

Aus der Hautklinik
der Heinrich-Heine Universität Düsseldorf

Direktor: Prof. Dr. Dr. h.c. Thomas Ruzicka

**Regulation der Mediatorfreisetzung
von dendritischen Zellen:
Bedeutung für die Immunpathogenese
des atopischen Ekzems**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Michaela Ostendorf

2005

**Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf**

Gez. Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. dent. Wolfgang H.-M. Raab

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. Markus Grewe

Korreferent: Univ.-Prof. Dr. med. Jean Krutmann

Meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung	7
1.1.	Dendritische Zellen (DC) und ihre Aufgabe im Abwehrsystem der Haut	7
1.2	Pathomechanismus der allergischen Soforttypreaktion	10
1.3	Prostanoid-Produktion von humanen, aus Blut gewonnenen DC	11
1.3.1.	Prostanoide	12
1.3.2.	Prostanoide: Wirkung und Herkunft	14
2.	Fragestellung	15
3.	Material und Methoden	17
3.1.	Material	17
3.1.1.	Zubehör	17
3.1.2.	Geräte	17
3.1.3.	Chemikalien	18
3.2.	Methoden	23
3.2.1	Präparation der DC	23
3.2.2.	Facs-Analyse	24
3.2.3.	Detektion von mRNA-Expression: RT-PCR	24
3.2.4.	Detektion von Protein-Expression: Westernblot	27
3.2.5.	Detektion von Protein-Expression: ELISA	30
3.2.6.	Hausstaubmilbenextrakt- und Wiesenlieschgraspollenverdünnungsreihe	31
3.2.7.	UV-Bestrahlung	32
4.	Ergebnisse	33
4.1.	Zellkulturanalyse mittels FACS	33
4.1.1.	Abb. FACS-Analyse	34
4.2.	Prostanoid-Produktion von DC	35
4.2.1	Abb. PGE2-Synthese von DC	36
4.2.2.	Abb. TXB2-Synthese von DC	36
4.2.3.	Abb. PGD2-Synthese von DC	36
4.3.	UV-Zeitkinetik der COX-2-Expression und ihrer Syntheseprodukte TXB2 und PGE2	37
4.3.1.	Abb. COX-2 RT-PCR	38
4.3.2.	Abb. Western Blot COX-1 und COX-2	39
4.3.3.	Abb. Zeitkinetik der PGE2-Produktion in Abhängigkeit verschiedener Stimuli	40

4.3.4	Abb. Zeitkinetik der TXB2-Produktion in Abhängigkeit verschiedener Stimuli	41
4.4.	Prostanoid-Produktion von DC unter Stimulation von Hausstaubmilben- und Wiesenlieschgraspollenextrakten	42
4.4.1	Abb. Prostaglandin-Produktion von DC unter Stimulation mit Hausstaubmilbenextrakt	43
4.4.2.	Abb. Prostaglandin-Produktion von DC unter Stimulation mit Wiesenlieschgraspollenextrakt	43
4.4.3.	Abb. Thromboxan-Produktion von DC unter Stimulation mit Hausstaubmilbenextrakt	44
4.4.4.	Abb. Thromboxan-Produktion von DC unter Stimulation mit Wiesenlieschgraspollenextrakt	44
4.5.	Einfluss von TNF, IL-1 und ihrer Antikörper auf die Prostanoidproduktion von DC	45
4.5.1.	PGE2-Produktion von DC unter Stimulation mit LPS, TNFa-AK und IL-1 Rez. Typ1-AK	46
4.5.2.	TXB2-Produktion von DC unter Stimulation mit LPS, TNFa-AK und IL-1 Rez. Typ1-AK	46
4.6.	Expression von PGE2 und TXB2 unter Stimulation mit spezifischen Cyclooxygenase-Inhibitoren	47
4.6.1.	PGE2-Produktion mit spezifischem COX-1-Inhibitor Valerylsalicylsäure	49
4.6.2.	PGE2-Produktion mit spezifischem COX-2-Inhibitor NS 398	49
4.6.3.	TXB2-Produktion mit spezifischem COX-1-Inhibitor Valerylsalicylsäure	50
4.6.4.	TXB2-Produktion mit spezifischem COX 2-Inhibitor NS 398	50
4.6.5.	PGE2-Produktion mit Valerylsalicylsäure und NS 398	51
4.6.6.	TXB2-Produktion mit Valerylsalicylsäure und NS 398	51
4.7.	Expression von IL-12 und IL-10 nach Stimulation mit LPS bei Hausstaubmilben – präinkubierten DC	52
4.7.1.	IL-12 Produktion in prä-inkubierten DC	53
4.7.2.	IL-10 Produktion in prä-inkubierten DC	53
4.8.	Expression von IL-12p35 und p40 mRNA in Hausstaubmilben-stimulierten DC	54
4.8.1.	IL-12p35/p40 mRNA-Expression	55
4.9.	Einfluss von Prostanoiden auf die LPS induzierte IL-12 und IL-10 Expression	56
4.9.1.	Einfluss von Prostanoiden auf die LPS induzierte IL-12 und IL-10 Expression	57
	Vergleichende Untersuchungen von atopischen versus nicht atopischen DC	
4.10.	IL-10 und MCP-1 Expression unter LPS-Stimulation	58
4.10.1.	IL-10 Produktion von DC unter Stimulation von verschiedenen Konzentrationen an LPS	59
4.10.2.	MCP-1 Produktion von DC bei Stimulation von verschiedenen Konzentrationen an LPS	59

4.11.	MCP-1 Produktion von Hausstaubmilben- oder LPS-stimulierten DC unter dem Einfluß von IFN γ , IL-10 und anti-IL-10	60
4.11.1.	Stimulation mit IFN γ	62
4.11.2.	Stimulation mit IL-10	62
4.11.3.	Stimulation mit anti-IL-10-Antikörpern	62
5.	Ergebnisse	63
5.1.	Regulation der Prostanoidoide bei DC	63
5.2.	Effekte von Inhalationsallergenen auf Prostanoidoide und Zytokine	64
5.3.	Regulationsmechanismus von Atopikern versus Nicht-Atopikern	65
6.	Diskussion	67
7.	Zusammenfassung	74
8.	Literatur	76
9.	Danksagung	87
10.	Lebenslauf	88

1. Einführung

1.1. Dendritische Zellen und ihre Aufgabe im Abwehrsystem der Haut

Höhere Organismen benötigen ein intaktes Immunsystem, um eindringende Mikroorganismen (Viren, Bakterien, Pilze) zu bekämpfen und um bösartig veränderte Zellen zu eliminieren. Anatomisch ist die Haut die erste Barriere gegen das Eindringen von Fremdorganismen, ein Organ, welchem früher eine eher passive Abwehrrolle zugesprochen wurde. In den letzten zwei Jahrzehnten hat sich herausgestellt, dass gewisse Zellen zum Schutz der Haut eine Immunantwort initiieren. Diese Zellen wurden aufgrund ihrer Morphologie dendritische Zellen (DC) genannt; die in der Epidermis befindlichen nach ihrem Entdecker Paul Langerhans (1868) „Langerhans Zellen“ (LC) und die in der Dermis „dermale dendritische Zellen“ (DDC). LC sind eine migrationsfähige Zellpopulation mit einem relativ langsamen Zellzyklus (Krueger, 1982; Holt, 1994). Sie stammen von Vorläuferzellen aus dem Knochenmark ab und siedeln sich nach Zirkulation im Blut in der Haut an. Nach Erhalt entsprechender aktivierender Stimuli (z.B. Antigene) können sie die Haut verlassen und zu peripheren Lymphorganen wandern, wo sie eine T-Zellantwort initiieren können und anschließend ihren eigenen Zelltod veranlassen (Schuler, 1991; Schuler, 1997). In jedem Stadium ihrer Entwicklung wird der Phänotyp und die Funktion der LC von ihrer zellulären und molekularen Umgebung bestimmt. In der Haut sind die Keratinozyten die Hauptinteraktionspartner der LC. Keratinozyten sind in der Lage eine Reihe von Mediatoren einer Entzündungs- und Abwehrreaktion zu produzieren und zu sezernieren, wie z. B. Eikosanoide und Zytokine. Zu diesen Zytokinen gehören IL-1, IL-6, IL-7, IL-8 und andere Chemokine wie IL-10, IL-12, GM-CSF, Tumornekrosefaktor (TNF)- α sowie einige Faktoren, die das Wachstum von epithelialen und/oder mesenchymalen Zellen regulieren, z.B. TGF- α und β , PDGF und bFGF (Luger, 1996). Außer IL-1, IL-7 und TGF- β werden die meisten dieser Mediatoren nicht konstitutiv von Keratinozyten produziert, sondern nur nach Störung der epidermalen Homeostase, z.B. bei Hypoxie sowie bei chemischen (z.B. Allergene, Haptene) und physikalischen Reizungen (z.B. UV-Strahlung, Verletzung des Zellverbandes). Dies gilt auch für solche Zytokine (z.B. GM-CSF und TNF- α), welche zusammen mit IL-1- α phänotypische und funktionelle Veränderungen der LC-Population initiieren (Heufler, 1988). Ortsständige LC verfügen über eine unspezifische Esterase- und ATPase-Aktivität und sind die einzigen Zellen innerhalb der normalen Epidermis, die in der Lage sind, Fc-IgG Rezeptor Typ II, Fc-IgE Rezeptor Typ I, C3b Rezeptoren (CD11b, CD18) und MHC-II Antigene zu exprimieren. Nach Zytokinaktivierung verschwinden gewisse Merkmale langsam (z.B. Fc-

IgG Rezeptor Typ II, Fc-IgE Rezeptor Typ I, ATPase-Aktivität und „Birbeck Granulas“), während die Expression von anderen Molekülen hochreguliert wird z.B. MHC Klasse I und II, CD24, CD25, CD40, CD54, CD58, CD80, CD83 und CD86. Zytokin- und antigenaktivierte LC treten als Induktoren sowohl der primären als auch der sekundären MHC Klasse I oder II T-Zellantwort auf (Schuler, 1985; Schreiber, 1992; Kang, 1996).

