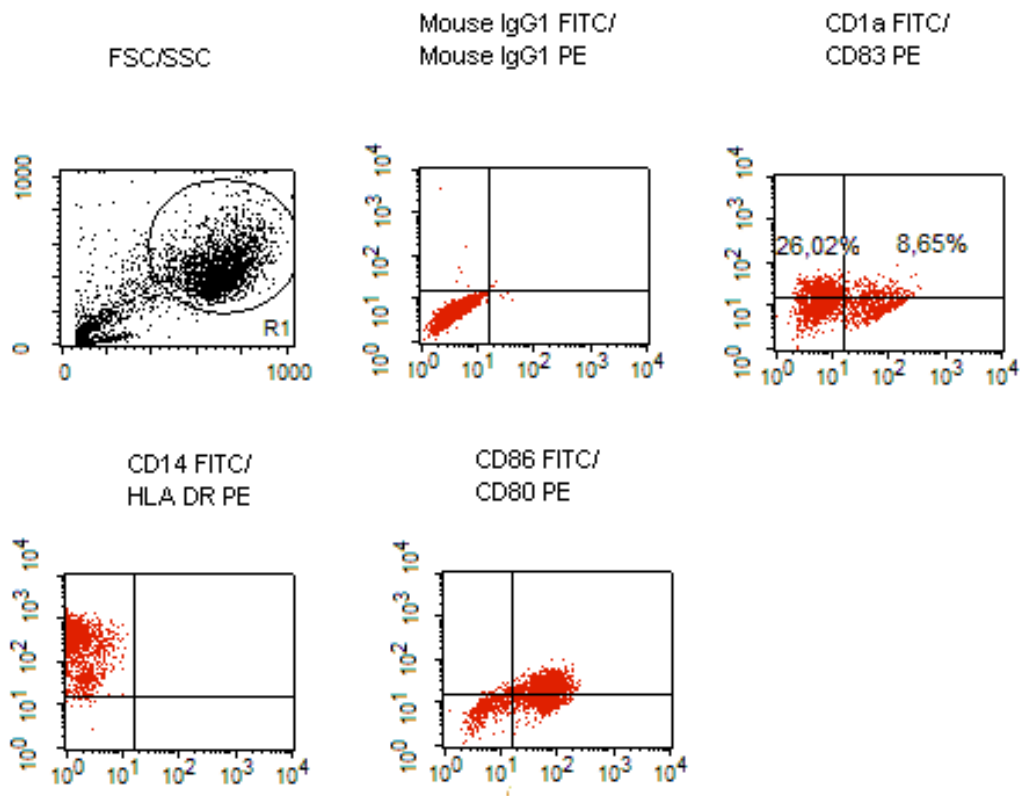


Abb. 3.5: Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen mit Pam3Cys behandelten, reifen dendritischen Zellen. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. In der obersten Reihe in der Mitte ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Plotüberschriften geben jeweils die X/Y-Achse wieder.

In Abbildung 3.6 wird der Phänotyp der aus Monozyten gewonnenen reifen, mit PolyI:C behandelten dendritischen Zellen gezeigt. Ein großer Teil der untersuchten Zellen ist CD83+ (35,26%) bzw. CD1a/CD83+ (57,02%). Die untersuchten Zellen sind fast ausnahmslos CD14 negativ und HLA-DR positiv. Auch zeigt sich ein CD86/CD80+ Phänotyp. Insgesamt ergibt sich in ausgeprägtem Maße der Phänotyp reifer dendritischer Zellen.

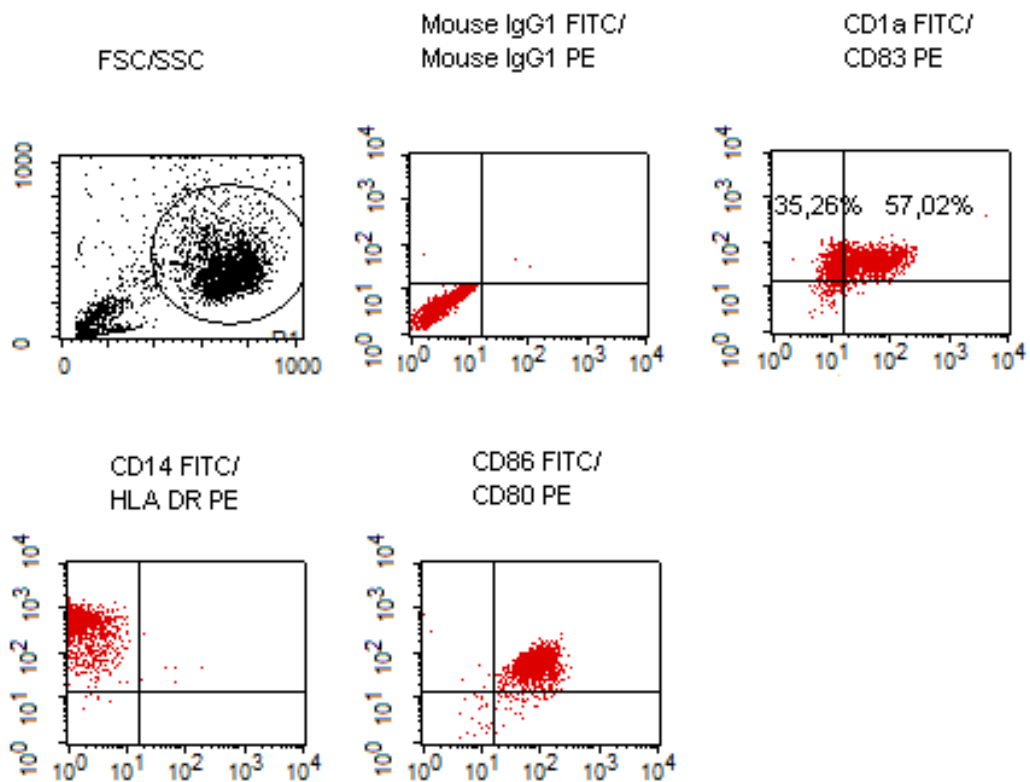


Abb. 3.6: Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen mit PolyI:C behandelten, reifen dendritischen Zellen. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. In der obersten Reihe in der Mitte ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Plotüberschriften geben jeweils die X/Y-Achse wieder.

In Abbildung 3.7 wird der Phänotyp der aus Monozyten gewonnenen reifen, mit R848 behandelten dendritischen Zellen gezeigt. Ein wesentlicher Teil der untersuchten Zellen ist CD83+ (35,67%) bzw. CD1a/CD83+ (19,59%). Die untersuchten Zellen sind fast ausnahmslos CD14 negativ und HLA-DR positiv. Auch zeigt sich ein CD86/CD80+ Phänotyp. Insgesamt ergibt sich der Phänotyp reifer dendritischer Zellen, wenn auch in weniger starkem Maßen als nach Behandlung mit LPS oder PolyI:C

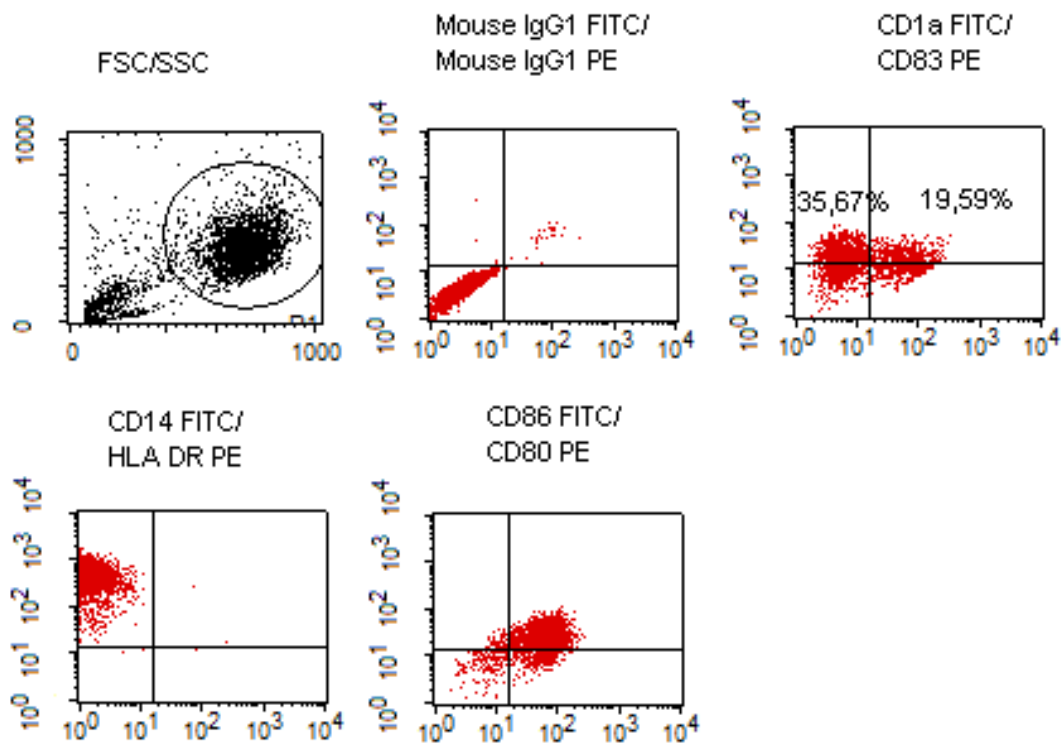


Abb. 3.7: Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen mit R848 behandelten, reifen dendritischen Zellen. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. In der obersten Reihe in der Mitte ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Plotüberschriften geben jeweils die X/Y-Achse wieder.

In Abbildung 3.8 wird der Phänotyp der aus den Monozyten generierten unreifen, mit STI571 (Imatinib) behandelten dendritischen Zellen ersichtlich. In der Phänotypanalyse zeigt sich, dass 20,62% der untersuchten Zellen Träger von CD1a sind. Praktisch alle Zellen sind für CD14 negativ und für HLA-DR positiv. Des Weiteren ist ein großer Teil der untersuchten Zellen positiv für CD86, nicht jedoch für CD80. In der Gesamtschau ergibt sich im Vergleich zu den unbehandelten dendritischen Zellen ein abgeschwächter unreifer Phänotyp

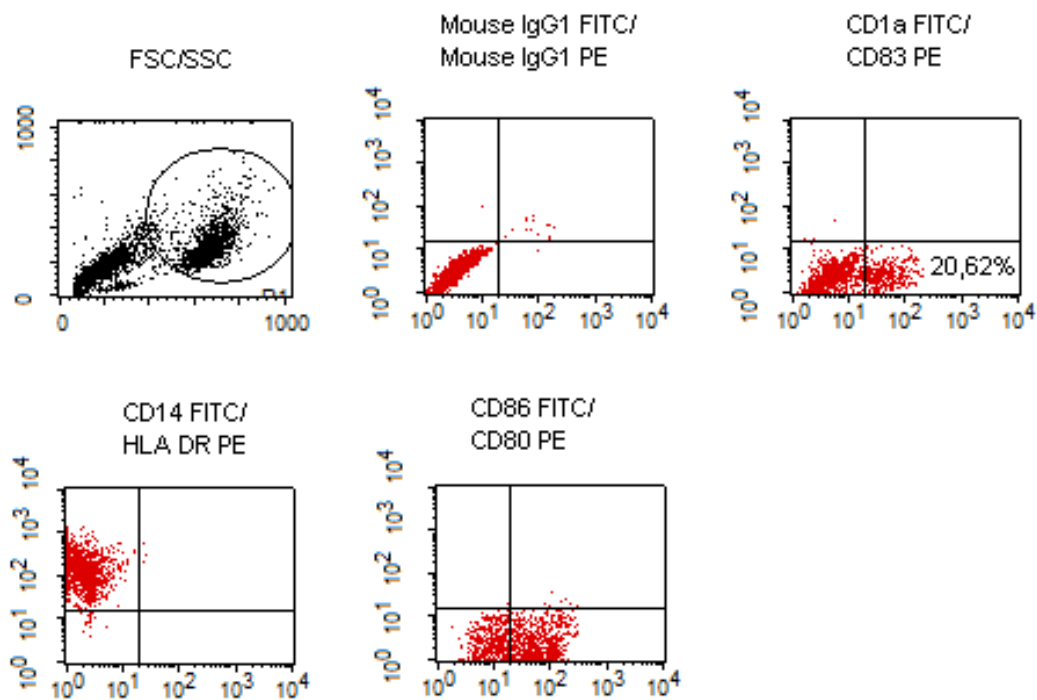


Abb. 3.8: Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen mit STI571 behandelten, dendritischen Zellen. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. In der obersten Reihe in der Mitte ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Plotüberschriften geben jeweils die X/Y-Achse wieder.

In Abbildung 3.9 wird der Phänotyp der aus den Monozyten generierten unreifen, mit IL10 behandelten dendritischen Zellen dargestellt. Die untersuchten Zellen zeigen sich zum Großteil sowohl für CD1a als auch CD83 negativ (97,08%). Ein wesentlicher Teil der Zellen zeigt sich sowohl für CD14 als auch HLA-DR positiv. Auch sind die untersuchten Zellen zumeist CD80/CD86 negativ. Insgesamt zeigen sich dendritische Zellen, deren Entwicklung durch IL10 gestört wurde.