DDC sind bevorzugt in den perivaskulären Gebieten des oberflächlichen Gefäßplexus der Haut beheimatet. Phänotypische Merkmale der DDC sind ATPase und unspezifische Esterase-Aktivitäten sowie die Expression von CD45, CD11b, CD36, Fc-IgE Rezeptor Typ I, MHC II Antigen und der Untereinheit A des Proenzym des Gerinnungsfaktors XIII (XIIIa). Sie exprimieren geringe Mengen von CD1a und sind CD14 und CD15 negativ (Lenz, 1993; Meunier, 1993). Ihre immunstimulatorische Kapazität ist ähnlich derjenigen von LC. Es wird angenommen, dass DDC Vorläufer-Zellen für LC darstellen. Von den Mechanismen, die zum gewebespezifischen „homing“ der Langerhans-Vorläufer-Zellen führen ist wenig bekannt, ebenso wenig wie das exakte Reifungsstadium, in welchem die LC in vivo in die Haut migrieren. Bisher ist nur bekannt, dass aus Monozyten gewonnene DC von RANTES, Makrophagen-inflammatorisches-Protein (MIP)-1, Monozyten-chemotaktisches-Protein (MCP)-1 und Makrophagen-Chemokine (MDC) chemotaktisch beeinflusst werden (Sozzani, 1995; Godiska, 1997; Xu, 1996).

Eine Störung des kutanen Systems führt zu phänotypischen und funktionellen Veränderungen in der LC-Population. Zum Beispiel erscheinen die LC 24h nach Kontaktsensibilisierung größer als normal, lassen sich mit CD1a -Antikörpern anfärben und sind um das vielfache potenter in ihrer T-Zellaktivierung als unbehandelte LC (Aiba, 1990; Aiba, 1991). Des Weiteren war es möglich, antigen-tragende LC oder DC nach Kontaktsensibilisierung in den drainierenden Lymphknoten zu finden und es konnte dort eine antigenspezifische T-Zellaktivierung durch diese Zellen nachgewiesen werden (Macatonia 1987; Silberberg-Sinakin, 1976).

Daher erscheint es wahrscheinlich, dass die Funktion der LC zwei Komponenten umfasst: Antigenaufnahme und Prozessieren von unreifen kutanen LC und, in den regionalen Lymphorganen, Antigenpräsentation von reifen LC aus der Haut.

LC in ihrem unreifen Stadium zeigen elektronenmikroskopische MHC Klasse II Moleküle sowohl in ihren zytoplasmatischen Vesikeln als auch in geringerem Ausmaß an der Zelloberfläche (Mommaas, 1995). Bestimmte parakrine und/oder autokrine Stimuli z.B. GM-CSF, TNF- α , IL-1 β und/oder die Bindung von CD40 induzieren eine vorübergehende Aufregulierung der MHC Klasse II Genprodukte in den DC (Cella, 1997; Sallusto, 1995). Es scheint, als

ob diese neu synthetisierten freien Bindungsstellen mit Peptiden externer Antigene beladen werden. Das nachfolgende Ausschleusen von peptid-beladenen MHC Klasse II Molekülen als stabile Dimere und die Herunterregulierung der Neusynthese MHC Klasse II Molekülen sind teilweise verantwortlich für die Umwandlung der DC vom Prozessieren zum Präsentieren. Die Reifung der DC ist von einer Aufregulation kostimulatorischer Moleküle wie z.B. CD54, CD58, CD80 und CD86 begleitet, ebenso wie von einer gesteigerten Sekretion von Effektor-T-Zell stimulierenden Zytokinen wie IL-12, während die Rezeptoren, die für die Antigen- / Allergen-Aufnahme zuständig sind (FcεRI, FcγRII), herunterreguliert werden (Steinmann, 1991).

Immunregulatorische Zytokine wie IL-10 (Enk, 1993; Enk, 1994; Ozawa, 1996; Steinbrink, 1997) können unreife DC in antigenpräsentierende verwandeln, die in der Lage sind T-Zellen zu tolerieren und vielleicht sogar regulatorische Suppressor-T-Zellen zu induzieren (Groux, 1997). Die Hypothese, dass solche Anpassungsmechanismen auch in vivo in der Haut vorkommen, scheint nicht abwegig, wenn man bedenkt, dass UV-exponierte Keratinozyten IL-10 produzieren und dass wachsende Metastasen von Melanomzellen dies ebenfalls tun. In der Tat sind Faktoren, die von Melanomzellen abstammen, in der Lage, tumorinfiltrierende DC in Tolerogene umzuwandeln und die haptenspezifische Toleranz, die durch UVB-Bestrahlung induziert wird, geht von dem keratinozytenproduzierten IL-10 aus (Enk, 1997; Niizeki, 1997). Die Rolle der DC ist offensichtlich bestimmt von ihrer zellulären und molekularen Zusammensetzung der Umgebung. Unter Bedingungen, die zur terminalen Reifung der DC oder LC führen, werden diese Zellen die Haut mit einem einzigartigen Immunüberwachungssystem, sowohl für exogene als auch für endogene Noxen, ausstatten. Andererseits führen reifungsinhibierende Stimuli dazu, dass die Haut vulnerabler gegen potentiell gefährliche Noxen ist, aber sie verhindern auch eine Überreaktion auf unschädliche Elemente wie z.B. Autoantigene oder bestimmte Haptene.

Die Mechanismen, die zur Aufrechterhaltung der Balance zwischen sensibilisierungs- und toleranzinduzierenden Signalen führen, sind der Schlüssel zur Rolle des Immunsystems der Haut in der Aufrechterhaltung der kutanen Homeostase.

1.2. Pathomechanismus der allergischen Soforttypreaktion

Die allergische Soforttypreaktion wird sowohl von der äußeren Umgebung als auch vom inneren Milieu bestimmt, die in Kombination zu allergischem Asthma, zu ganzjähriger oder saisonaler Rhinitis, zu allergischer Konjunktivitis und zur atopischen Dermatitis, im ungünstigsten Fall auch bis zur Anaphylaxie führen kann. Trotz der unterschiedlichen Zielorgane liegt den Erkrankungen ein gemeinsamer Triggermechanismus zugrunde – das Immunglobulin E (IgE). Obwohl das IgE auch im Serum gesunder Personen vorhanden ist, ist es bei den Personen erhöht, die allergische Erkrankungen aufweisen. Dieses IgE ist gegen spezifische, normalerweise harmlose Umweltantigene, gerichtet. Die genetisch determinierte Tendenz, allergen-spezifisches IgE zu entwickeln, nennt man Atopie.

Eine Person, die gegen ein Allergen sensibilisiert wurde, besitzt allergen-spezifische IgE Antikörper, die an Hochaffinitäts-IgE-Rezeptoren (FcεRI) an der Oberfläche von Mastzellen im Zielgewebe wie z.B. der Lunge oder Haut gebunden sind. Nach erneuter Exposition mit dem Allergen kommt es zum „bridging“ der rezeptorgebundenen IgE-Moleküle auf den sensibilisierten Mastzellen, was zur Mastzelldegranulation und zur Freisetzung von Mediatoren wie Histamin, Tryptase, Prostaglandinen und Leukotrienen führt. Diese Mediatoren verursachen eine vermehrte Permeabilität der Gefäße, lokale Ödeme und Juckreiz. Diese akute innerhalb von 10-20 Minuten auftretende Reaktion wird häufig gefolgt von einer Spätphasereaktion, die nach 6-12 Stunden ihren Höhepunkt hat. Während der Spätphaseantwort zeigt das allergen-exponierte Gewebe eine Infiltration, vor allem mit Eosinophilen und CD4 Helfer-(TH)-Zellen (Azzawi, 1992). Diese Zellen stehen nicht nur in Verdacht zur Hypersensibilität beizutragen, sondern auch zur Chronizität von Krankheiten per se (Zweiman, 1993).

Die Erkenntnis, dass in den Zielorganen allergischer Erkrankungen eine zugrundeliegende persistierende chronische Entzündung besteht, kam erst in den letzten 10 Jahren auf. Diese chronische allergische Entzündung ist durch die selben Zelltypen charakterisiert wie die Spätphasereaktion, wie z.B. Eosinophile (Bruijnzeel-Komen, 1988; Djukanovic, 1990) und CD4+T-Zellen (Frew, 1992; Poston, 1992; Metz, 1996). Beide Zelltypen befinden sich im aktivierten Zustand (Azzawi, 1990; Bradley, 1991; Wilson, 1992; Robinson, 1993). Während die aktivierten Eosinophilen wahrscheinlich zur Chronizität der Erkrankung beitragen, indem sie das Epithel und die epidermalen Barrieren zerstören, dirigieren die T-Zellen die chronische allergische Immunantwort. Neben der Feststellung, dass es sich um aktivierte T-Zellen handelt, stellte sich heraus, dass es sich hierbei vor allem um TH2 Phänotyp Zellen handelte (Wierenga, 1990; van Reijsen, 1992). TH2-Zellen sind bei den Menschen durch die Produktion von IL-3, -4, -5, -10 und -13 und niedrige, vernachlässigbare Dosen an Interferon-γ

charakterisiert. Dies sind auch die Zytokine, die an den Stellen der allergischen Erkrankungen exprimiert werden (Kapsenberg, 1991; Kay, 1991; Bentley, 1993).

1.3. Prostanoid-Produktion von humanen, aus dem Blut gewonnenen DC

Im Gegensatz zu der sehr gut analysierten Zytokinproduktion von DC, gibt es über Prostanoiden, eine wichtige Klasse von biologischen Immunmodifizierern, eher wenig Informationen. Die Prostanoidproduktion und -funktion wurde von verschiedenen Typen von Makrophagen beschrieben und die vielseitige Rolle von Prostanoiden in immunologischen und inflammatorischen Antworten ist sehr gut bekannt. Auf Zufallsbeobachtungen beruhende Hinweise deuten auf die Fähigkeit der DC, Prostanoiden zu synthetisieren hin: Immunhistochemische Studien der menschlichen Haut konnten die Präsenz von Enzymen zeigen, die notwendig sind für die Herstellung von Prostaglandinen (PG) D₂ und Thromboxanen in epidermalen DC; aber diese Untersuchungen konnten die Produktion derselben nicht nachweisen. Die seit Jahren praktizierte Methode Cyclooxygenaseinhibitoren, wie Indometacin, DC-Zellkulturen hinzuzugeben, weist auf die Fähigkeit der DC zur Prostanoidproduktion hin. Es weist auch darauf hin, dass diese Mediatoren eine autokrine Funktion besitzen. Es ist auch bekannt, dass insbesondere PGE₂ ein potenter Modulator für die Reifung der DC ist. Im Bezug auf diese Beobachtungen versucht diese Arbeit zu analysieren, ob DC in der Lage sind, Prostanoiden zu produzieren und wie die Produktion reguliert sein könnte. Zu diesem Zweck wurden humane, aus dem Blut gewonnene DC benutzt, weil diese bereits als sehr gut definiertes Zellmodell zur Analyse von DC-produzierten löslichen Mediatoren dienen (Dieter, 1994)

1.3.1. Prostanoid

Oxygenierte Derivate der mehrfach ungesättigten Fettsäure Arachidonsäure werden mit dem Sammelbegriff Eicosanoide bezeichnet. Diese biologisch hochaktiven Substanzen lassen sich in die zwei großen Untergruppen der Prostanoid und der Leukotriene aufteilen. Während die Leukotriene aus den durch die Lipoxygenasen gebildeten Hydroperoxyeikosatetraensäuren durch weitere enzymatisch kontrollierte Schritte gebildet werden, werden die Prostanoid repräsentiert durch die Prostaglandine und Thromboxane, durch den von Cyclooxygenasen (COX) eingeleiteten Stoffwechselweg biosynthetisiert. Die COX-1 wird konstitutiv in den meisten Geweben exprimiert, während die COX-2 eine induzierbare Form des Enzyms ist (Yokota, 1986; Hla, 1992; Chepenik, 1994; Crofford, 1994; Ristimäki, 1994).

Epidermale LC von Meerschweinchen sind in der Lage, über die Verstoffwechslung von Arachidonsäure große Mengen an PGD₂ zu produzieren und nur geringe Mengen an 12-HETE und anderen Prostanoiden (Ruzicka, 1987). In Vergleichsuntersuchungen von gesunden Probanden versus Probanden mit atopischer Dermatitis (AD) zeigte sich, dass nach Stimulation mit C5a und anti-IgE die Leukozyten der AD-Gruppe deutlich mehr Eicosanoide produzierten, was darauf hinweist, dass diese in der Pathogenese der AD möglicherweise eine Rolle spielen könnten. (Ruzicka, 1987). PGE₂ inhibiert die Produktion von IL-12 in Makrophagen, die durch Lipopolysaccharide (LPS) aktiviert wurden. In Abwesenheit von LPS ist PGE₂ jedoch dosisabhängig in der Lage, die Produktion von IL-12 in DC zu stimulieren. Alleine vermag PGE₂ nur gering IL-12 zu induzieren, in Kombination mit TNF jedoch zeigt sich ein synergistischer Effekt. TNF- α alleine hatte keinen Effekt auf die IL-12 Produktion. In Anwesenheit von LPS inhibierte PGE₂ die IL-12 Produktion in DC dosisabhängig. Die Kombination von PGE₂ und TNF- α regulierte die über den Mannose-Rezeptor laufende Endozytose der DC herunter und induzierte die Neuexpression von CD83 Antigen herauf. Zusätzlich wurde die Expression von verschiedenen Oberflächenantigenen wie die MHC-Klasse I und II Moleküle sowie andere kostimulatorischen Moleküle heraufreguliert (Knolle, 1998).

DC, die mit PGE₂ und TNF- α behandelt wurden, waren hochpotente Stimulatoren der T-Zell Proliferation. Diese Daten zeigen, dass PGE₂ zur Reifung von humanen DC beitragen kann und ein möglicher Regulator der IL-12 Produktion von humanen DC ist (Rieser, 1997). Erhöhte Gewebekonzentrationen von PGE₂ scheinen eine Th2-Immunantwort zu induzieren, in dem sie bei DC die IL-12 Produktion unterdrücken und in T-Helferzellen die Produktion von IL-4 und IL-5 fördern (Kalinski, 1997).

Analysen von B-Zellen aus Mäusemilzen zeigten, dass diese Hochaffinitätsrezeptoren für PGE₂ besitzen. Die Behandlung von normalen B-Zellen mit IL-4 erhöhte die Anzahl der PGE₂-Rezeptoren um ein 4-faches während die Affinität des Rezeptors langsam abnahm. Diese Ergebnisse sind eine Hinweis dafür, dass B-Lymphozyten-aktivierende Moleküle wie LPS und IL-4 die Sensitivität für PGE₂ erhöhen, indem sie die Anzahl der PGE₂-Rezeptoren hoch regulieren (Brown, 1995) (Maurer, 1995). In Mäusen haben Betz et al. (Betz, 1991) gezeigt, dass die IL-2 und IFN γ Produktion selektiv durch PGE₂ in T-Lymphozyten inhibiert werden kann, obwohl die IL-4 Produktion nicht betroffen ist und die IL-5 Produktion sogar dezent erhöht war. PGE₂ wird von einer großen Anzahl von Zell-Typen in den meisten Geweben produziert sowie von Monozyten im peripheren Blut. Zellaktivierung von Mitogenen, Endotoxinen, IFN oder Antigen-Antikörper-Komplexen erhöhen die PGE₂ Produktion (Goodwin, 1983). PGE₂ hat zahlreiche Funktionen im Immunsystem. Abgesehen von Inhibition von mitogen-stimulierten Mäusen und humanen T-Helferzell-Proliferation (Goodwin, 1983; Goodwin, 1977) und der Modulation der Zytokinproduktion in Maus-T-Zellen (Betz, 1991) inhibiert es die Produktion von IL-2 und TNF α von Maus-Makrophagen (Kunkel, 1986) und es supprimiert die humane Killerzell-Aktivität (Goto, 1983). Weiterhin gibt es sich häufende Hinweise, welche die Rolle des PGE₂ im „switchen“ der Immunglobuline zeigt (Phipps, 1991) und es wurde gezeigt, dass PGE₂ mit dem IL-4 synergisiert, was die Induktion der IGE Produktion bei mitogen-stimulierten B-Lymphozyten betrifft (Roper, 1990).