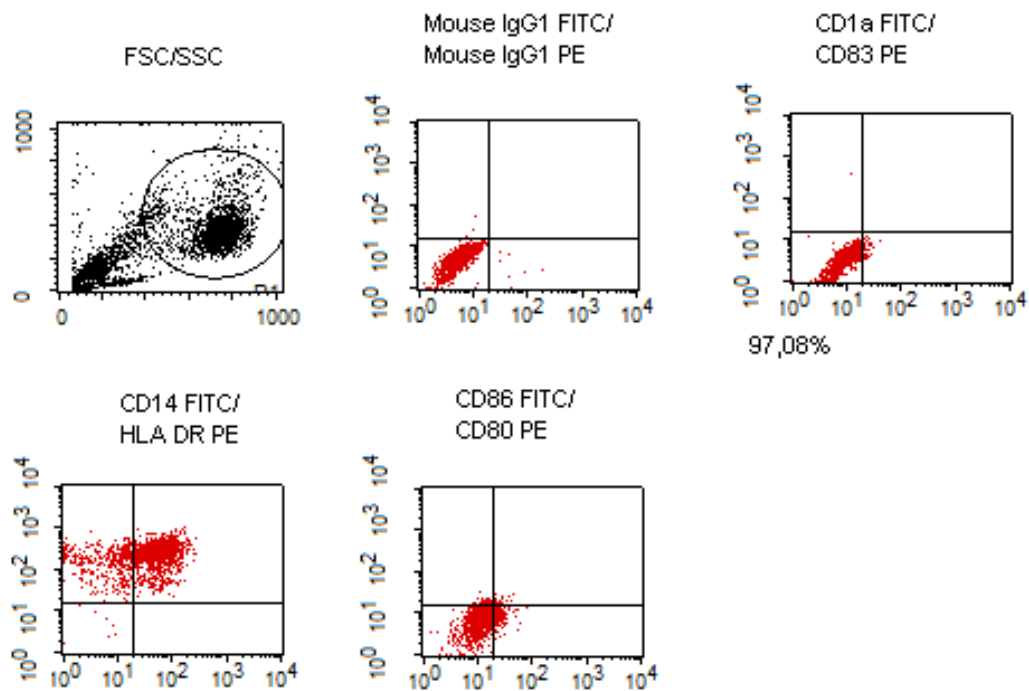


Abb. 3.9: Phänotypisierung von aus Monozyten gewonnenen mit IL10 behandelten dendritischen Zellen. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. In der obersten Reihe in der Mitte ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Plotüberschriften geben jeweils die X/Y-Achse wieder.

3.1.2 Nachweis der differentiellen Expression von Osteoactivin (DC-HIL) mittels RT-PCR

Aus den oben bezeichneten Monozyten, unreifen dendritischen Zellen und mit LPS behandelten, reifen dendritischen Zellen wurde RNA gewonnenen und mittels RT-PCR die Expression von Osteoactivin auf mRNA-Ebene untersucht. In Abbildung 3.10 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt.

Es zeigt sich für die unreifen dendritischen Zellen ein deutliches Signal, welches sich in abgeschwächter Form auch bei den reifen dendritischen Zellen wiederfindet. Für die Monozyten konnte keinerlei Signal gezeigt werden. Um die Verunreinigung von Reagenzien mit einer Ziel-DNA zu überprüfen, wurde jeweils eine PCR ohne cDNA durchgeführt (Negativkontrolle). Die Kontrolle PCR mit beta-2-Mikroglobulin ergab gleichmäßige Banden für alle drei Proben, was zeigt, dass jeweils gleiche Mengen von cDNA eingesetzt wurden.

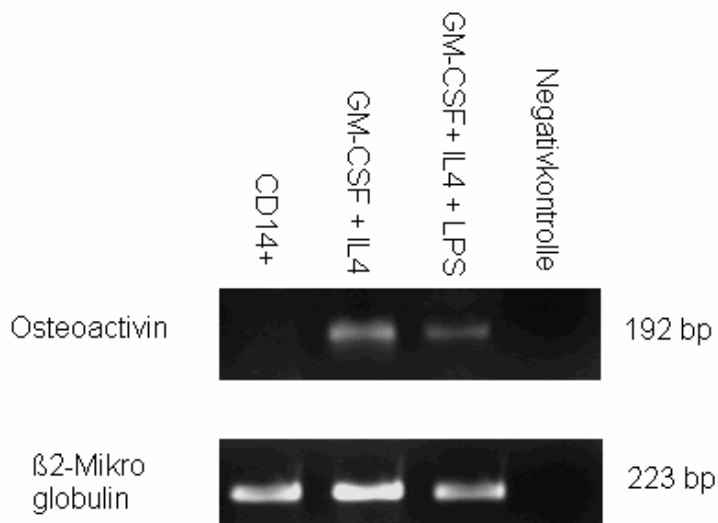


Abb. 3.10: Differentielle Expression des Gens Osteoactivin. Untersuchung der Transkription von Osteoactivin (DC-HIL). In Spur 1 sind die Monozyten, in Spur 2 und 3 daraus generierte unreife und reife dendritische Zellen dargestellt. Die Negativkontrolle ohne cDNA im PCR-Ansatz ist in Spur 4 zu sehen. Zur Kontrolle wurden Primer gegen beta-2-Mikroglobulin eingesetzt. Alle Größenangaben in Basenpaaren. Als Größenmarker wurde die 1kb-DNA-Ladder verwendet (nicht abgebildet).

3.1.3 Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in dendritischen Zellen auf Transkriptionsebene

Aus den oben bezeichneten mit DMSO, Pam3Cys, LPS, PolyI:C, R848, STI571(Imatinib) und IL10 behandelten dendritischen Zellen wurde RNA gewonnen und mittels RT-PCR die Expression von Osteoactivin auf mRNA-Ebene untersucht.

In Abbildung 3.11 sind die Ergebnisse dieser Untersuchungen dargestellt. Da die einzelnen Stimulanzen in DMSO gelöst sind, wurde eine DMSO-Probe eingeführt, um eine unspezifische Stimulation durch DMSO auszuschließen. Es zeigt sich für die unreifen mit DMSO behandelten dendritischen Zellen ein deutliches Signal, welches sich in abgeschwächter Form auch bei den reifen mit Pam3Cys behandelten dendritischen Zellen wiederfindet. Die bezeichnete Bande verschwindet fast völlig nach Behandlung mit LPS oder PolyI:C, findet sich jedoch wieder in den mit R848 behandelten Zellen. Das Signal wird

deutlich verstärkt nach Behandlung mit STI571 (Imatinib) oder IL10. Um die Verunreinigung von Reagenzien mit einer Ziel-DNA zu überprüfen, wurde jeweils eine PCR ohne cDNA durchgeführt (Negativkontrolle). Die Kontrolle PCR mit beta-2-Mikroglobulin ergab gleichmäßige Banden für alle untersuchten Proben, was zeigt, dass jeweils gleiche Mengen von cDNA eingesetzt wurden.

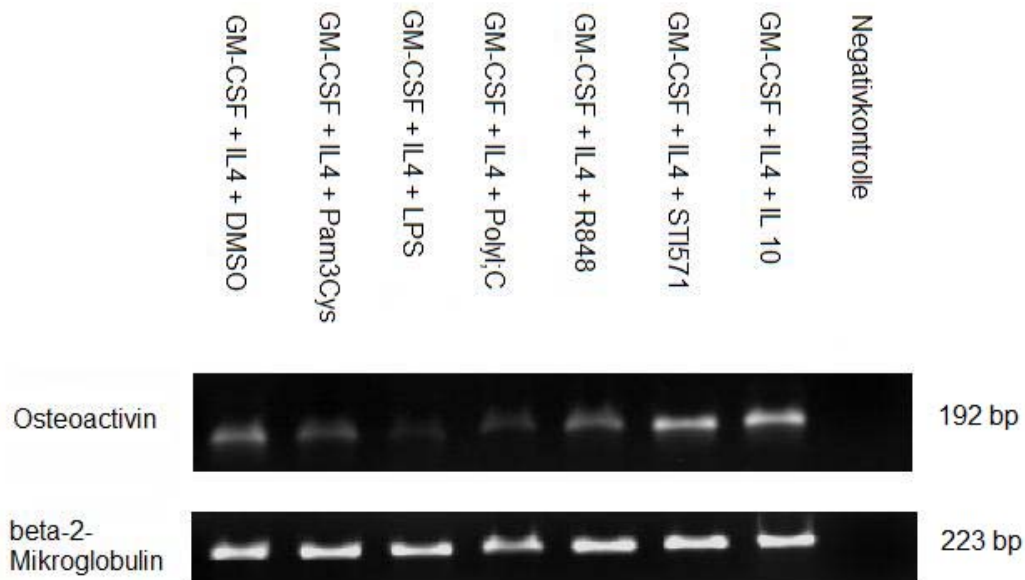


Abb. 3.11: Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression von Osteoactivin (DC-HIL). Untersuchung der Transkription von Osteoactivin (DC-HIL). In Spur 1 sind die DMSO behandelten, unreifen dendritischen Zellen aufgetragen, in Spur 2 bis 5 mit Pam3Cys, LPS, PolyI:C, oder R848 behandelte, reife dendritische Zellen. In den Spuren 6 und 7 sind mit STI571 (Imatinib) oder IL10 behandelte Zellen dargestellt. Die Negativkontrolle ohne cDNA im PCR-Ansatz ist in Spur 8 zu sehen. Zur Kontrolle wurden Primer gegen beta-2-Mikroglobulin eingesetzt. Alle Größenangaben in Basenpaaren. Als Größenmarker wurde die 1kb-DNA-Ladder verwendet (nicht abgebildet).

3.2 Nachweis der differentiellen Expression des Genes Osteoactivin (DC-Hil) in dendritischen Zellen und Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression auf Translationsebene

Zur Untersuchung der differentiellen Expression von Osteoactivin in dendritischen Zellen und des Einflusses der verschiedenen Stimuli auf die Expression auf Translationsebene wurde aus den unter 3.1 beschriebenen und

charakterisierten Monozyten, unreifen dendritischen Zellen, mit DMSO, Pam3Cys, LPS, PolyI:C, R848, STI571 oder IL10 behandelten Zellen Proteinlysate gewonnen und mit diesen Western Blot betrieben. Es wurden jeweils 15 µg Protein pro Spur geladen, der polyklonale Antikörper gegen Osteoactivin (DC-HIL) wurde im Verhältnis 1:2000 eingesetzt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für die aus vier verschiedenen Spendern gewonnenen Befunde.

In Abbildung 3.12 sind die Ergebnisse des oben genannten Experiments dargestellt. Man erkennt, dass sich für die Monozyten kein Signal findet. Ein deutliches Signal hingegen lässt sich für die unreifen dendritischen Zellen finden. Dieses findet sich nach Behandlung mit TLR-Liganden nur noch in abgeschwächter Form, jedoch massiv verstärkt nach Behandlung mit STI571 oder IL10. Es zeigt sich ein smear im Bereich von 63 kDA der gut der erwarteten molekularen Massen für die Isoformen a und b entspricht, eine schwächere Bande im Bereich von 90 kDA und eine stärkere im Bereich von 100 kDA, für STI noch eine zusätzlich bei etwa 120 kDA. Nach Behandlung mit Interleukin 10 ist der smear sehr ausgedehnt von ~ 63 kDA bis zu 90 kDA. Die unterschiedlichen molekularen Massen könnten unterschiedliche Grade der Glykosylierung des Proteins widerspiegeln.

Die Kontrolle mit GAPDH zeigt gleichmäßige Banden für alle verwendeten Proben, was zeigt, dass jeweils gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden.

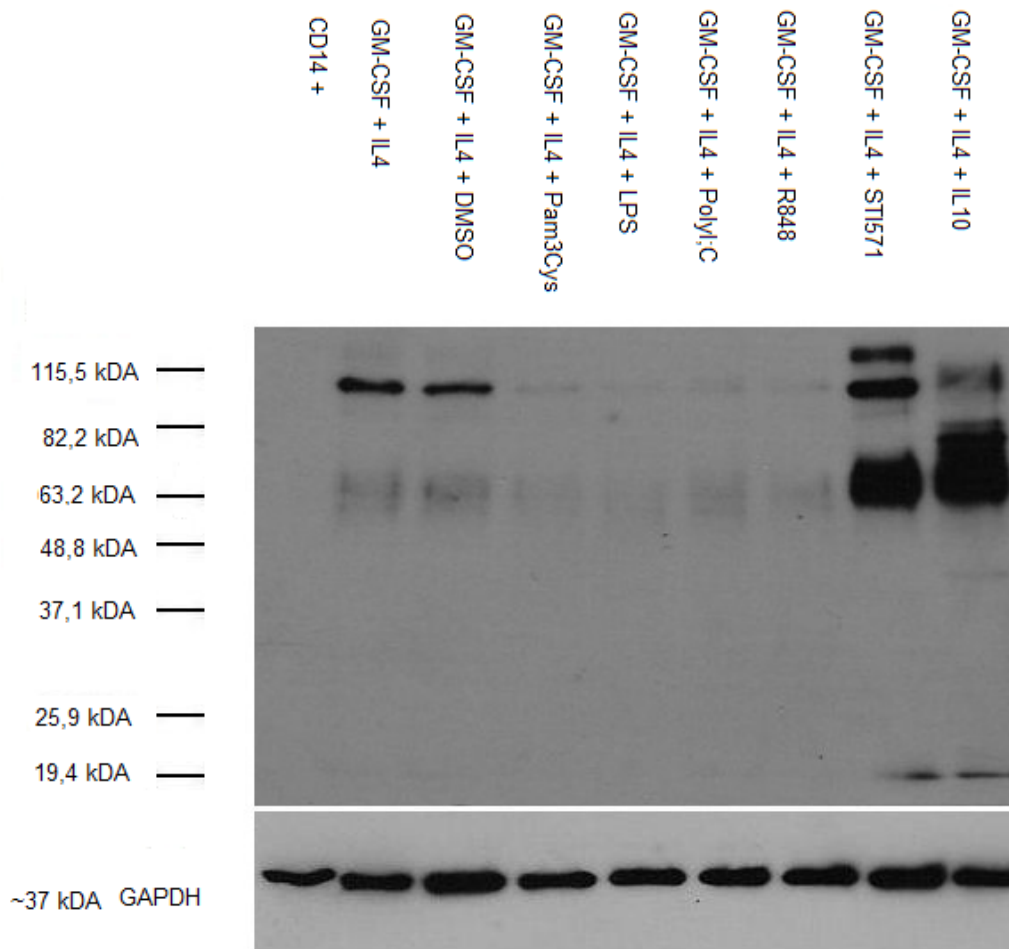


Abb. 3.12: Differentielle Expression und Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression von Osteoactivin (DC-HIL). Untersuchung der Expression von Osteoactivin (DC-HIL) auf Proteinebene. In Spur 1 sind die durch MACS gewonnenen Monozyten aufgetragen, in den Spuren 2 und 3 die unreifen dendritischen Zellen bzw. die mit DMSO behandelten unreifen dendritischen Zellen. In den Spuren 4 bis 7 sind die mit Pam3Cys, LPS, PolyI:C, oder R848 behandelte, reife dendritische Zellen dargestellt, in den Spuren 8 und 9 die mit ST1571 (Imatinib) oder IL10 behandelte Zellen. Größenangaben in kDa. Als Grössenmarker wurde Bench MarkTM Prestained Protein Ladder eingesetzt (außen links dargestellt)

3.3 Untersuchung der Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in Lymphozyten und dendritischen Zellen des peripheren Blutes

Nachdem die differentielle Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in dendritischen Zellen gegenüber Monozyten und der Einfluss verschiedener Substanzen auf die Expression gezeigt werden konnte, stellt sich nun die Frage in wie weit Osteoactivin für dendritische Zellen spezifisch ist, oder auch in

Lymphozyten vorkommt. Es interessiert auch die Expression in dendritischen Zellen des peripheren Blutes.

Zur Untersuchung der Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in Lymphozyten und dendritischen Zellen des peripheren Blutes wurden solche mit Hilfe von MACS aus *buffy coats* gewonnen. Dabei wurden microbeads gegen CD3 für T-Lymphozyten bzw. CD19 für B-Lymphozyten eingesetzt. Auch wurden dendritische Zellen des peripheren Blutes in ihrer Gesamtheit bzw. nur deren BDCA1+ und BDCA2+ Subfraktionen mit Hilfe der entsprechenden Kits der Firma Miltenyi Biotech isoliert.

Die beschriebenen Zelltypen wurden mit Hilfe von Durchflusszytometrie auf ihren Phänotyp hin untersucht. Aus allen Zellen wurden Proteinlysate gewonnen und diese mittels Western Blot untersucht. Die dargestellten Ergebnisse sind jeweils repräsentativ für die aus zwei verschiedenen Spendern gewonnenen Befunde.

3.3.1 Phänotyp der untersuchten Zellen

Die in den Tabellen 3.3 bis 3.7 dargestellten Antikörperpaneele wurden zur Charakterisierung der CD14+ Monozyten und der aus Monozyten gewonnenen dendritischen Zellen eingesetzt.

Tab. 3.3: Phänotypisierung von durch MACS gewonnenen CD3+ T-Lymphozyten

Ansatz	FITC-konjugierter Antikörper	Spezifität	PE-konjugierter Antikörper	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle
2	CD3	T-Zellen	CD19	B-Zellen
3	CD14	Monozyten	CD56	NK-Zellen

Tab. 3.4: Phänotypisierung von durch MACS gewonnenen CD20+ B-Lymphozyten

Ansatz	FITC-konjugierter Antikörper	Spezifität	PE-konjugierter Antikörper	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle
2	CD20	B-Zellen	CD3	T-Zellen
3	CD14	Monozyten	CD56	NK-Zellen

Tab. 3.5: Phänotypisierung von durch MACS gewonnenen blood DCs

Ansatz	FITC-konjugierter Antikörper	Spezifität	PE-konjugierter Antikörper	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle
2	CD14/CD19	Monozyten, B-Zellen	BDCA1/BDCA2/BDCA3	Blood DCs

Tab. 3.6: Phänotypisierung von durch MACS gewonnenen BDCA1+ (CD1c+) blood DCs

Ansatz	FITC-konjugierter Antikörper	Spezifität	PE-konjugierter Antikörper	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle
2	CD19	Monozyten, B-Zellen	BDCA1(CD1c)	Blood DCs

Tab. 3.7: Phänotypisierung von durch MACS gewonnenen BDCA2+ blood DCs

Ansatz	FITC-konjugierter Antikörper	Spezifität	PE-konjugierter Antikörper	Spezifität
1	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle	Maus IgG ₁	Isotypkontrolle
2	HLA-DR	MHC Klasse II	BDCA2	Blood DCs
3	HLA-DR	MHC Klasse II	CD 123	Blood DCs

In Abbildung 3.13 ist der Phänotyp der aus *buffy coats* gewonnenen CD3+ T-Lymphozyten dargestellt. Die untersuchten Zellen sind fast ausnahmslos positiv für CD3, zeigen sich hingegen weitestgehend CD19 negativ. Auch ist zu bemerken, dass die untersuchten Zellen für CD14 und CD56 negativ sind. Es handelt sich also um CD3+ T-Lymphozyten mit einer Reinheit von 98,23 % mit nur minimaler Verunreinigung durch andere Zelltypen. Eine starke Verunreinigung durch B-Lymphozyten, Monozyten oder NK-Zellen kann ausgeschlossen werden.

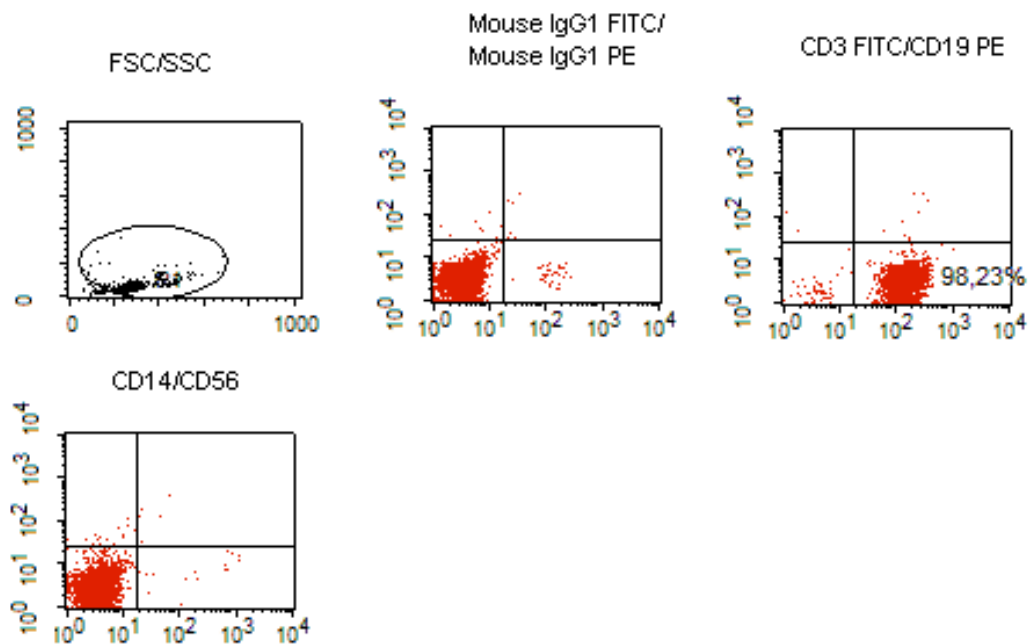


Abb. 3.13: Phänotypisierung von mittels MACS gewonnenen CD3⁺ T-Lymphozyten. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. In der obersten Reihe in der Mitte ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Plotüberschriften geben jeweils die X/Y-Achse wieder.

In Abbildung 3.14 ist der Phänotyp der aus *buffy coats* gewonnenen CD20⁺ B-Lymphozyten dargestellt. Die untersuchten Zellen sind zum allergrößten Teil positiv für CD20, zeigen sich hingegen für CD3 negativ. Auch ist zu bemerken, dass die untersuchten Zellen für CD14 und CD56 negativ sind. Es handelt sich also um CD20⁺ B-Lymphozyten mit einer Reinheit von 96,86 % mit nur minimaler Verunreinigung durch andere Zelltypen. Eine starke Verunreinigung durch T-Lymphozyten, Monozyten oder NK-Zellen kann ausgeschlossen werden.

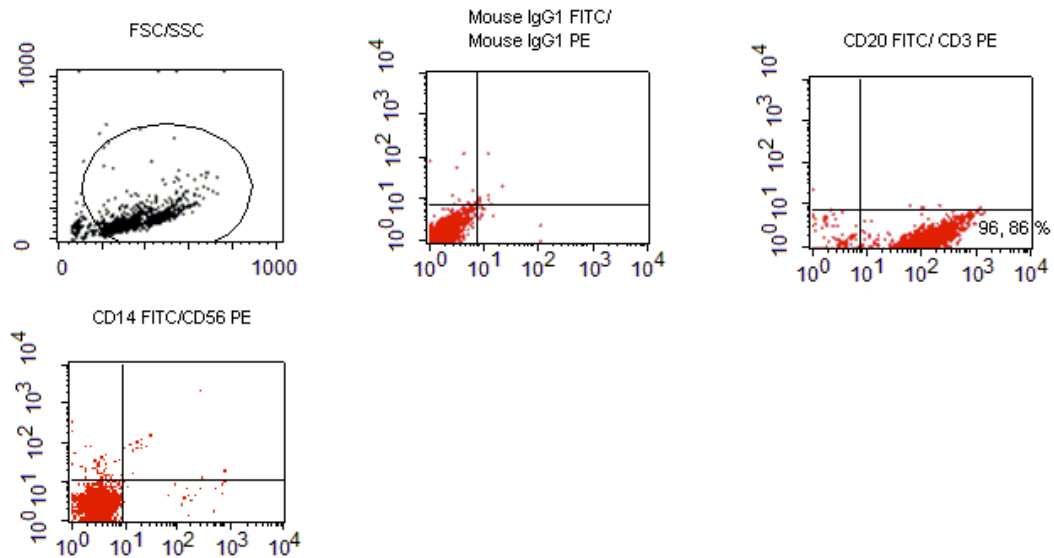


Abb. 3.14: Phänotypisierung von mittels MACS gewonnenen CD20+ B-Lymphozyten. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. In der obersten Reihe in der Mitte ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Plotüberschriften geben jeweils die X/Y-Achse wieder

In Abbildung 3.15 ist der Phänotyp der mittels MACS aus *buffy coats* gewonnenen blood DCs dargestellt. Die untersuchten Zellen sind zu 85,46% positiv für BDCA1 (CD1c), BDCA2 oder BDCA3, zeigen sich jedoch überwiegend negativ für CD14 oder CD19. Es handelt sich also um eine Mischung der verschiedenen Subtypen von dendritischen Zellen des peripheren Blutes.

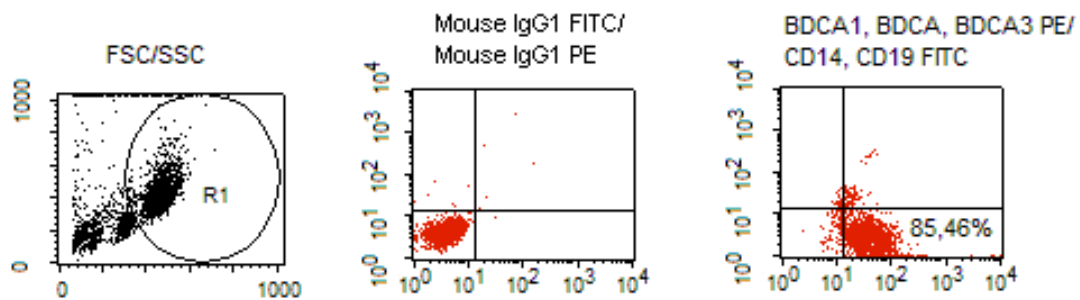


Abb. 3.15: Phänotypisierung von mittels MACS gewonnenen blood DCs. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. In der Mitte ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Plotüberschriften geben jeweils die X/Y-Achse wieder

Aus Abbildung 3.16 ist der Phänotyp der verwendeten mittels MACS isolierten BDCA1+ blood DCs zu ersehen. Die untersuchten Zellen sind zu einem hohen Prozentsatz positiv für BDCA1 (CD1c), zeigen sich jedoch negativ für CD19, was zeigt, dass keine Verunreinigung durch B-Lymphozyten vorliegt. Es handelt sich in der Gesamtschau also um BDCA1+ blood DCs.



Abb. 3.16: Phänotypisierung von mittels MACS gewonnenen BDCA1+ (CD1c+) blood DCs. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. In der Mitte ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Plotüberschriften geben jeweils die X/Y-Achse wieder.

In Abbildung 3.17 ist der Phänotyp der verwendeten aus *buffy coats* isolierten BDCA2+ blood DCs dargestellt. Die untersuchten Zellen sind zum großen Teil positiv für BDCA2 (97,24%) und für CD123 (98,70%). Es handelt sich also um BDCA2+ plasmacytoide dendritische Zellen des peripheren Blutes in hoher Reinheit.