1.3.2. Prostanoid: Wirkung und Herkunft

Prostanoide	Wirkung	Herkunft
PGE2	Vasodilatation	Immunkompetente Zellen
	Bronchodilatation	Magen-und Darmmukosa
	Uteruskontraktion	Mesangialzellen der Niere
	Immunmodulation	Keratinocyten
	Entzündung	
	Hemmung der Säuresekretion (Magen)	
PGD2	T-Zellaktivierung	Makrophagen
	Schlaf-/Wachzyklus	Hypothalamus
PGF2a	Vasokonstriktion	Uterus
	Bronchokonstriktion	Granulozyten
	Uteruskontraktion	
	Diarrhoe	
	Entzündung	
PGI2	Vasodilatation	Gefäßendothelzellen
	Hemmung der Thrombozytenaggregation	
	Hemmung Säuresekretion (Magen)	
Thromboxan	Vasokonstriktion	Thrombozyten
	Bronchokonstriktion	Makrophagen
	Thrombozytenaggregation	Granulozyten

2. Fragestellung

Das atopische Ekzem beruht unter anderem auf einer angeborenen Fehlregulation des Immunsystems gegenüber Inhalations- und Nahrungsmittelallergenen, die zur Auslösung einer T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion in der Haut führt. In der vorliegenden Arbeit soll die Mediatorsynthese von antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (DC) und ihre mögliche Bedeutung für die T-Zell-Aktivierung untersucht werden. Diese Untersuchungen wurden an aus peripherem Blut differenzierten DC durchgeführt. Im Zentrum des Interesses stehen drei wichtige lösliche Mediatoren, die zum Einen für die Ausprägung eines Th1-Zytokinprofils verantwortlich sind (IL-12), zum Anderen wesentlich die Ausprägung eines Th2-Zytokinprofils mitbeeinflussen (IL-10, PGE₂). Es soll daher zunächst untersucht werden, inwieweit diese drei Mediatoren von dendritischen Zellen synthetisiert werden, wenn sie mit Inhalationsallergenen stimuliert werden. Hierbei sollen die Expression der Zytokine IL-10 und IL-12 auf mRNA Ebene mittels semiquantitativer RT-PCR und auf Proteinebene mittels ELISA-Messung aus dem Überstand von dendritischen Zellen untersucht werden. Die PGE₂-Freisetzung wird mittels ELISA untersucht. Es soll gezeigt werden, ob DC in der Lage sind, auf verschiedene Stimuli Prostaganoide selbstständig zu bilden, oder ob sie lediglich Zielzellen für Prostaganoide sind. Desweiteren soll geklärt werden, welche Cyclooxygenasen bei dieser Prostaganoideproduktion eine Rolle spielen. Es soll mit Hilfe der semiquantitativen RT-PCR und der Westernblotanalyse untersucht werden, ob eine Inhalationsallergenstimulation von dendritischen Zellen auch zur verstärkten Expression der Cox-2 führt.

Die Stimulation der dendritischen Zellen mit Inhalationsallergen erfolgt mit gereinigten Präparationen von Dermatophagoides pter. und Lieschgraspollen. Diese Präparationen werden von der Firma ALK-Scherax zur Verfügung gestellt. Für die genannten Untersuchungen ist es wichtig, daß die Stimulationen in Kulturmedien durchgeführt werden, die frei sind von gegen die eingesetzten Inhalationsallergene gerichteten spezifischen IgE und IgG-Antikörpern. Nur unter diesen Bedingungen kann davon ausgegangen werden, daß die beobachtete Mediatorfreisetzung der in einem nichtsensibilisierten Organismus entspricht. Diese Ausgangssituation ist insofern wichtig, als daß nur damit gewährleistet ist, daß man von Seiten der Antigenpräsentation eine Situation vorliegen hat, die der einer Primärantwort gleicht.

Die bisher eingesetzten Therapiemaßnahmen bei der atopischen Dermatitis sind im Wesentlichen symptomatische Behandlungen, die darauf abzielen, die T-Zellaktivierung in den befallenen Hautarealen zu inhibieren. Für einige dieser Therapien konnte der Wirkmechanismus aufgeklärt werden. So sind Immunmodulatoren wie Cyclosporin A oder FK 506 in der Lage, durch Blockade der IL-2 - Produktion von T-Zellen deren Vermehrung und Aktivität zu blockieren.

Andere therapeutische Maßnahmen, wie die hochdosierte UVA-1 - Therapie, wirken über Apoptoseinduktion in aktivierten T-Zellen. Eigene Untersuchungen haben gezeigt, daß all diese therapeutischen Maßnahmen letztendlich dazu führen, daß die IFN γ -Expression im atopischem Ekzem herunterreguliert wird und damit die Voraussetzung für die klinische Besserung geschaffen wird. Diese therapeutischen Maßnahmen sind bisher immer aus dem Blickwinkel der Inhibition der T-Zell-Aktivierung betrachtet worden. Wenn man jedoch einmal davon ausgeht, daß diese T-Zell-Aktivierung von Antigen- oder Allergen-stimulierten dendritischen Zellen abhängig ist, so wäre es interessant zu untersuchen, inwieweit bereits bekannte therapeutische Maßnahmen auch in der Lage sind, die Aktivität von dendritischen Zellen zu hemmen. So gibt es bereits für die immunsuppressive Wirkung von UV-Strahlen Evidenz, daß ihre Effektivität unter anderem über die Modulation der Funktion von dendritischen Zellen in der bestrahlten Haut erreicht wird. Mit der vorliegenden Arbeit soll deshalb auch untersucht werden, ob UVB und UVA-1 - Bestrahlung in der Lage sind, die Mediatorfreisetzung von dendritischen Zellen zu modulieren. Hierzu werden unbehandelte und mit Endotoxin stimulierte dendritische Zellen mit UV-B und mit UVA-1 - Licht bestrahlt.

Nach der Charakterisierung der Prostanoidproduktion werden vergleichende Untersuchungen zur Mediatorsynthese von DC von Atopikern versus Nicht-Atopikern durchgeführt werden. Kann die Mediatorfreisetzung von Th1- und Th2-typischer und anderer Zytokine dieser beiden verschiedenen DC-Populationen durch eine Vorinkubation mit Inhalationsallergenen moduliert werden? Und gibt es Möglichkeiten diese Unterschiede einander wieder anzugleichen, bzw. atopische DC in Richtung nicht-atopische zu „normalisieren“?

3. Material und Methoden

3.1. Material

3.1.1. Zubehör

Zubehör	Hersteller, Firma
DC aus 50 ml Buffy-Coat (entspricht 500ml Vollblut)	Blutbank, Universitätsklinikum Düsseldorf
DC aus 100 ml Vollblut	Atopiker / Kontrolle
Kulturschalen	Nunc
50 ml Polypropylene Konische Röhren	Falcon
15 ml Polypropylene Röhren	Greiner
50 ml Polycarbonat Zentrifugenröhren	Nalgene
1,5 ml Eppendorfcups	Eppendorf
2,0 ml Eppendorfcups	Eppendorf
0,5 ml GeneAmp Reaktionsröhren	Perkin Elmer
Magnetic Particle Concentrator MPC-6	Dynal
Omnican Insulinspritzen	Braun
Glasplatten, Spacer, Klammern, Kamm für Western Blot	Sigma
Whatman Papier	Whatman
Nitrocellulose Membran	Biorad
Photo Gene Development Folders	BRL Life Technologiesv
Hyperfilm ECL	Amersham Life Science
Neubauer Zählkammer	Brand
Gelträger, Käme für DNA-Gel	Sigma

3.1.2. Geräte

Geräte	Hersteller, Firma
Heraeus Megafuge 1.0 R Swingout	Heraeus
Sorvall 5 RB Rotor SA 600 34° Winkel	Sorvall
Hera Cell Brutschrank (37°C, 5% CO ₂)	Heraeus
FACS-SCAN v	Becton-Dickinson
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer
Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham Pharmacia

Elektrophoresekammer GNA 200	Pharmacia Biotech
Ika-Vibrax-VXR Schüttelapparat	Pharmacia
Thermoblock	Liebisch
Elisareader	Dynex MRX
Western-Blot Elektrophorese Kammer	Sigma
Biofuge 13R	Heraeus
Photometer	Pharmacia
Ultraschall (Sonorex)	Bendelin
312 nm UV-Licht	Lamag
Fotoapparat	Polaroid
Umkehrmikroskop	Zeiss
UVB 4 FS 20 Leuchtröhren	Westinghouse Electric Corp., Pittsburgh, PA
IL-1700 Research Radio	International Light, Newburyport MA
SEE 240 UVB Photodetektor	International Light, Newburyport
Facs Reader	Becton Dickinson
Blotting Kammer Fast Blot	Biometra
Netzgerät Biometra P22	Biometra, MA
UVASUN 5000 Biomed	Mutzhass, München
UVACRYL	Mutzhass, München
UG1	Schott Glaswerke, München
UVAMETER	Mutzhass, München

3.1.3. Chemikalien

Zellpräparation

Chemikalien	Hersteller, Firma
RPMI 1640 Medium w/o Phenol Red	Biochrom KG
Glutamin	Gibco BRL
FCS	Greiner
Antibiotikum/Antimykotikum	Gibco BRL
EBSS	Gibco BRL
McCoy's 5A	Sigma
Liquemin N 25000	Roche