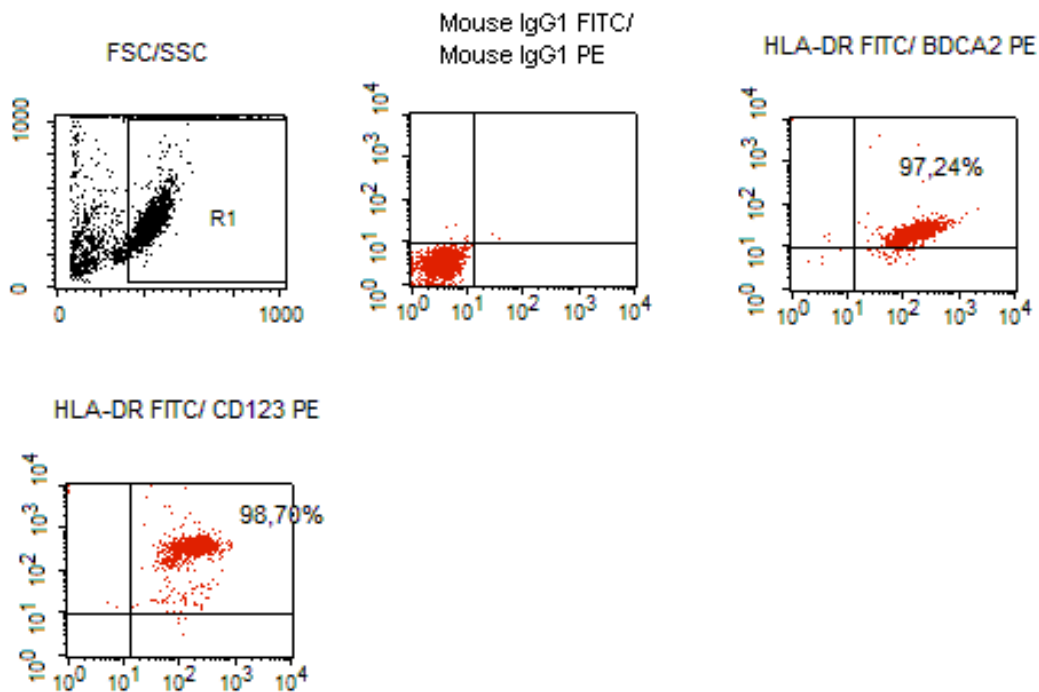


Abb. 3.17: Phänotypisierung von mittels MACS gewonnenen BDCA2+ blood DCs. Untersucht wurden je 10.000 Zellen pro Färbung. In der obersten Reihe in der Mitte ist die Isotypkontrolle dargestellt. Die Plotüberschriften geben jeweils die X/Y-Achse wieder.

3.3.2 Expression von Osteoactivin in Lymphozyten und dendritischen Zellen des peripheren Blutes

Aus den unter 3.3.1 beschriebenen Zelltypen wurden Proteinlysate gewonnenen und mit Hilfe dieser die Expression von Osteoactivin auf Proteinebene mittels Western Blot untersucht. Es wurden jeweils 15 µg Protein pro Spur geladen, der polyklonale Antikörper gegen Osteoactivin (DC-HIL) wurde im Verhältnis 1:2000 eingesetzt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentativ für die aus zwei verschiedenen Spendern gewonnenen Befunde.

In Abbildung 3.18 ist die Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in Lymphozyten und dendritischen Zellen des peripheren Blutes dargestellt. Wie zu ersehen ist, lässt sich keine Expression in B- als auch T-Lymphozyten nachweisen. Für die dendritischen Zellen des peripheren Blutes ergeben sich jeweils nur sehr schwache Signale bei ~ 63 kDA.

Die Kontrolle mit GAPDH zeigt gleichmäßige Banden für alle verwendeten Proben, was zeigt, dass jeweils gleiche Proteinmengen eingesetzt wurden

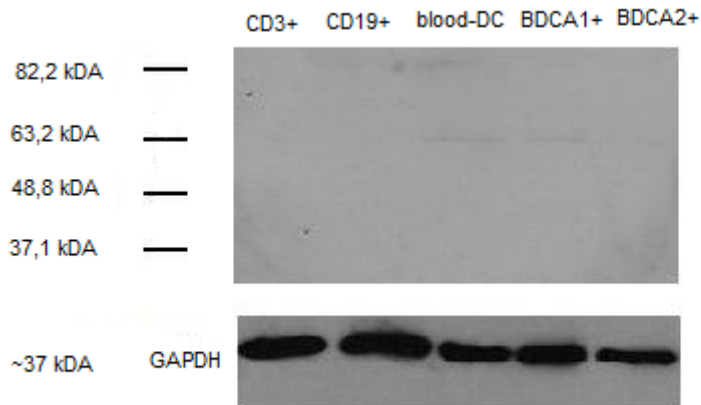


Abb. 3.18: Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in Lymphozyten und dendritischen Zellen des peripheren Blutes. Untersuchung der Expression von Osteoactivin (DC-HIL) auf Proteinebene. In Spur 1 sind die durch MACS gewonnenen T-Lymphozyten aufgetragen, in der Spur 2 durch MACS gewonnenen B-Lymphozyten. In den Spuren 3 bis 5 sind durch MACS gewonnenen dendritische Zellen des peripheren Blutes bzw. deren BDCA1+ oder BDCA2+ Subfraktion dargestellt. Größenangaben in kDA. Als Grössenmarker wurde Bench MarkTM Prestained Protein Ladder eingesetzt (außen links dargestellt)

3.4 Untersuchung der Osteoactivin-Expression mittels quantitativer RT-PCR

Zur Quantifizierung der Osteoactivin (DC-HIL)-Expression auf mRNA Ebene wurde eine quantitative RT-PCR nach dem Lightcycler®-Verfahren unter Verwendung von Universal Probe Library Sonden eingesetzt.

Verwendet wurden dabei durch Plastikadhärenz gewonnenen Monozyten. Aus diesen wurden in siebentägiger Kultur in RPMI angezüchtet wurden. Dazu erfolgte der Zusatz von Interleukin 4 und GM-CSF an den Tagen 0, 2, 4 und 6 nach Beginn der Zellkultur. Zu einem Teil der kultivierten Zellen wurde 24 Stunden vor Ernte DMSO bzw. Pam3Cys hinzugegeben. Zu einem anderen Teil wurden die Substanzen STI 571 (Imatinib) oder IL10 jeweils an den Tagen 0, 2, 4 und 6 hinzugegeben (siehe auch Tabelle 2.5).

Aus allen beschriebenen Zelltypen wurde RNA gewonnen und diese einer quantitativen RT-PCR unterworfen. Durch Aufnahme einer Standardgeraden

wurden die eingesetzten Konzentrationen ermittelt und das Verhältnis zur Konzentration des „housekeeping genes“ PBGD bestimmt. Die dargestellten Ergebnisse sind repräsentative für die aus 3 verschiedenen Spendern gewonnenen Befunde.

In Abbildung 3.19 sind die gewonnenen Ergebnisse dargestellt. Auch hier sieht man, wie zuvor, eine verminderte Expression nach Behandlung mit dem TLR-Liganden Pam3Cys und wesentlich gesteigerte Expression nach Behandlung mit STI 571 und IL 10. DMSO scheint keinen wesentlichen Einfluss auf die Expression zu besitzen.

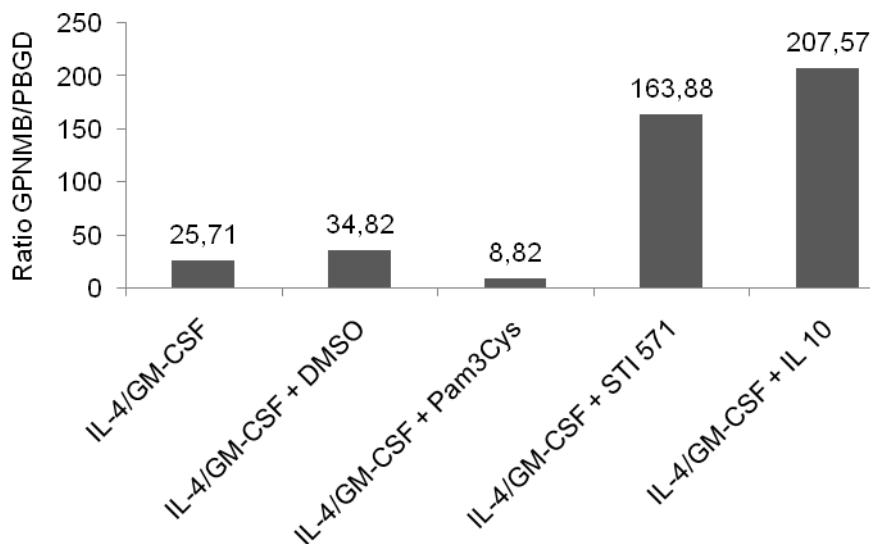


Abb. 3.19: Graphische Darstellung des Verhältnisses der Konzentrationen von GPNMB und PBGD cDNA aus verschiedenen DC-Typen.

3.5 Untersuchung der Osteoactivin-Expression mittels anti-Osteoactivin Sekundärfärbung

Da es sich bei Osteoactivin (DC-HIL) um ein Oberflächenmolekül handelt, ist eine Untersuchung der Oberflächenexpression angezeigt. Hierzu wurde eine anti-Osteoactivin FACS-Sekundärfärbung verwendet.

Zunächst mussten hierzu die einzusetzenden Antikörperkonzentrationen ermittelt werden. Untersucht wurden dabei dendritische Zellen die aus Monozyten unter Zugabe von IL 4, GM-CSF sowie IL 10 an den Tagen 2, 4 und

6 gewonnen wurden. Die verwendeten Monozyten wurden durch Plastikadhärenz gewonnen. Die Sekundärfärbung erfolgte mit verschiedenen Konzentrationen des Primärantikörpers (monoklonaler mouse IgG 2B anti-Osteoactivin Antikörper) und entsprechender Konzentration der Isotypkontrolle (mouse IgG 2B Antikörper). Der Sekundärantikörper (anti-mouse F(ab')₂-Fragmente PE-markiert) wurde laut Herstellerangaben verdünnt eingesetzt.

Nach Ermittlung der notwendigen Primärantikörper-Konzentration wurde die Oberflächenexpression von Osteoactivin (DC-HIL) in verschiedenen unterschiedlich stimulierten DCs untersucht. Auch hier wurden durch Plastikadhärenz gewonnene Monozyten eingesetzt. Es erfolgte 7-tägige Kultur in RPMI unter Zugabe von IL4 und GM-CSF an den Tagen 0, 2, 4 und 6. Zu einem Teil der Zellen wurde 24 h vor Ernte Pam3Cys oder DMSO zugesetzt. Bei einem anderen Teil erfolgte Zugabe von STI 571 oder IL 10 an den Tagen 0, 2, 4 und 6.

3.5.1 Titration des Primärantikörpers bei anti-Osteoactivin Sekundärfärbung

In den Abbildungen 3.20 und 3.21 sind die Ergebnisse der Titration des Primärantikörpers bei über 7 Tagen mit IL10 behandelten dendritischen Zellen dargestellt. Zur Quantifizierung des Fluoreszenz-Shifts wurden jeweils die geometrischen Mittelwerte der gemessenen Fluoreszenz für die Isotypkontrolle und die eigentliche Messung der Probe ermittelt und die Differenz gebildet. Diese Differenzen sind in Abbildung 3.21 graphisch dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass beim Sprung von 25 µg/ml auf 50 µg/ml Konzentration des Primärantikörpers ein deutliche Zunahme des gemessenen Fluoreszenz-Shifts erfolgt, während dieser bei den folgenden Konzentrationssteigerungen praktisch unverändert bleibt. Es ist daher davon auszugehen, dass bei 50 µg/ml bereits eine Sättigung der Zellen mit Antikörper erfolgt ist. Diese Konzentration wurde daher im Folgenden zur anti-Osteoactivin-Sekundärfärbung eingesetzt.

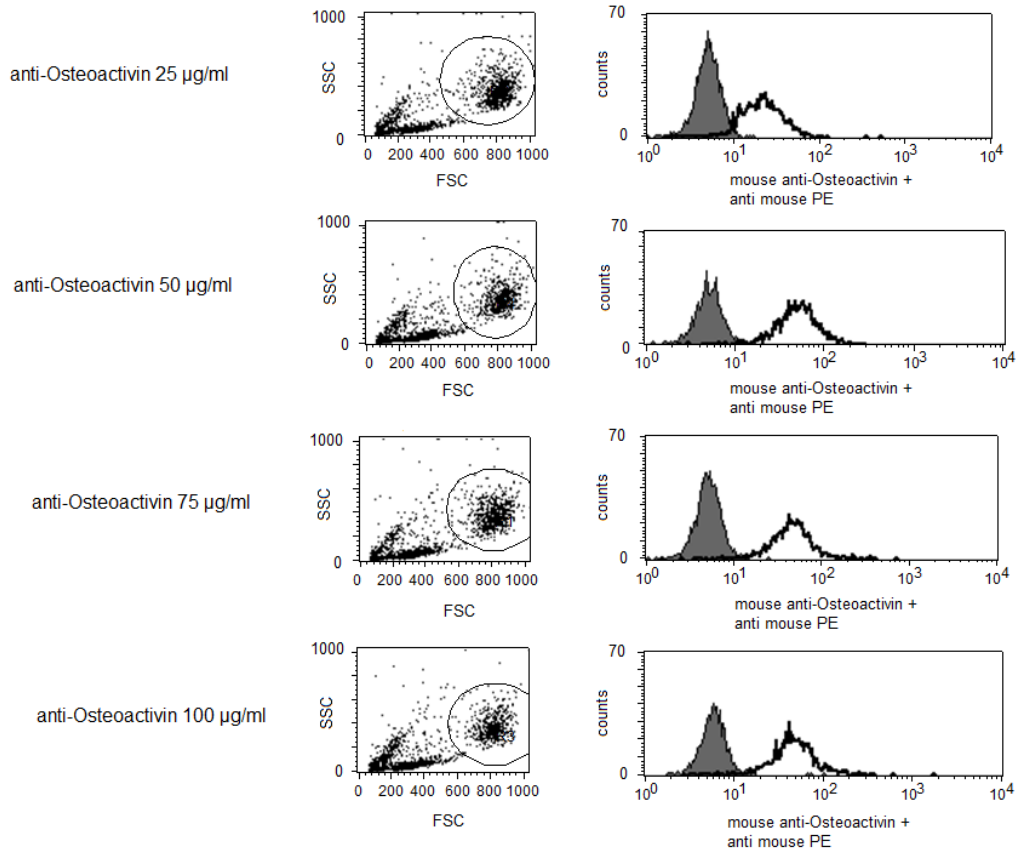


Abb. 3.20: Titration von Primärantikörper bei anti-Osteoactivin Sekundärfärbung. Untersucht wurden jeweils 10000 Zellen pro Färbung. Im linken Teil der Abbildung wird jeweils FSC und SSC der untersuchten Zellen dargestellt, im rechten Teil für die umrissene Zellpopulation die gemessene Fluoreszenz gegen die zugehörige Zellzahl. Die Isotypkontrolle ist grau unterlegt.

Tab. 3.8: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenz bei FACS-Titration für anti-Osteoactivin Sekundärfärbung.

Konzentration Primärantikörper	Geometrischer Mittelwert der Fluoreszenz Isotypkontrolle	Geometrischer Mittelwert der Fluoreszenz Probe	Differenz der geometrischen Mittelwerte
25 µg/ml	4,95	20,6	15,65
50 µg/ml	4,9	45,43	40,53
75 µg/ml	5,02	41,99	36,97
100 µg/ml	5,7	42,88	37,18

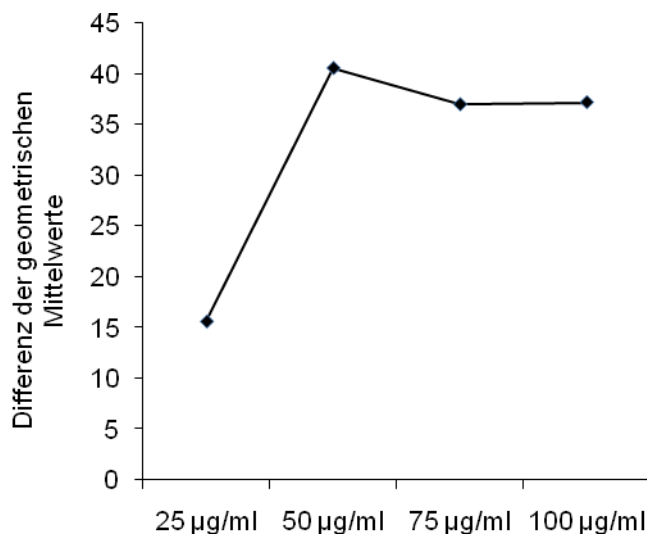


Abb. 3.21: Graphische Darstellung der Differenz der geometrischen Mittelwerte bei FACS-Titration für anti-Osteoactivin-Sekundärfärbung.

3.5.2 Anti-Osteoactivin-Sekundärfärbung von verschiedenen DC-Typen

Untersucht wurde die Osteoactivin (DC-HIL)-Expression auf der Zelloberfläche mittels anti-Osteoactivin-Sekundärfärbung bei ausschließlich mit IL 4 und GM-CSF behandelten Zellen, bei zusätzlich mit Pam3Cys und DMSO behandelten Zellen und bei mit IL 10 oder Imatinib behandelten Zellen.

In Abbildung 3.22 und 3.23 sind die gewonnenen Ergebnisse dargestellt. Die dargestellten Befunde sind repräsentativ für die aus 3 verschiedenen Spendern gewonnenen Ergebnisse. Auch hier wurden die Differenzen der geometrischen Mittelwerte zur Quantifizierung der beobachteten Shifts genutzt. Diese sind in Abbildung 3.23 dargestellt.

Es ist zu erkennen, dass bei ausschließlich IL 4 und GM-CSF behandelten Zellen sowie bei DMSO und Pam3Cys behandelten Zellen kein wesentlicher Shift erfolgt. Dieser ist jedoch deutlich nach Behandlung mit IL10 oder Imatinib.

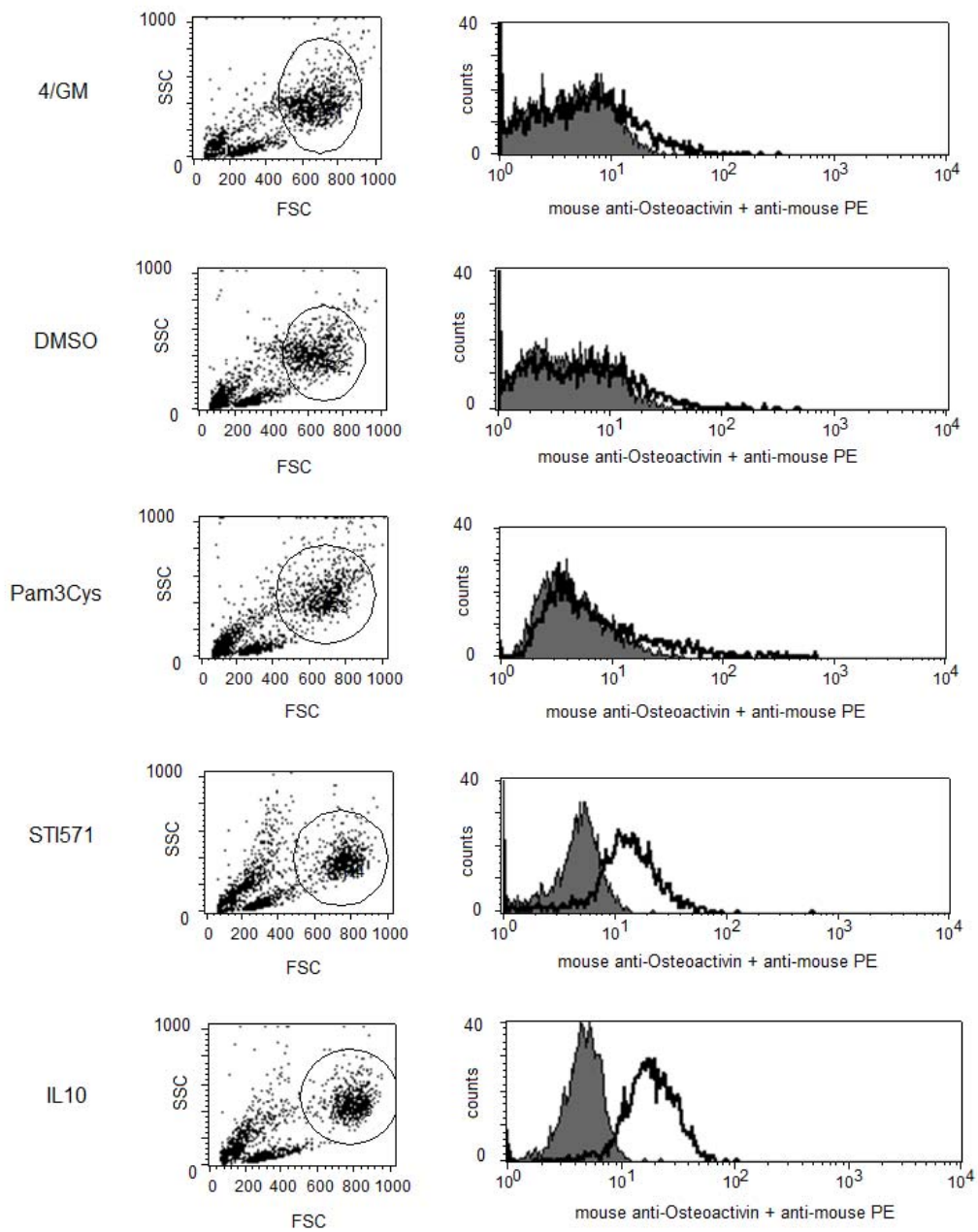


Abb. 3.22: Anti-Osteoactivin Sekundärfärbung von verschiedenen DC-Typen. Untersucht wurden jeweils 10000 Zellen pro Färbung. Im linken Teil der Abbildung wird jeweils FSC und SSC der untersuchten Zellen dargestellt, im rechten Teil für die umrissene Zellpopulation die gemessene Fluoreszenz gegen die zugehörige Zellzahl. Die Isotypkontrolle ist grau unterlegt.

Tab. 3.9: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenz bei anti-Osteoactivin Sekundärfärbung verschiedener DC-Typen.

DC-Typ	Geometrischer Mittelwert der Fluoreszenz Isotypkontrolle	Geometrischer Mittelwert der Fluoreszenz Probe	Differenz der geometrischen Mittelwerte
4/GM	4,01	5,31	1,30
DMSO	3,95	5,21	1,26
Pam3Cys	4,25	6,44	2,19
STI571	4,46	11,90	7,44
IL10	4,62	17,21	12,59

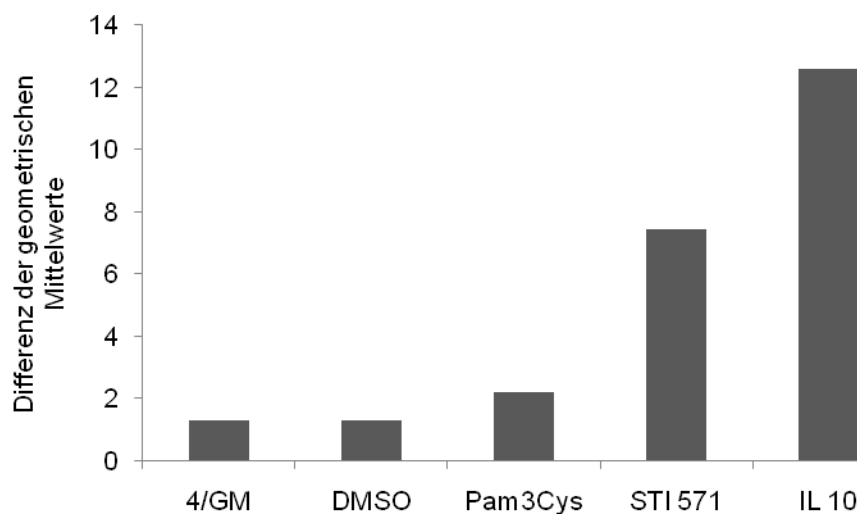


Abb. 3.23: Graphische Darstellung der Differenz der geometrischen Mittelwerte bei anti-Osteoactivin-Sekundärfärbung von verschiedenen DC-Typen.

3.6 Untersuchung des Einflusses von unterschiedlichen Zeitpunkten der IL 10 Zugabe auf die Osteoactivin-Expression.

Von Interesse ist auch der Einfluss von unterschiedlichen Zeitpunkten der IL 10 Zugabe auf die Expression von Osteoactivin (DC-HIL). Zu diesem Zweck wurden dendritische Zellen durch Kultur von Monozyten in RPMI für 7 Tage unter Zugabe von IL 4 und GM-CSF an den Tagen 0, 2, 4 und 6 erhalten. Die Monozyten wurden dabei durch Plastikadhärenz gewonnen. Zu einem Teil der Zellen wurde an den Tagen 0, 2, 4 und 6 IL 10 zugegeben, zu einem anderen Teil nur an den Tagen 2, 4 und 6, des Weiteren an den Tagen 4 und 6 sowie ausschließlich ab dem 6. Tag. Zusätzlich wurden Zellen generiert, zu denen ab

dem Tag 6 IL 10 zugegeben wurde und dann nochmals an den Tagen 2 und 4 nach erstmaliger IL 10 Zugabe IL 4, GM-CSF und IL 10 zugesetzt wurden. Die Ernte erfolgte dann am Tag 5 nach erstmaliger IL 10 Zugabe.

Zur Untersuchung der Oberflächenexpression wurde anti-Osteoactivin-Sekundärfärbung eingesetzt. Die gewonnenen Ergebnisse sind in Abbildung 3.24 und 3.25 dargestellt. Zur Quantifizierung des Shifts wurde die Differenz der geometrischen Mittelwerte bestimmt und graphisch aufgetragen.

Es ist zu erkennen, dass eine starke Steigerung der Osteoactivin-Expression nur nach Zugabe von IL 10 ab Tag 0 zu erhalten ist. Auch eine Verlängerung der Einwirkungsdauer auf 5 Tage nach Zugabe führte nicht zu einer Expressionssteigerung.

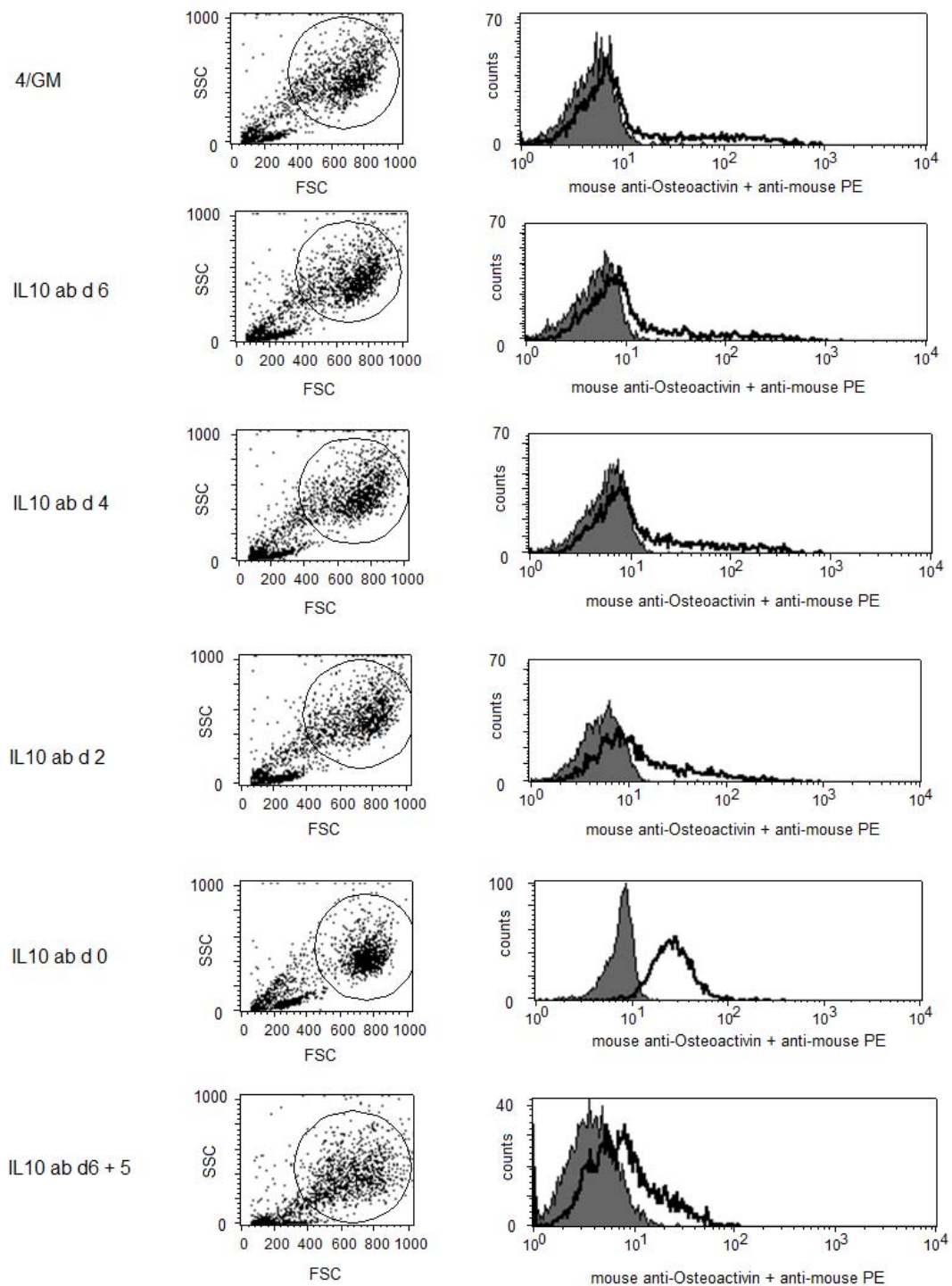


Abb. 3.24: Einfluss von verschiedenen Zeitpunkten der IL 10 Zugabe auf die Osteoactivin – Expression. Anti-Osteoactivin Sekundärfärbung. Untersucht wurden jeweils 10000 Zellen pro Färbung. Im linken Teil der Abbildung wird jeweils FSC und SSC der untersuchten Zellen dargestellt, im rechten Teil für die umrissene Zellpopulation die gemessene Fluoreszenz gegen die zugehörige Zellzahl. Die Isotypkontrolle ist grau unterlegt

Ergebnisse

Tab. 3.10: Geometrische Mittelwerte der Fluoreszenz bei anti-Osteoactivin Sekundärfärbung zur Bestimmung des Einflusses von verschiedenen Zeitpunkten der IL10 Zugabe auf die Expression von Osteoactivin.