PBS (10X) w/o Calcium and Magnesium	Gibco BRL
Percoll	Pharmacia
Ficoll Paque Research grade	Pharmacia
Dynabeads M-450 Pan T (CD 2)	Dynal
Dynabeads M-450 Pan B (CD 19)	Dynal
Monocyte negative isolation Kit	Dynal
GM-CSF	Genzyme
IL-4	Genzyme
PBS (1X)	SERAG Wiessner
Eisbad	
Flüssiger Stickstoff	

Zytokine und Antikörper

Chemikalien	Hersteller, Firma
NS-398	Cayman Chemicals
Valeryl Salicylate	Cayman Chemicals
LPS (Salmonella minnesota Re 595)	Sigma
PGE2	Sigma
TxB2	Sigma
IFN?	Genzyme
IL-10 (rekombinant human)	Genzyme
IL-10 Antikörper	Biosource
IL-1-Rezeptor Typ 1 Antikörper	R&D Systems
TNF-a neutralisierender Antikörper	R&D Systems
Hausstaubmilbe 503	ALK-Scherax
Wiesenlieschgras 225	ALK-Scherax

FACS-Analyse

Chemikalien	Hersteller, Firma
PBS	SERAG Wiessner
BSA	Sigma
NaN ₃	Merck
Paraformaldehyd	Sigma

CD1A PE gekoppelt Typ IgG1	Immunotech
CD3 FITC gekoppelt Typ IgG1	Immunotech
CD14 FITC gekoppelt Typ IgG2a	Immunotech
IgG1 PE gekoppelt	Immunotech
IgG2a FITC/PE gekoppelt	Immunotech
IgG2b PE gekoppelt	Pharmingen

RNA-Extraktion und RT-PCR

Chemikalien	Hersteller, Firma
RNeasy Mini Kit	Qiagen
100% Ethanol	Merck
70% Ethanol	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma
First strand c-DNA Synthese Kit	Pharmacia
Taq DNA Polymerase	Pharmacia
Taq DNA Polymerase Puffer	Pharmacia
Mineralöl	Fluka
DNA Typing Grade Agarose	Gibco BRL
Trizma Base	Gibco BRL
Borsäure	Riedel de Haen
EDTA	Sigma
Ethidiumbromid	Fluka
Bromphenolbla	Bio-RAD
Xylen Cyanol FF	Bio-RAD
Ficoll Typ 400	Pharmacia
Ultrapure dNTP Set	Pharmacia
100 bp DNA Leiter	Gibco
β -Actin Primer	Gibco
IL-12 p35 Primer	Stratagene
IL-12 p40 Primer	Stratagene
COX-1-Primer	Gibco
COX-2-Primer	Gibco

ELISA

Chemikalien	Hersteller, Firma
PGE2 Elisa	R+D Systems
TXB2 Elisa	R+D Systems
PGD2 Elisa	Cayman
Quantikine HS Human IL-12 Elisa	R+D Systems
Human IL-10 Elisa UltraSensitiv	Laboserv

Western-Blot

Chemikalien	Hersteller, Firma
EGTA	Sigma
EDTA	Sigma
Benzamidine	Sigma
PMSF	Sigma
Digitonin	Sigma
Bradford Lösung	Bio-Rad
β -Mercaptoethanol	Sigma
Trizma Base	Sigma
Natriumlaurylsulfat (SDS)	Roth
Glycerin	Sigma
Bromphenolblau	Bio-RAD
Glycin	Sigma
Methanol	Riedel de Haen
Trockenmilchpulver	Bio-Rad
Natriumazid	Merck
Antifoam A	Sigma
PBS	SERAG Wiessner
Tween 20	Bio-Rad
Na Cl	Merck
Acryl/Bis 37,5 : 1 Lösung	Amresco
APS	Gibco
TEMED	Bio-Rad
Prestained SDS-Page Standards	Bio-Rad

COX-1 monoclonal Antibody	Cayman
COX-2 monoclonal Antibody	Transduction Laboratories
Anti-mouse Ig, horseradish peroxidase linked	Amersham
ECL-Lösungen	Amersham

3.2. Methoden

3.2.1. Präparation der DC

DC werden entweder aus den Monozyten des Vollblutes oder aus Buffy-Coats gewonnen. Die folgende Methode kann für beide Möglichkeiten gleich angewandt werden: Das Vollblut/der Buffy-Coat wird mit EBSS/Heparin 1:1 vermischt, um eine Verdünnung zu erreichen und eine Aggregation zu verhindern. Das antikoagulierte Blut wird auf eine Ficoll-Paque Lösung vorsichtig aufgetragen, so dass zwei Schichten entstehen. Die niedrige Viskosität von Ficoll macht eine Lymphozytenisolierung unter kurzer und langsamer Zentrifugation möglich. Ficoll Paque besteht aus einer Mischung aus Ficoll und Natrium Metrizoat. Nach einer Zentrifugation bei 900g für 20min unter Raumtemperatur ohne Bremse sedimentieren die Erythrozyten und die Granulozyten auf dem Boden. Wegen ihrer geringeren Dichte befinden sich die Monozyten zusammen mit den Lymphozyten und den Thrombozyten in der Schicht zwischen dem Ficoll Paque und dem Plasma. Diese Bande wird isoliert und mehrfach mit EBSS gewaschen, wobei durch pro Waschschrift abnehmende Zentrifugationsgeschwindigkeiten die Thrombozyten sukzessive im Überstand verbleiben und somit ausgewaschen werden. Die Lymphozyten und Monozyten sammeln sich bei der Zentrifugation als Pellet am Boden. Zur weiteren Aufreinigung wird ein Percollgradient gefahren. Der Percollgradient, der aus Percoll, Mc Coy 5A und 10x PBS besteht, wird bei 12500g für 20min bei Raumtemperatur vorzentrifugiert und anschließend werden die Zellen, die in Mc Coy 5A Medium aufgenommen werden, aufgetragen. Während der Zentrifugation im Swingout-Rotor bei 400g für 45 min ohne Bremse werden die Zellen erneut nach dem Gewicht aufgetrennt und anschließend mehrmals mit abnehmenden Zentrifugationsgeschwindigkeiten mit EBSS + 1%FCS gewaschen. Da die Lymphozyten schlecht von den Monozyten getrennt werden können, muss anschließend eine negative Selektion erfolgen, das heißt, die Lymphozyten werden mittels immunomagnetischer Isolierung aussortiert. Zur immunomagnetischen Isolierung werden magnetische Polystyrenkügelchen verwendet, die im Falle der negativen T-Zell-Isolierung mit monoklonalen Antikörpern spezifisch für CD2, CD7, CD16 und CD56 und im Falle der negativen B-Zell-Isolierung mit CD19 beladen sind. Mit Hilfe der Antikörper werden die B- und T-Zellen an die magnetischen Kügelchen gebunden und an den Magnetic Particle Concentrator gebunden. Die Monozyten verbleiben im Überstand und können nach einigen Waschschriften in die Zellkultur übergehen.

Die Zellen werden in einer Konzentration von 1 Mio Zellen/well auf 12-well-Platten in 2ml RPMI-Medium mit 10% FCS, 1% Antibiotikum, 1% Glutamin, 100U/ml GM-CSF und

50U/ml IL-4 ausplattiert. Sie werden 5-9 Tage im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ in Kultur gehalten. Alle 2 Tage erfolgt ein Mediumwechsel, indem vorsichtig die Hälfte des Mediums abpipettiert wird und neues Medium mit den Wachstumsfaktoren dazugegeben wird. Bereits nach 2 Tagen kann man eine Dendritenbildung unter dem Mikroskop beobachten. Frühestens ab dem 4. Tag in Kultur wurde stimuliert.

3.2.2. FACS-Analyse

Ein Teil der DC werden am 1. Tag der Kultur und am letzten Tag der Kultur zur Bestimmung der Reinheit und der spezifischen Oberflächenmarker mittels FACS-Scan analysiert. Die DC werden mit FACS-Puffer mehrmals gewaschen und bei 500g 8min lang abzentrifugiert.

FACS-Puffer:	0,1% BSA 0,01% NaN ₃ ad 500ml PBS
--------------	--

Die Isotypkontrollen und CD-Oberflächenmarker werden zu jeweils 500.000 Zellen dazugegeben und für 30 min bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Danach werden die Zellen erneut mit dem FACS-Puffer gewaschen, abzentrifugiert und mit Paraformaldehyd in einer Endkonzentration von 1% fixiert. Die Analyse der Oberflächenmarker wird mittels des FACS-Durchflußzytometers bestimmt, der pro Analyse ca.10.000 Zellen bestimmt.