DC-Typ	Geometrischer Mittelwert der Fluoreszenz Isotypkontrolle	Geometrischer Mittelwert der Fluoreszenz Probe	Differenz der geometrischen Mittelwerte
4/GM	4,89	9,22	4,33
IL 10 ab d 6	4,87	9,64	4,77
IL 10 ab d 4	5,58	10,91	5,33
IL 10 ab d 2	5,22	11,67	6,45
IL 10 ab d 0	7,35	24,39	17,04
IL 10 ab d 6 + 5 d	3,76	7,22	3,46

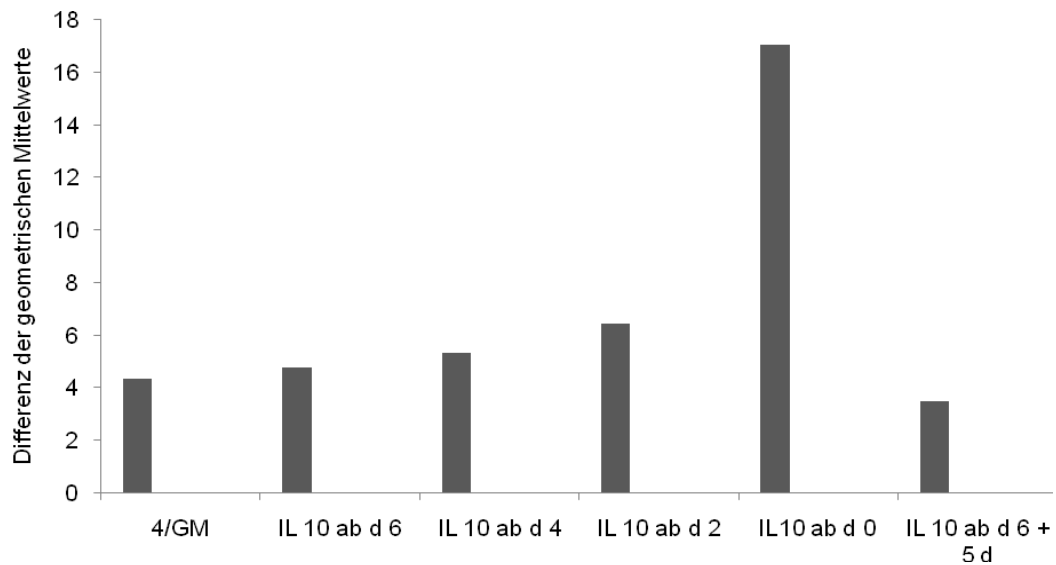


Abb. 3.25: Graphische Darstellung der Differenz der geometrischen Mittelwerte bei anti-Osteoactivin-Sekundärfärbung zur Bestimmung des Einflusses von verschiedenen Zeitpunkten der IL10 Zugabe auf die Expression von Osteoactivin

4. Diskussion

Die dendritischen Zellen sind die potentesten immunostimulatorisch wirkenden, Antigen-präsentierenden Zellen des gesamten Immunsystems. Sie spielen die zentrale Rolle bei der Stimulation naiver T-Lymphozyten. Auf Grund dieser Eigenschaften sind sie von entscheidender Bedeutung für die Induktion spezifischer Immunantworten [8],[16],[21].

Dendritische Zellen sind aber auch zur Präsentation von Autoantigenen in der Lage und scheinen eine entscheidende Rolle bei der Induktion von Toleranz und Hemmung autoreaktiver T-Lymphozyten zu spielen [13],[57],[63],[88],[102].

Auf Grund der nur geringen Zahl der dendritischen Zellen im Organismus blieb es lange Zeit sehr schwierig, ausreichenden Mengen für die Untersuchung zu gewinnen. Dies änderte sich durch Verfahren, die es ermöglichen, dendritische Zellen ex vivo aus CD14+ Monozyten oder CD34+ hämatopoetischen Stammzellen zu gewinnen. [9],[16],[20],[23],[93]. Dies ermöglichte auch einen zunehmenden Einsatz in klinischen Studien, insbesondere zur Behandlung von Tumorerkrankungen [9],[16],[22],[40].

Zur Ausübung ihrer spezifischen Funktionen und Steuerung ihrer Entwicklung besitzen dendritische Zellen eine Reihe differentiell exprimierter Gene. Mit Hilfe der Methode der cDNA-Subtraktion ist es möglich, solche bisher noch unbekanntene Gene zu identifizieren und durch die Methoden der RT-PCR und des Western Blots ihre Expression auf Ebene der Transkription und Translation zu untersuchen [43]. So kann ein verbessertes Verständnis der Immunbiologie dendritischer Zellen erreicht werden.

In dieser Arbeit wurde die differentielle Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in dendritischen Zellen bestätigt und das Expressionmuster untersucht.

4.1 Differentielle Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in dendritischen Zellen

Die differentielle Expression des Gens Osteoactivin (DC-HIL) in dendritischen Zellen im Vergleich zu Monozyten wurden mit Hilfe von RT-PCR und Western Blot gezeigt.

Aus der Analyse einer subtraktiven cDNA-Bibliothek wurde die Annahme gewonnen, dass Osteoactivin (DC-HIL) differentiell in dendritischen Zellen exprimiert wird. Zur Verifikation der Hypothese wurden Monozyten aus *buffy coats* isoliert und aus diesen in vitro reife und unreife dendritische Zellen gewonnen. Mittels RT-PCR und Western Blot wurde die Expression auf mRNA und Protein Ebene untersucht (3.1.2 und 3.2). In beiden Experimenten konnte gezeigt werden, dass Osteoactivin (DC-HIL) in dendritischen Zellen exprimiert wird, nicht jedoch in den Monozyten, aus denen sie hervorgegangen sind. Damit ist gezeigt, dass Osteoactivin (DC-HIL) differentiell in dendritischen Zellen exprimiert wird. Dies weist auf eine für die Funktionalität oder Entwicklung von dendritischen Zellen des Menschen spezifische Aufgabe des exprimierten Proteins hin.

4.2 Einfluss verschiedener Stimuli auf die Expression von Osteoactivin (DC-HIL)

Dendritische Zellen können durch verschiedene Zytokine und TLR-Liganden stimuliert und zur Ausreifung gebracht werden [8].

Mit Hilfe von RT-PCR und Western Blot wurde der Einfluss der Substanzen Pam3Cys (TLR2-Ligand), LPS (TLR4-Ligand), PolyI:C (TLR3-Ligand) und R848 (TLR-7 Ligand) auf die Expression des Genes Osteoactivin (DC-HIL) in aus Monozyten gewonnenen dendritischen Zellen untersucht. Dabei ergaben sich einander entsprechende Resultate sowohl für die Expression auf mRNA als auch auf Proteinebene. (3.1.3 und 3.2). Es zeigte sich jeweils eine verminderte Expression im Vergleich zu unreifen dendritischen Zellen nach Behandlung mit TLR-Liganden, auf Proteinebene gleichermaßen nach Behandlung mit allen genannten Substanzen, auf mRNA Ebene insbesondere nach Behandlung mit

LPS oder PolyI:C. Bemerkenswert ist dabei insbesondere die gute Korrelation der für die Expression auf mRNA und Proteinebene gewonnenen Befunde. Dies regte die Untersuchung der Expression auf mRNA-Ebene mit Hilfe von quantitativer RT-PCR an. Bei dieser ergaben sich ebenfalls gleichgerichtete Befunde. Hierdurch könnten zukünftige Experimente wesentlich erleichtert werden.

Die verminderte Expression nach Behandlung mit TLR-Liganden weist auf eine Funktion des exprimierten Proteins hin, die auf unreife dendritische Zellen beschränkt ist oder für diese eine größere Bedeutung besitzt. Dies steht gut im Einklang mit der Hypothese, dass es sich bei Osteoactivin (DC-HIL) um ein coinhibitorisches Molekül in der DC-T-Zell-Interaktion handelt, die aus den im Mausmodell gewonnen Befunden entwickelt wurde [24],[25].

Es muss jedoch bemerkt werden, dass bei anti-Osteoactivin-Sekundärfärbung keine wesentliche Veränderung der Oberflächenexpression von Osteoactivin (DC-HIL) nach Behandlung mit Pam3Cys beobachtet wurde. Der Einfluss auf die Oberflächenexpression bleibt unklar. Wahrscheinlich ist das Verfahren nicht sensibel genug um die Veränderungen durch TLR-Liganden Zugabe zu detektieren.

4.3 Einfluss inhibitorischer Substanzen auf die Expression von Osteoactivin (DC-HIL)

Neben der Wirkung von TLR-Liganden auf die Expression von Osteoactivin(DC-HIL) in dendritischen Zellen des Menschen wurden auch der Einfluss der inhibitorisch wirkenden Substanzen IL10 und Imatinib (STI571) untersucht.

Imatinib (STI571) ist ein kompetitiver Inhibitor der Bcr-Abl Tyrosinkinase. Mit dieser Substanz werden erfolgreich die chronisch myeloische Leukämie (CML) und gastrointestinale Stromatumoren (GIST) behandelt. Neben der Hemmung der Bcr-Abl-Kinase zeigt Imatinib (STI571) auch Aktivität gegenüber *platelet-derived growth factor receptor* (PDGF-R), *c-Kit*, *Abl-related gene* (ARG) und ihre Fusionsproteine. Behandlung von dendritischen Zellen mit Imatinib (STI571) führt zur verminderten Expression CD1a, CD83, HLA-DR, CD80 und

CD40. Auch ist die Fähigkeit zur Induktion von primären zytotoxischen T-Lymphozyten-Antworten (CTL) vermindert [6].

In der Gegenwart von IL-10 entwickeln sich Monozyten nicht vollständig zu dendritischen Zellen. Sie exprimieren niedrigere Level des MHC Klasse II Moleküls und des CD1a. Die behandelten Zellen zeigen Ähnlichkeit zu Makrophagen und exprimieren CD14, CD16 und CD68 [5].

Die Untersuchung der mit STI571 (Imatinib) und IL10 behandelten aus Monozyten generierten dendritischen Zellen zeigt eine stark erhöhte Expression von Osteoactivin (DC-HIL) sowohl auf Transkriptions- als auch Translationsebene sowie in der Oberflächenexpression. Auch diese Wirkung der immuoinhibitorischen Substanzen auf dendritische Zellen steht gut im Einklang mit der Hypothese von Osteoactivin (DC-HIL) als coinhibitorischem Molekül.

Andererseits wurde festgestellt, dass eine wesentliche Steigerung der Expression nur nach Zugabe von IL10 ab Tag 0 zu beobachten ist. Die physiologische Bedeutung der IL 10-Wirkung bleibt daher unklar.

4.4 Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in Lymphozyten und dendritischen Zellen des peripheren Blutes

In 3.3.2 wurde die Expression von Osteoactivin (DC-HIL) in aus buffy coats isolierten Lymphozyten und dendritischen Zellen des peripheren Blutes bzw. deren BDCA1+ und BDCA2+ Subpopulation untersucht.

Es konnte festgestellt werden, dass Osteoactivin nicht in Lymphozyten exprimiert wird, was die These einer spezifischen Funktion in dendritischen Zellen stützt. Es wurde jedoch auch nur minimale Expression in dendritischen Zellen des peripheren Blutes gezeigt.

Das bedeutet jedoch nicht, dass die Hypothese der differentiellen Expression in dendritischen Zellen zu verwerfen ist. Es muss bedacht werden, dass die dendritischen Zellen des peripheren Blutes, auch wenn es sich um die am einfachsten zugängliche Population von dendritischen Zellen des Menschen

handelt, nur Vorstufen der funktionellen dendritischen Zellen des Gewebes sind. Man glaubt, dass die aus Monozyten gewonnenen unreifen dendritischen Zellen am ehesten dem Zustand der unreifen dendritischen Zellen im Gewebe entsprechen. Daher könnten die gewonnenen Befunde auch auf einen Unterschied in der Expression zwischen Precursoren des Blutes und dendritischen Zellen des Gewebes hinweisen.

Auch bleibt daran zu erinnern, dass die gewonnenen Befunde auf eine Regulation der Expression von Osteoactivin(DC-HIL) durch IL 10 hinweisen können. Die dendritischen Zellen des peripheren Blutes müssen nicht notwendigerweise mit ausreichenden Mengen IL 10 in Kontakt gekommen sein, um eine deutliche Expression zu erlauben.

5. Zusammenfassung

Dendritische Zellen sind die effektivsten Antigen präsentierenden Zellen des Organismus und nehmen in dieser Funktion eine zentrale Rolle bei der Induktion von spezifischen Immunantworten ein. Diese besondere Stellung im Immunsystem macht sie wichtig für das Verständnis von Reaktionen des adaptiven Immunsystems aber auch interessant für die Entwicklung therapeutischer Ansätze, insbesondere in der Onkologie. Ein verbessertes Verständnis der Immunbiologie von dendritische Zellen könnte daher in der Zukunft zur Verbesserung solcher Prozeduren beitragen. Diese Arbeit ist daher der Suche solcher Moleküle gewidmet, die spezifische Funktionen und Mechanismen dendritischer Zellen vermitteln.

Die Entschlüsselung des menschlichen Genoms und die Methode der cDNA-Subtraktion ermöglichen heute, solche Gene zu identifizieren, die differentiell in dendritischen Zellen exprimiert werden und daher als Kandidaten für spezifische Funktionsträger in Frage kommen.

In der vorliegenden Arbeit wurde die differentielle Expression und das Expressionsmuster des Oberflächenproteins Osteoactivin (GPNMB) in menschlichen dendritischen Zellen untersucht. Es handelt sich dabei um ein Typ I transmembranöses Glyoprotein, von dem aus dem Mausmodell bekannt ist, dass es als negativer Regulator von T-Lymphozyten und Makrophagen wirkt. Es wurde deshalb die Hypothese aufgestellt, dass es auch im Menschen eine immunoinhibitorische Wirkung entfalten könnte.

Mit Hilfe von RT-PCR und Western Blot konnte gezeigt werden, dass Osteoactivin differentiell in dendritischen Zellen des Menschen exprimiert wird. Auch wurde festgestellt, dass Behandlung mit TLR-Liganden zu einer verminderten Expression, Behandlung mit STI571 oder IL10 jedoch zu einer gesteigerten Expression führt, wobei Ergebnisse aus der RT-PCR und dem Western Blot jeweils sehr gut mit einander korrelieren. Auch mit Hilfe von anti-Osteoactivin-FACS-Sekundärfärbung konnten der Einfluss der immunoinhibitorischen Substanzen gezeigt werden. Diese Ergebnisse stützen

die These von Osteoactivin (DC-HIL) als coinhibitorisch wirkendem Protein in dendritischen Zellen.

Auch in Lymphozyten konnte keine Expression festgestellt werden, was weiter die differentielle Expression bekräftigt. In dendritischen Zellen des peripheren Blutes konnte nur minimale Expression festgestellt werden, was eventuell auf den Charakter als Vorläuferzellen und die mangelnde Stimulation mit IL10 zurückgeführt werden kann.

Beim Osteoactivin handelt es sich daher in der Gesamtschau um ein differentiell in dendritischen Zellen exprimiertes Gen mit hypothetisch immunoinhibitorischer Funktion, das zur näheren Charakterisierung herangezogen werden kann.

Literaturverzeichnis

- [1] Adams S, O'Neill DW, Bhardwaj N. Recent advances in dendritic cell biology. *J Clin Immunol.* 2005; 25:177-188.
- [2] Albert ML, Pearce SF, Francisco LM, Sauter B, Roy P, Silverstein RL, Bhardwaj N. Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha\beta 5$ and CD36, and cross-present antigens to cytotoxic T lymphocytes. *J Exp Med* 1998 ;188:1359-1368.
- [3] Albert ML, Sauter B, Bhardwaj N. Dendritic cells acquire antigen from apoptotic cells and induce class I-restricted CTLs. *Nature* 1998; 392:86-89.
- [4] Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A. IL-10 prevents the generation of dendritic cells from CD14+ blood monocytes, promotes the differentiation to mature macrophages and stimulates endocytosis of FITC-dextran. *Adv Exp Med Biol* 1997; 417:323-327.
- [5] Allavena P, Piemonti L, Longoni D, Bernasconi S, Stoppacciaro A, Ruco L, Mantovani A. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol* 1998; 28:359-369.
- [6] Appel S, Boehmler AM, Grünebach F, Müller MR, Rupf A, Weck MM, Hartmann U, Reichardt VL, Kanz L, Brümendorf TH, Brossart P. Imatinib mesylate affects the development and function of dendritic cells generated from CD34+ peripheral blood progenitor cells. *Blood* 2004 ; 103:1966-1967.
- [7] Ardavín C, Martínez del Hoyo G, Martín P, Anjuère F, Arias CF, Marín AR, Ruiz S, Parrillas V, Hernández H. Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol.* 2001; 22:691-700.
- [8] Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2000;18:767-811.
- [9] Banchereau J, Schuler-Thurner B, Palucka AK, Schuler G. Dendritic cells as vectors for therapy. *Cell* 2001; 106:271-274.
- [10] Bevan M J: Antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes in vivo. *J Exp Med* 1995, 182:639-641.

[11] Bhattacharyya S, Sen P, Wallet M, Long B, Baldwin AS Jr, Tisch R. Immunoregulation of dendritic cells by IL-10 is mediated through suppression of the PI3K/Akt pathway and of I κ B kinase activity. *Blood* 2004;104:1100-1109.

[12] Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM. Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8 + T cell tolerance. *J Exp Med* 2002;196:1627—1638.

[13] Brocker T, Riedinger M, Karjalainen K. Targeted expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but not positive selection of thymocytes in vivo. *J. Exp. Med* 1997. 185, 541–550.

[14] Brossart P, Grunebach F, Stuhler G, Reichardt VL, Möhle R, Kanz L, Brugger W. Generation of functional human dendritic cells from adherent peripheral blood monocytes by CD40 ligation in the absence of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood* 1998; 92:4238-4247.

[15] Brossart P, Bevan MJ. Presentation of exogenous protein antigens on major histocompatibility complex class I molecules by dendritic cells: pathway of presentation and regulation by cytokines. *Blood* 1997; 90:1594-1599.

[16] Brossart P, Wirths S, Brugger W, Kanz L. Dendritic cells in cancer vaccines. *Exp Hematol* 2001; 29:1247-1255.

[17] Brossart P, Zobywalski A, Grunebach F, Behnke L, Stuhler G, Reichardt VL, Kanz L, Brugger W. Tumor necrosis factor alpha and CD40 ligand antagonize the inhibitory effects of interleukin 10 on T-cell stimulatory capacity of dendritic cells. *Cancer Res* 2000; 60:4485-4492.

[18] Buelens C, Verhasselt V, De Groote D, Thielemans K, Goldman M, Willems F. Interleukin-10 prevents the generation of dendritic cells from human peripheral blood mononuclear cells cultured with interleukin-4 and granulocyte/macrophage-colony-stimulating factor. *Eur J Immunol* 1997; 27:756-762.

[19] Burns S, Thrasher AJ, Blundell MP, Machesky L, Jones GE. Configuration of human dendritic cell cytoskeleton by Rho GTPases, the WAS protein and differentiation. *Blood* 2001; 98:1142–1149.

[20] Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Dubois B, Durand I, Cella M, Lanzavecchia A, Banchereau J. CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor plus tumor necrosis factor α . *Blood* 1997; 90:1458–1470.

- [21] Cella M; Sallusto F; Lanzavecchia A. Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells. *Curr. Opin. Immunol.* 1997; 9:10-16.
- [22] Cerundolo V, Hermans IF, Salio M. Dendritic cells: a journey from laboratory to clinic. *Nat Immunol* 2004; 5:7-10.
- [23] Chapius F, Rosenzweig M, Yagello M, Ekman M, Biberfeld P, Gluckman JC . Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur J Immunol* 1997; 27:431-441.
- [24] Chung JS, Dougherty I, Cruz PD Jr, Ariizumi K. Syndecan-4 mediates the coinhibitory function of DC-HIL on T cell activation. *J Immunol.* 2007; 179:5778-5784.
- [25] Chung JS, Sato K, Dougherty II, Cruz PD Jr, Ariizumi K. DC-HIL is a negative regulator of T lymphocyte activation. *Blood.* 2007; 109:4320-4327.
- [26] Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, Cella M, Lande R, Uze G. Viral infection and Toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and lambda interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 2004;34:796-805.
- [27] Cohen PL, Caricchio R, Abraham V, Camenisch TD, Jennette JC, Roubey RA, Earp HS, Matsushima G, Reap EA. Delayed apoptotic cell clearance and lupus-like autoimmunity in mice lacking the c-mer membrane tyrosine kinase. *J Exp Med* 2002; 196:135-140.
- [28] Croft M. Co-stimulatory members of the TNFR family: Keys to effective T-cell immunity? *Nat Rev Immunol* 2003; 3:609–620.
- [29] Davis DM, Dustin ML. What is the importance of the immunological synapse? *Trends Immunol* 2004; 25:323–327.
- [30] de Waal MR, Abrams J, Bennett B, Figdor CG, de Vries JE. Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med* 1991; 174:1209-1220.
- [31] de Waal MR, Yssel H, Roncarolo MG, Spits H, de Vries JE. Interleukin-10. *Curr Opin Immunol* 1992; 4:314-320.
- [32] Dhodapkar MV, Krasovsky J, Steinman RM, Bhardwaj N. Mature dendritic cells boost functionally superior CD8+ T-cell in humans without foreign helper epitopes. *J Clin Invest* 2000; 105:R9-R14.
- [33] Dhodapkar MV, Steinmann RM, Krasovsky J, Munz C, Bhardwaj N. Antigen-specific inhibition of effector T cell function in humans after injection of immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001;193:233-238.

- [34] Dilioglou S, Cruse JM, Lewis RE. Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. *Exp Mol Pathol* 2003; 75:217–227.
- [35] Dustin ML, Cooper JA. The immunological synapse and the actin cytoskeleton: molecular hardware for T cell signaling. *Nat Immunol* 2000; 1:23–29.
- [36] Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck D, Schmitz J. BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 2000; 165: 6037-6046.
- [37] Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI. Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* 1993; 151:2390-2398.
- [38] Fallarino F, Grohmann U, Hwang KW, Orabona C, Vacca C, Bianchi R, Belladonna ML, Fioretti MC, Alegre ML, Puccetti P. Modulation of tryptophan catabolism by regulatory T cells. *Nat Immunol* 2003; 4:1206–1212.
- [39] Ferlazzo G, Tsang ML, Moretta L, Melioli G, Steinman RM, Munz C. Human dendritic cells activate resting natural killer (NK) cells and are recognized via the NKp30 receptor by activated NK cells. *J Exp Med* 2002; 195:343–351.
- [40] Figdor CG, de Vries IJ, Lesterhuis WJ, Melief CJ. Dendritic cell immunotherapy: mapping the way. *Nat Med* 2004; 10:475-480.
- [41] Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 1991; 146:3444-3451.
- [42] Garrett WS, Chen LM, Kroschewski R, Ebersold M, Turley S, Trombetta S, Galan JB, Mellman I. Developmental control of endocytosis in dendritic cells by Cdc42. *Cell* 2000; 102:325–334.
- [43] Gruenebach F, Weck MM, Reichert J, Brossart P. Molecular and functional characterization of human Dectin-1. *Exp Hematol* 2002; 30:1309-1315.
- [44] Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:621–667.
- [45] Haralanova-Ilieva B, Ramadori G, Armbrust T. Expression of osteoactivin in rat and human liver and isolated rat liver cells. *J Hepatol*. 2005; 42:565-572.

[46] Hoentjen F, Sartor RB, Ozaki M, Jobin C. STAT3 regulates NF-kappaB recruitment to the IL-12p40 promoter in dendritic cells. *Blood* 2005;105:689-696.

[47] Ito T, Wang YH, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cell precursors/type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR) 7 and TLR9. *Springer Semin Immunopathol* 2005; 26:221-229.

[48] Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M. *Immunobiology*, 6th Edition, Garland Science Publishing, New York, 2005.

[49] Jegou G, Palucka AK, Blanck JP, Chalouni C, Pascual V, Banchereau J. Plasmacytoid dendritic cells induce cell differentiation through type I interferon and interleukin 6. *Immunity* 2003; 19:225-234.

[50] Jenne L, Arrighi JF, Jonuleit H, Saurat JH, Hauser C. Dendritic cells containing apoptotic melanoma cells prime human CD8+ T cells for efficient tumor cell lysis. *Cancer Res* 2000; 60:4446-4452.

[51] Jonuleit H, Giesecke-Tuettenberg A, Tuetting T, Thurner-Schuler B, Stuge TB, Paragnik L, Kandemir A, Lee PP, Schuler G, Knop J, Enk AH. A comparison of two types of dendritic cells as adjuvants for the induction of melanoma-specific T-cell responses in humans following intranodal injection. *Int J Cancer* 2001; 93:243-251.

[52] Joyce S, Van Kaer L. CD 1-restricted antigen presentation: An oily matter. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:95–104.

[53] Katz SI, Tamaki K, Sachs DH.. Epidermal Langerhans cells are derived from cells originating in bone marrow. *Nature* 1979; 282: 324–326.

[54] Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kämpgen E, Romani N, Schuler G. High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10 (published erratum appears in *J Exp Med* 1996;184:1590f). *J Exp Med* 1996; 184:741-746.

[55] Kretschmer K, Apostolou I, Hawiger D, Khazaie K, Nussenzweig MC, von Boehmer H. Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen. *Nat Immunol* 2005; 6: 1219—1227.