3.2.3. Detektion von mRNA-Expression: RT-PCR

Die RNA wird mit Hilfe des RNeasy Mini Kit extrahiert. Diese Technologie verbindet die selektive Bindungskapazität von Silikamembranen mit der Mikrozentrifugationstechnik. Ein spezialisiertes Hochsalzpuffersystem erlaubt RNA bis zu 200bp Länge und einem Gewicht von 100µg an die Silikamembran einer Säule zu binden. Die Zellpellets werden mit dem Lysepuffer, der mit β-Mercaptoethanol versetzt wird, und mit Hilfe von Insulinspritzen lysiert und homogenisiert. Die Lysebedingungen sind denaturierend, schaffen eine RNase-freie Umgebung und sichern somit die Isolation einer intakten RNA. Die Proben werden mit Hilfe des Lysepuffers und 70% Ethanol geeigneten Bindungsbedingungen angeglichen und auf RNeasy Zentrifugensäulen aufgetragen. Die komplette RNA bindet an die Säule, während die Verunreinigungen vollständig ausgewaschen werden. Die reine RNA wird mit 70 µl DEPC Wasser eluiert. 20µl der RNA werden in die reverse Transkription eingesetzt und nach Vorschrift des first strand c-DNA Synthese Kits bearbeitet. Die cDNA Synthese wird von der

Moloney Mäuse Leukämie Virus (M-MuLV) reversen Transkriptase katalysiert. Dem vorgefertigten Bulk First-Strand cDNA Reaktions-Mix werden die RNA, DTT und der pd(N)6 Primer hinzugefügt. Die Reaktion wird für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die fertige cDNA wird hitzedenaturiert, damit der cDNA-Strang der Polymerisationsreaktion zugänglich wird. Die Spezifität des PCR- Prozesses basiert auf zwei Amplifikationsprimern, die sich an den komplementären Strang lagern und das hoch zu amplifizierende DNA-Fragment flankieren. Wiederholte Zyklen der Denaturation, der Primeranlagerung („annealing“) und der Primerextension durch die DNA Polymerase resultiert in einem exponentiellen Wachstum der Ziel-cDNA.

Pipettierschema der PCR-Reaktion

β-Actin PCR:	3µl c-DNA 9µl Taq-Polymerase-Puffer 0,5µl Taq-Polymerase 1µl β-Actin-Primer 3' 1µl β-Actin-Primer 5' 1µl Nucleotid-Mix 85µl DEPC H ₂ O 50µl Mineralöl
IL-10/IL-12/COX-2 PCR:	10µl c-DNA 0,5µl Taq-Polymerase 1µl Primer 3' 1µl Primer 5' 88µl DEPC H ₂ O 50µl Mineralöl

PCR-Einstellungen

Denaturierung	5min 94°, anschließend auf Eis stellen
Starttemperatur	7min 25°C
Zyklusbeginn (Zyklenanzahl siehe unten)	
Denaturierung	1min 94°C
Annealing Temp	1min siehe unten
Extensionszeit	2min 72°C
Schlußzyklus	10min 72°C

Primerdaten

Primer	Annealing Temp	Zykluszahl	Basenpaare
β-Actin	60°C	26	550
IL-10	60°C	2x35	204
IL-12 p35	60°C	2x35	414
IL-12 p40	60°C	2x35	373
COX-1	60°C	2x35	444
COX-2	60°C	2x35	305

β-Actin, IL-10, IL-12 p35, IL-12 p40 sind kommerziell erhältliche, vorgefertigte Primer, während die COX-1- und COX-2-Sequenzen aus dem Gen selbst ausgesucht und von der Firma Gibco hergestellt wurden.

COX-1:

Sense-Primer-Sequenz 5'-3': CCC CCG AGG CAT CCC GCC CCA G

Antisense-Primer-Sequenz 5'-3': GCC CCC ACC GAT CCG GCC AGC

COX-2:

Sense-Primer-Sequenz 5'-3': TTC AAA TGA GAT TGT GGG AAA ATT GCT

Antisense-Primer-Sequenz 5'-3': AGA TCA TCT CTG CCT GAG TAT CTT

Bei einer Dauer von 70 Zyklen werden nach 35 Zyklen nochmals 0,5µl Taq-Polymerase, 1µl Nuc-Mix und 4µl Taq-Polymerase-Puffer hinzugegeben. Nach Beendigung der PCR-Reaktion wird 20µl der hoch amplifizierten DNA mit einem Laufpuffer (BXF) versetzt und auf ein 1% Agarosegel in 1% TBE-Puffer mit Ethidiumbromid als DNA-interkalierende Substanz aufge-

tragen und anschließend auf einem UV-Detektor sichtbar gemacht und fotografiert. Als Größenmarker wird eine 100 bp DNA Leiter mit auf das Gel aufgetragen.

Gel-Einstellung: 100 V, 300mA, 1h 20min, TBE-Elektrophorese-Puffer

BXF-Puffer:	0,25% Bromphenol Blau 0,25% Xylen Cyanol FF 15% Ficoll Typ 400 ad 100ml H ₂ O
TBE-Puffer 5x:	54g Tris 27,5g Borsäure 3,7g EDTA ad 1l H ₂ O pH 8,3

3.2.4. Detektion von Protein-Expression: Westernblot

Bei einem Westernblot werden elektrophoretisch getrennte Proteine auf eine solide Unterlage transferiert („Blotten“), an die spezifische Antikörper binden können, welche wiederum selektiv Aminosäuresequenzen der Proteine erkennen. Das Zellpellet aus den DC wird in Extraktionspuffer und Digitoninlösung aufgenommen und mit einer Insulinspritze auf Eis homogenisiert.

Extraktionspuffer:	10mM EGTA 5mM EDTA 0,5mM Benzamidine ad 100ml PBS, pH 8,0, sterilfiltrieren, 4°C 0,25mM PMSF kurz vor Gebrauch zugeben (30min haltbar)
Digitoninlösung:	50mg Digitonin ad 10 ml H ₂ O steril filtrieren, 4°C

Nach Abzentrifugation bei 10000g über 5min wird dieser Schritt zwei mal wiederholt. Anschließend wird eine Proteinbestimmung bei $\lambda 595$ mit 1-3 μ l Probe ad 1ml Bradford-Lösung vorgenommen. Nach Zugabe von 5% Triton X-100 wird die Probe für 5 min ins Ultraschallbad gehalten. 10 μ g Protein der Probe wird mit dem gleichen Volumen Ladepuffer gemischt und auf ein SDS-Gel aufgetragen. SDS führt dazu, dass das Protein vollständig negativ gela-

den wird und anschließend entsprechend der Anzahl der negativen Ladungen auf dem Gel der Länge nach aufgetrennt wird. Als Größenreferenz wird ein vorgefärbter Marker von Biorad eingesetzt.

Elektrophoreseeinstellung: 170V, 4°C, 4h, Elektrophoreselaufpuffer 1x

Ladepuffer:	125mM Tris, pH 6,8 2% SDS 25% Glycerin 0,014% Bromphenolblau 1% β -Mercaptoethanol ad 20ml H ₂ O dest.	
SDS-Trenngel:	37,5% AA/Bis	9ml
	10% SDS	300 μ l
	1,5M Tris, pH 8,8	7,5ml
	5M Harnstoff	2,5ml
	H ₂ O	10,5ml
	10% APS (frisch)	150 μ l
	TEMED	15 μ l
SDS-Sammelgel:	37,5% AA/Bis	1,12ml
	10% SDS	100 μ l
	0,5M Tris, pH 6,8	2,5ml
	H ₂ O	6,22ml
	10% APS	50 μ l
	TEMED	10 μ l
Elektrophoreselaufpuffer 10x:	2M Glycin 0,25M Tris 0,5% SDS ad 2l H ₂ O dest.	

Das fertige Gel wird auf einen Nitrocellulosefilter gelegt und zwischen Whatmanpapiere, die in Transferpuffer getränkt wurden, eingebettet. Das Ganze wird auf die Graphitplattenelektroden des Biometra Fast Blots mit der Nitrocelluloseseite zur Anode hin gelegt. Der Blot erfolgt bei 300mA für 1h gekühlt und mit Gewichten beschwert.

Transferpuffer:	10mM Tris pH 7 1mM EDTA pH 8 150mM NaCl 0,01% Tween 20 ad 2 ml H ₂ O dest.
-----------------	---

Die geblottete Nitrocellulose wird zuerst mit Transferpuffer gewaschen und anschließend 2h bei RT in Blocking Lösung geschüttelt.

Blocking Lösung:	5% Trockenmilchpulver 0,01% Natriumazid 0,01% Antifoaming 0,02% Tween 20 ad 50ml PBS
------------------	--

Nach dem Blocken erfolgt der Antikörpernachweis. Den Blot in dem jeweiligen 1. Antikörper bei 4°C über Nacht schütteln und danach mit TPBS waschen.

1. Antikörper: 10µl Cox-1 Antikörper ad 10ml Blocking Lösung

1. Antikörper: 40µl Cox-2 Antikörper ad 10ml Blocking Lösung

TPBS:	0,01% Tween 20 ad 2 l PBS
-------	------------------------------

Den Blot in dem 2. Antikörper bei RT 1h schütteln und danach erst mit TPBS, dann mit PBS waschen.

2. Antikörper: 10µl Anti Mouse IG (HRPE) ad 10ml Blocking Lösung

Der Blot wird mit ECL-Lösungen, deren Chemilumineszenz durch eine Peroxidase-reaktion des 2. Antikörpers ausgelöst wird, detektiert und zwischen 1-10 min einem Blaulicht sensitiven Röntgenfilm (Hyperfilm ECL) exponiert, welcher dann entwickelt wird.

3.2.5. Detektion von Protein-Expression: ELISA

PGE2-ELISA:

Dieser Assay basiert darauf, dass PGE2 in der Probe mit einer definierten Menge PGE2, welches mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, um die Bindungsstelle an einem monoklonalen Antikörper der Maus kompetitiert. Während der Inkubation bindet der Maus-Antikörper an einen Ziege-anti-Maus-Antikörper mit dem die Mikrotiterplatte beschichtet ist. Nach dem Auswaschen von überschüssigen konjugierten Antikörpern und ungebundener Probe, wird eine Substrat-Lösung hinzugegeben, welche die Enzymaktivität der gebundenen Antikörper bestimmt. Die Farbentwicklung wird gestoppt und bei einer Absorption von λ 405nm mit einem ELISA-Reader gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des PGE2 in der Probe.

TXB2-ELISA:

Dieser Assay basiert darauf, dass TXB2 in der Probe mit einer definierten Menge TXB2, welches mit alkalischer Phosphatase gekoppelt ist, um die Bindungsstelle an einem polyklonalen Antikörper des Kaninchens kompetitiert. Während der Inkubation bindet der Kaninchenantikörper an einen Ziege-anti-Kaninchen-Antikörper mit dem die Mikrotiterplatte beschichtet ist. Nach dem Auswaschen von überschüssigen konjugierten Antikörpern und ungebundener Probe, wird eine Substrat-Lösung hinzugegeben, die die Enzymaktivität der gebundenen Antikörper bestimmt. Die Farbentwicklung wird gestoppt und bei einer Absorption von λ 405nm mit einem ELISA-Reader gemessen. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Konzentration des TXB2 in der Probe.

IL-12-ELISA:

Dieser ELISA basiert auf der „Sandwich“-Technik. Die Mikrotiterplatte ist mit einem monoklonalen Antikörper, der spezifisch für IL-12 ist, beschichtet. Standardreihe und Proben werden in die Wells pipettiert und jegliches IL-12, welches anwesend ist, bindet an den immobilisierten Antikörper. Nachdem die ungebundenen Proteine gewaschen werden, wird ein enzymgekoppelter polyklonaler Antikörper gegen IL-12 zu dem gebundenen IL-12 pipettiert, welches die „Sandwich“-Technik beschreibt. Nach mehreren Waschschritten, welche ungebundene enzymgekoppelte Antikörper entfernen, wird eine Substratlösung dazu pipettiert. Die Farbe entwickelt sich proportional zur Menge des gebundenen IL-12. Die Farbentwicklung wird gestoppt und bei λ 450 nm gemessen.

IL-10-ELISA:

Wie der IL-12-ELISA basiert auch dieser ELISA auf der „Sandwich“-Technik. Die Mikrotiter-Platte ist mit einem spezifischen anti-IL-10 Antikörper beschichtet. Proben und Standards werden zu diesem Capture-Antikörper pipettiert, und das IL-10 Molekül wird an der Oberfläche der Wells gebunden. Nach den folgenden Waschschrritten wird ein zweiter biotinylierter anti-IL-10 Antikörper, der gegen ein anderes Epitop gerichtet ist, zugegeben. Dieser bindet an das bereits an der Gefäßwand gebundene IL-10 Molekül. Nachdem der nicht gebundene Anteil an Zweitantikörper durch weitere Waschschrritte entfernt wurde, gibt man Streptavidin-Peroxidase-Konjugat hinzu. Streptavidin bindet an Biotin. Durch die Verwendung einer Biotin-Streptavidin Brücke wird ein Verstärkungseffekt und damit eine erhöhte Sensitivität erzielt. Nachdem das nicht gebundene Konjugat durch einen weiteren Waschschrtritt entfernt wurde, gibt man die TMB Substratlösung dazu, die mit dem gebundenen Enzym einen Farbkomplex bildet, welcher bei λ 450 nm gemessen wird. Die Intensität der Farbe ist proportional zur IL-10-Konzentration.

PGD2-MOX-ELISA:

Dieser ELISA basiert auf einer Kompetition zwischen freiem PGD2-MOX und einem PGD2-MOX-Tracer um eine limitierte Anzahl an PGD2-Mox-spezifischen Bindungsstellen in einem Kaninchen-Antiserum. Die Konzentration des Tracers wird konstant gehalten, während die Konzentration des freien PGD2-MOX in der Probe variiert. Daraus folgt, dass die Menge des gebundenen Tracers umgekehrt proportional zu der Konzentration des freien PGD2-Mox im Well ist. Der Kaninchen-Antiserum-PGD2-MOX-Komplex (entweder aus der Probe oder aus dem Tracer) bindet an die monoklonalen Maus-anti-Kaninchen-Antikörper mit denen die Wells vorher beschichtet wurden. Die Platte wird gewaschen, um die ungebundenen Reagenzien weg zu waschen. Danach wird Ellman`s Reagenz, die das Substrat für die Acetylcholinesterase beinhaltet, dazugegeben. Das Produkt der enzymatischen Reaktion hat eine gelbe Farbe, die mit dem ELISA-Reader bei λ 412nm gemessen wird. Die Intensität der Farbe ist umgekehrt proportional zur Menge des freien PGD2-MOX in der Probe.

3.2.6. Hausstaubmilbenextrakt- und Wiesenlieschgrasverdünnungsreihe

Hausstaubmilbenextrakt (503 ALK-Scherax) sowie Wiesenlieschgrasextrakt (225 ALK-Scherax) wurden für die einfache Konzentration laut Beipackzettel in 4,5 ml H₂O aufgelöst, was etwa einer Konzentration von 9,6 mg/ml entspricht. Für die 10-fache Konzentration in 450 μ l H₂O und für die anderen Konzentrationen wurde eine Verdünnungsreihe in 10er Po-

tenzen von der einfachen Konzentration hergestellt. In 1ml Kultur wurden von jeder Konzentration 1µl eingesetzt.

Hausstaubmilbenextrakt- und Wiesenschiessgrasverdünnungsreihe	10-fach	= 96 µg/ml
	1-fach	= 9,6 µg/ml
	0,1-fach	= 0,96 µg/ml
	0,01-fach	= 0,096 µg/ml
	0,001-fach	= 0,0096 µg/ml

3.2.7. UV-Bestrahlung

Für eine UV-Bestrahlung wurde das Medium gegen farbloses EBSS ausgetauscht. Die Zellen wurden mit 100 J/m² UVB in einer UV-Kabine mit 4 FS 20 Leuchtröhren (Westinghouse Electric Corp., Pittsburgh, PA), die ausschliesslich Licht der Wellenlängen 280-320 nm emittieren. Die Strahlungsintensität wurde mit einem IL-1700 Research Radiometer und einem SEE 240 UVB Photodetektor (International Light, Newburyport, MA USA) gemessen und betrug ungefähr 24x10⁻⁵ W/cm² bei einer Bestrahlungsdistanz von 22 cm. Nach einer Bestrahlung wurden die Zellen gewaschen und in Kulturmedium zurückgeführt. Die Kontrollzellen wurden über den Zeitraum der Bestrahlung in farblosem EBSS aufbewahrt und anschliessend ebenfalls gewaschen und in das normal Medium übergeführt.

Für eine UVA Bestrahlung wurden die Zellen einer UVASUN 5000 Biomed Bestrahlungsvorrichtung (Fa. Mutzhas, München, Deutschland) ausgesetzt. Die Emission wurde mittels UVACRYL (Fa. Mutzhas, München, Deutschland) und UG1 (Fa. Schott Glaswerke, München, Deutschland) gefiltert und enthielt ausschliesslich Wellenlängen die größer als 340 nm waren. Die UVA Intensität wurde mittels eines UVAMETER (Fa. Mutzhas, München, Deutschland) gemessen und betrug ungefähr 150 mW/cm² UVA bei einer Bestrahlungsdistanz von 30 cm.

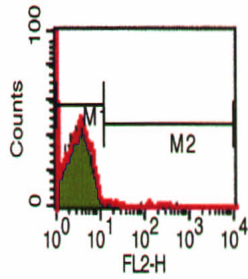
4. Ergebnisse

4.1. Zellkulturanalyse mittels FACS

Monozyten wurden wie im Methodenteil dargestellt isoliert und am ersten Kulturtag mittels FACS-Analyse anhand ihrer Oberflächenmarker auf ihre Reinheit untersucht. Innerhalb von 7 Tagen Inkubation mit IL-4 und GM-CSF in farblosem RPMI (1% Glutamin, 1% Antibiotikum/Antimykotikum, 10% FCS) differenzieren die Monozyten zu DC aus. Diese Zellen wurden erneut im FACS gemessen und auf ihre Reinheit untersucht.