[56] Kuan CT, Wakiya K, Dowell JM, Herndon JE 2nd, Reardon DA, Graner MW, Riggins GJ, Wikstrand CJ, Bigner DD. Glycoprotein nonmetastatic melanoma protein B, a potential molecular therapeutic target in patients with glioblastoma multiforme. *Clin Cancer Res*. 2006; 12:1970-1982.

- [57] Kurts C, Heath WR, Carbone FR Allison J, Miller JF, Kosaka H. Constitutive class I - restricted exogenous presentation of self antigens in vivo. *J Exp Med* 1996; 184:923-930.
- [58] Lamzavecchia A, Sallusto F. Regulation of T cell immunity by dendritic cells. *Cell* 2001; 106:263-266.
- [59] Langerhans, P. 1868. Über die Nerven der menschlichen Haut. *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für Klinische Medizin*. Berlin. 44: 325–337.
- [60] Lechmann M, Berechtold S, Hauber J Steinkasserer A. CD83 on dendritic cells: more than just a marker of maturation. *Trends Immunol* 2002; 23:273-275.
- [61] Li MO, Sarkisian MR, Mehal WZ, Rakic P, Flavell RA. Phosphatidylserine receptor is required for clearance of apoptotic cells. *Science* 2003; 302:1560-1563.
- [62] Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu. Rev. Immunol* 2005. 23: 275-306.
- [63] Mahnke K, Johnson TS, Ring S, Enk AH. Tolerogenic dendritic cells and regulatory T cells: a two-way relationship. *J Dermatol Sci*. 2007; 46:159-167.
- [64] Mahnke K, Qian Y, Knop J, Enk AH. Induction of CD4+/CD25+ regulatory T cells by targeting of antigens to immature dendritic cells. *Blood* 2003;101:4862—4869.
- [65] Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biology* 2002; 80:477-483.
- [66] Manavalan JS, Rossi PC, Vlad G, Piazza F, Yamilina A, Cortesini R, Mancini D, Suci-Foca N. High expression of ILT3 and ILT4 is a general feature of tolerogenic dendritic cells. *Transpl Immunol* 2003; 11:245-258.
- [67] Matzinger P. Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol* 1994; 12:991—1045.
- [68] McKenna K, Beignon AS, Bhardwaj N. Plasmacytoid Dendritic Cells: Linking Innate and Adaptive Immunity. *J Virol*. 2005; 79: 17–27.
- [69] Medzhitov R. Toll-like receptors and innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2001; 1:135—145.

[70] Mellor AL, Baban B, Chandler P, Marshall B, Jhaver K, Hansen A, Koni PA, Iwashima M, Munn DH. Cutting edge: Induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol* 2003; 171:1652–1655.

[71] Mo JS, Anderson MG, Gregory M, Smith RS, Savinova OV, Serreze DV, Ksander BR, Streilein JW, John SW. By altering ocular immune privilege, bone marrow-derived cells pathogenically contribute to DBA/2J pigmentary glaucoma. *J Exp Med*. 2003;197:1335-1344.

[72] Moody DB, Porcelli SA. Intracellular pathways of CD1 antigen presentation. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:11–22.

[73] Mueller G, Mueller A, Tueting T, Steinbrink K, Saloga J, Szalma C, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated dendritic cells modulate immune responses of naive and sensitized T cells in vivo. *J Invest Dermatol* 2002; 119:836-841.

[74] Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL, Jr., Mellor AL: Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science* 2002; 297:1867-1870.

[75] Nakamura A, Ishii A, Ohata C, Komurasaki T. Early induction of osteoactivin expression in rat renal tubular epithelial cells after unilateral ureteral obstruction. *Exp Toxicol Pathol*. 2007; 59:53-59.

[76] Nencioni A, Grunebach F, Zobywalski A, Denzlinger C, Brugger W, Brossart P. Dendritic cell immunogenicity is regulated by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *J Immunol* 2002; 169:1228-1235.

[77] Nencioni A, Brossart P. Cellular immunotherapy with dendritic cells in cancer: current status. *Stem Cells*. 2004; 22:501-513.

[78] Nolan KF, Strong V, Soler D, Fairchild PJ, Cobbold SP, Croxton R, Gonzalo JA, Rubio A, Wells M, Waldmann H. IL-10-conditioned dendritic cells, decommissioned for recruitment of adaptive immunity, elicit innate inflammatory gene products in response to danger signals. *J Immunol* 2004;172:2201-2209.

[79] Ogawa T, Nikawa T, Furochi H, Kosyogi M, Hirasaka K, Suzue N, Sairyo K, Nakano S, Yamaoka T, Itakura M, Kishi K, Yasui N. Osteoactivin upregulates expression of MMP-3 and MMP-9 in fibroblasts infiltrated into denervated skeletal muscle in mice. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2005; 289:C697-707.

[80] Onaga M, Ido A, Hasuike S, Uto H, Moriuchi A, Nagata K, Hori T, Hayash K, Tsubouchi H. Osteoactivin expressed during cirrhosis development in rats fed a choline-deficient, L-amino acid-defined diet, accelerates motility of hepatoma cells. *J Hepatol*. 2003; 39:779-785.

- [81] Peiser L, Mukhopadhyay S, Gordon S. Scavenger receptors in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2002; 14:123–128.
- [82] Probst HC, Lagnel J, Kollias G, van den Broek M. Inducible transgenic mice reveal resting dendritic cells as potent inducers of CD8⁺ T cell tolerance. *Immunity* 2003; 18:713–720.
- [83] Qin Z, Noffz G, Mohaupt M, Blankenstein T. Interleukin-10 prevents dendritic cell accumulation and vaccination with granulocyte- macrophage colony-stimulating factor gene-modified tumor cells. *J Immunol* 1997; 159:770-776.
- [84] Rich JN, Shi Q, Hjelmeland M, Cummings TJ, Kuan CT, Bigner DD, Counter CM, Wang XF. Bone-related genes expressed in advanced malignancies induce invasion and metastasis in a genetically defined human cancer model. *J Biol Chem*. 2003; 278:15951-15957.
- [85] Ripoll VM, Irvine KM, Ravasi T, Sweet MJ, Hume DA. Gpnmb is induced in macrophages by IFN-gamma and lipopolysaccharide and acts as a feedback regulator of proinflammatory responses. *J Immunol*. 2007; 178:6557-6566.
- [86] Rogers PR, Song J, Gramaglia I, Killeen N, Croft M. OX40 promotes Bcl-xL and Bcl-2 expression and is essential for long-term survival of CD4 T cells. *Immunity* 2001; 15:445–455.
- [87] Rose AA, Pepin F, Russo C, Abou Khalil JE, Hallett M, Siegel PM. Osteoactivin promotes breast cancer metastasis to bone. *Mol Cancer Res*. 2007; 5:1001-1014.
- [88] Rossi M, Young JW. Human dendritic cells: potent antigen-presenting cells at the crossroads of innate and adaptive immunity. *J Immunol*. 2005; 175:1373-1381.
- [89] Safadi FF, Xu J, Smock SL, Rico MC, Owen TA, Popoff SN. Cloning and characterization of osteoactivin, a novel cDNA expressed in osteoblasts. *J Cell Biochem*. 2001; 84:12-26.
- [90] Sallusto F, Celia M, Danieli C, Lanzavecchia A: Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products [see comments]. *J Exp Med* 1995; 182:389-400.
- [91] Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994;179:1109-1118.

[92] Sato K, Fujita S. Dendritic cells: nature and classification. *Allergol Int.* 2007; 56(3):183-191.

[93] Scheduling S, Kratz-Albers K, Meister B, Brugger W, Kanz L. Ex vivo expansion of hematopoietic progenitor cells for clinical use. *Semin Hematol* 1998; 35:232-240.

[94] Schuler G, Schuler-Thurner B, Steinman RM. The use of dendritic cells in cancer immunotherapy. *Curr Opin Immunol* 2003; 15:138-147.

[95] Selim AA, Abdelmagid SM, Kanaan RA, Smock SL, Owen TA, Popoff SN, Safadi FF. Anti-osteostatin antibody inhibits osteoblast differentiation and function in vitro. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr* 2003; 13:265–275.

[96] Shikano S, Bonkobara M, Zukas PK, Ariizumi K. Molecular cloning of a dendritic cell-associated transmembrane protein, DC-HIL, that promotes RGD-dependent adhesion of endothelial cells through recognition of heparan sulfate proteoglycans. *J Biol Chem.* 2001; 276:8125-8134.

[97] Steinbrink K, Graulich E, Kubsch S, Knop J, Enk AH. CD4(+) and CD8(+) anergic T cells induced by interleukin-10-treated human dendritic cells display antigen-specific suppressor activity. *Blood* 2002; 99:2468—2476.

[98] Steinbrink K, Jonuleit H, Mueller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8+ T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 1999. 93:1634-1642

[99] Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997; 159:4772-4780.

[100] Steinman RM, Cohn ZA. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med* 1973; 137:1142-1162.

[101] Steinman RM, Turley S, Mellman I, Inaba K. The induction of tolerance by dendritic cells that have captured apoptotic cells. *J Exp Med* 2000; 191:411-416.

[102] Steinmann RM, Hawiger D, Nussenzweig MC. Tolerogenic dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2003; 21:685-711.

[103] Steinmann RM, Nussenzweig MC. Avoiding horro autotoxicus: the impotence of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 169:1228-1235.

[104] Swetman, CA, Leverrier Y, Garg R, Gan CH, Ridley AJ, Katz DR, Chain BM. Extension, retraction and contraction in the formation of a dendritic cell dendrite: distinct roles for Rho GTPases. *Eur. J. Immunol.* 2002; 32:2074–2083.

[105] Traver D, Akashi K, Manz M, Merad M, Miyamoto T, Engleman EG, Weissman IL. Development of CD8⁺-positive dendritic cells from a common myeloid progenitor. *Science* 2000; 290:2152–2154.

[106] Tse KF, Jeffers M, Pollack VA, McCabe DA, Shadish ML, Khramtsov NV, Hackett CS, Shenoy SG, Kuang B, Boldog FL, MacDougall JR, Rastelli L, Herrmann J, Gallo M, Gazit-Bornstein G, Senter PD, Meyer DL, Lichenstein HS, LaRochelle WJ. CR011, a fully human monoclonal antibody-auristatin E conjugate, for the treatment of melanoma. *Clin Cancer Res.* 2006; 12:1373-1382.

[107] Von Herrath MG, Harrison LC. Antigen-induced regulatory T cells in autoimmunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3:223-232.

[108] Wallet MA, Sen P, Tisch R. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res.* 2005; 3:166-175.

[109] West MA, Prescott AR, Eskelinen EL, Ridley AJ, Watts C. Rac is required for constitutive macropinocytosis by dendritic cells but does not control its downregulation. *Curr. Biol.* 2000; 10:839–848.(87)

[110] Wu L, D'Amico A, Winkel KD, Suter M, Lo D, Shortman K. RelB is essential for the development of myeloid-related CD8 α - dendritic cells but not of lymphoid-related CD8 α ⁺ dendritic cells. *Immunity* 1998; 9:839-847.

[111] Wu L, Liu YJ. Development of dendritic-cell lineages. *Immunity* 2007; 26:741-750.

[112] Wu L, Nichogiannopoulou A, Shortman K, Georgopoulos K. Cell-autonomous defects in dendritic cell populations of Ikaros mutant mice point to a developmental relationship with the lymphoid lineage. *Immunity* 1997; 7:483-492.

[113] www.expasy.org

[114] www.ncbi.nlm.nih.gov

[115] Yang AS, Lattime EC. Tumor-induced interleukin 10 suppresses the ability of splenic dendritic cells to stimulate CD4 and CD8 T-cell responses. *Cancer Res* 2003; 63:2150-2157.

Danksagung

Danken möchte ich ...

... Herrn Prof. Dr. med Brossart für die Auswahl der Thematik, der Ermöglichung dieser Arbeit und die kompetente Betreuung.

... Herrn PD Dr. rer. nat. Grünebach für die ausgezeichnete Unterstützung, Anleitung und Beratung in allen wissenschaftlichen Fragen.

... Meiner Kollegin Julia für die gute Zusammenarbeit und gegenseitige Unterstützung.

... Anita Bringmann, Stefanie Held und allen anderen Mitarbeitern der AG Brossart für Beratung und tatkräftige Unterstützung sowie das angenehme Arbeitsumfeld.

... Sylvia, Solveig und Regina für die Unterstützung, Anleitung und Hilfe bei der praktischen Durchführung der Versuche.

... Meinen Eltern für alles, was sie mir mit auf meinen Weg gegeben haben.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Mark-Alexander Schwarzbich

Geburtsdatum: 10.09.1983

Geburtsort: Ludwigsburg

Schulbildung

1990-1994 Grundschule „Neckarschule“, Remseck

1994-2003 Lise-Meitner-Gymnasium, Remseck

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife mit der Note 1,0
ausgezeichnet mit dem Ferry Porsche Preis für herausragende
Leistungen in der Leistungskurskombination Mathematik und
Physik, dem Buchpreis und einjähriger Ehrenmitgliedschaft in der
Deutschen Physikalischen Gesellschaft (DPG) für herausragende
Leistungen im Fach Physik und dem Schulpreis für herausragende
Leistungen im Fach Mathematik

Auslandsaufenthalte

2000 Schüleraustausch mit Grand Forks, North Dakota, USA

Hochschulbildung

2003 Beginn des Medizinstudiums an der Eberhard-Karls-
Universität Tübingen

2005 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung Note 1,0

16.11.2010 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Praktika

2007 Famulatur Innere Medizin, Praxis in Ludwigsburg

2007 Famulatur Hämatologie/Onkologie, Universitätsklinikum Tübingen

2007 Famulatur Rheumatologie, Universitätsklinikum Tübingen

2008 Famulatur Innere Medizin, Ambulanz des U.S. Army Hospitals,
Heidelberg

Stipendien

2004 Studienstiftung des Deutschen Volkes

2007-2008 Mitglied des Graduiertenkollegs „Zellbiologische Mechanismen
Immunassoziierter Prozesse“