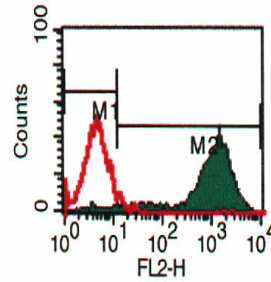
Ad Abb.4.1.1.: Linke Seite: Expression von CD1a (oben), CD3 (mitte) und CD14 (unten) auf frisch aus dem Blut isolierten Monozyten. Rechte Seite: Expression von CD1a (oben), CD3 (mitte) und CD14 (unten) am Tag 7 der identischen Monozytenkultur in Anwesenheit von IL4 und GM-CSF, Grün = spezifische Antikörper, Rot= Isotyp-Kontrollantikörper

Abb. 4.1.1.



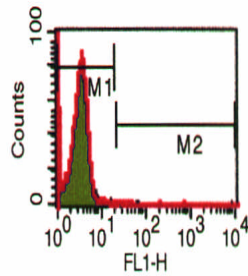
Sample ID: CD 1A Acquisition Date: 12-Sep-00
Total Events: 10000 X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	% Gated	Mean	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	100.00	3.55	2.90	224.84	3.08
M1	1, 12	99.83	3.35	2.88	53.90	3.05
M2	12, 9910	0.17	117.84	50.25	132.19	23.40



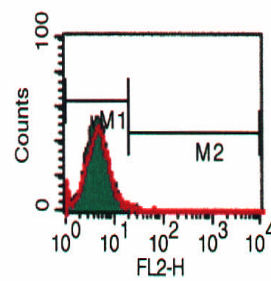
Sample ID: CD 1A Acquisition Date: 19-Sep-00
Total Events: 10000 X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	% Gated	Mean	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	100.00	1196.81	880.82	61.78	1094.11
M1	1, 12	1.27	6.37	5.45	51.88	5.47
M2	12, 9910	98.73	1212.19	940.62	60.35	1113.97



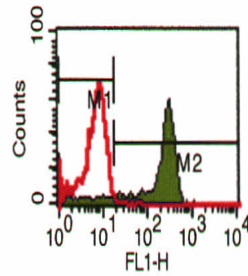
Sample ID: CD 3 Acquisition Date: 12-Sep-00
Total Events: 10000 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left, Right	% Gated	Mean	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	100.00	4.62	3.16	1906.91	3.31
M1	1, 20	99.79	3.40	3.14	40.41	3.31
M2	21, 9910	0.21	586.24	48.12	326.90	29.30



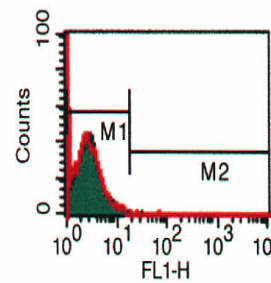
Sample ID: CD 3 Acquisition Date: 19-Sep-00
Total Events: 10000 X Parameter: FL2-H (Log)

Marker	Left, Right	% Gated	Mean	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	100.00	5.07	4.52	52.48	4.53
M1	1, 21	99.77	5.02	4.50	48.91	4.53
M2	21, 9910	0.25	25.62	25.34	15.77	25.03



Sample ID: CD 14 Acquisition Date: 12-Sep-00
Total Events: 10000 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left, Right	% Gated	Mean	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	100.00	229.72	164.06	48.04	248.05
M1	1, 18	7.75	6.83	4.60	78.60	5.19
M2	18, 9910	92.29	248.34	221.29	37.55	257.13



Sample ID: CD 14 Acquisition Date: 19-Sep-00
Total Events: 10000 X Parameter: FL1-H (Log)

Marker	Left, Right	% Gated	Mean	Geo Mean	CV	Median
All	1, 9910	100.00	2.99	2.65	55.68	2.67
M1	1, 18	99.98	2.98	2.65	54.10	2.67
M2	18, 9910	0.02	29.69	29.69	***	29.69

4.2. Prostanoidproduktion von DC nach UV-Lichtbestrahlung und LPS-Stimulation

$0,5 \times 10^6$ Monozyten wurden ausplattiert und über einen Zeitraum von 7 Tagen mit IL-4 und GM-CSF in farblosem RPMI (1% Glutamin, 1% Antibiotikum/Antimykotikum, 10% FCS) zu DC ausdifferenziert. Die ersten Stimulationen erfolgten frühestens nach 4 Tagen, geerntet wurden die Zellen zwischen dem 7. und dem 9. Tag. Die Bestimmung der Reinheit der Kultur anhand spezifischer Oberflächenmarker wurde mittels des FACS-Scans analysiert. Die Reinheit betrug über 94%.

Die Überstände wurden in einen Prostaglandin E2-ELISA, einen Prostaglandin D2-ELISA und einen Thromboxan B2-ELISA eingesetzt.

Stimulationsplan

Nr.	Inkubationszeit (h)	Stimulation (Dosis)
1	24	Kontrolle
2	24	LPS (100ng/ml)
3	24	UVB (100J/m ²)
4	24	UVB + LPS
5	24	UVA1 (30J/cm ²)

Abb. 4.2.1.

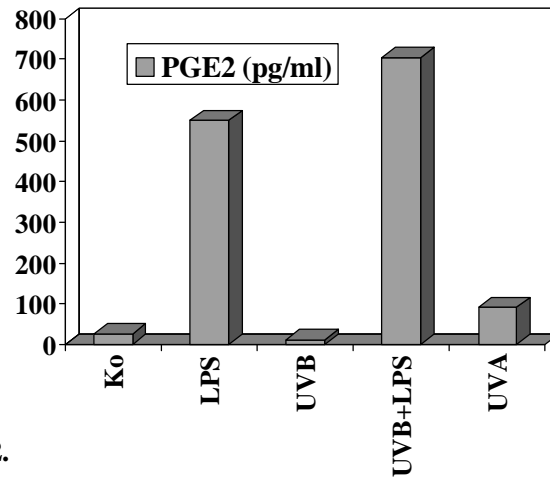


Abb. 4.2.2.

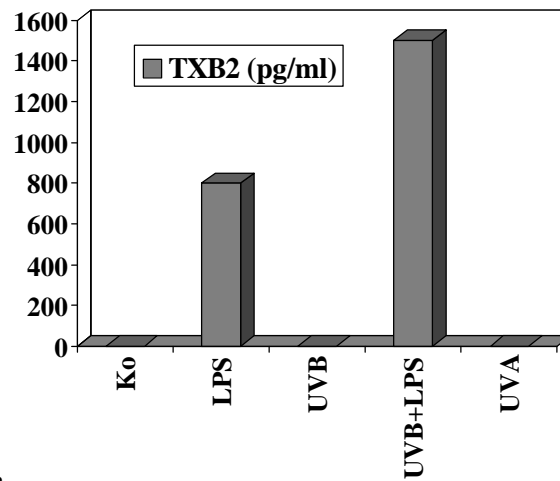
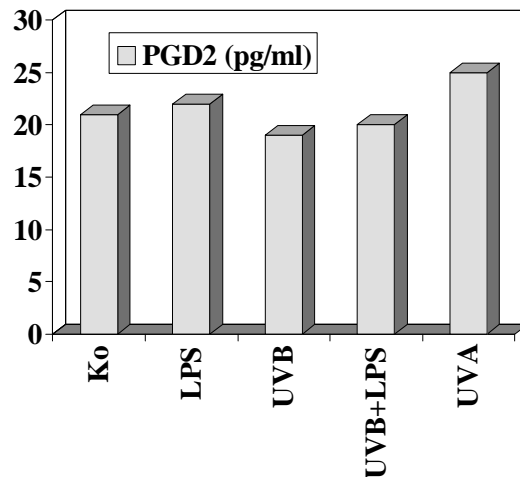


Abb.4.2.3.



Ad Abb.4.2.1.- Abb.4.2.3.: DC sind in der Lage große Mengen an PGE2 und TXB2 zu produzieren, aber nur geringe Mengen an an PGD2. UVB Bestrahlung induziert keine Prostanoidfreisetzung, während UVA1 Bestrahlung zu einer selektiven Freisetzung von PGE2 führt. UVB Bestrahlung verstärkt die LPS induzierte Prostanoidproduktion.

4.3. UV-Zeitkinetik der COX-2 und ihrer Syntheseprodukte TXB2 und PGE2

0,5 x 10⁶ Monozyten wurden ausplattiert und über einen Zeitraum von 7 Tagen mit IL 4 und GM-CSF in farblosem RPMI (1% Glutamin, 1% Antibiotikum/Antimykotikum, 10% FCS) zu DC ausdifferenziert. Die ersten Stimulationen erfolgten frühestens nach 4 Tagen, geerntet wurden die Zellen zwischen dem 7. und 9. Tag. Die Bestimmung der Reinheit der Kultur anhand spezifischer Oberflächenmarker wurde mittels des FACS-Scans analysiert. Die Reinheit betrug über 94%.

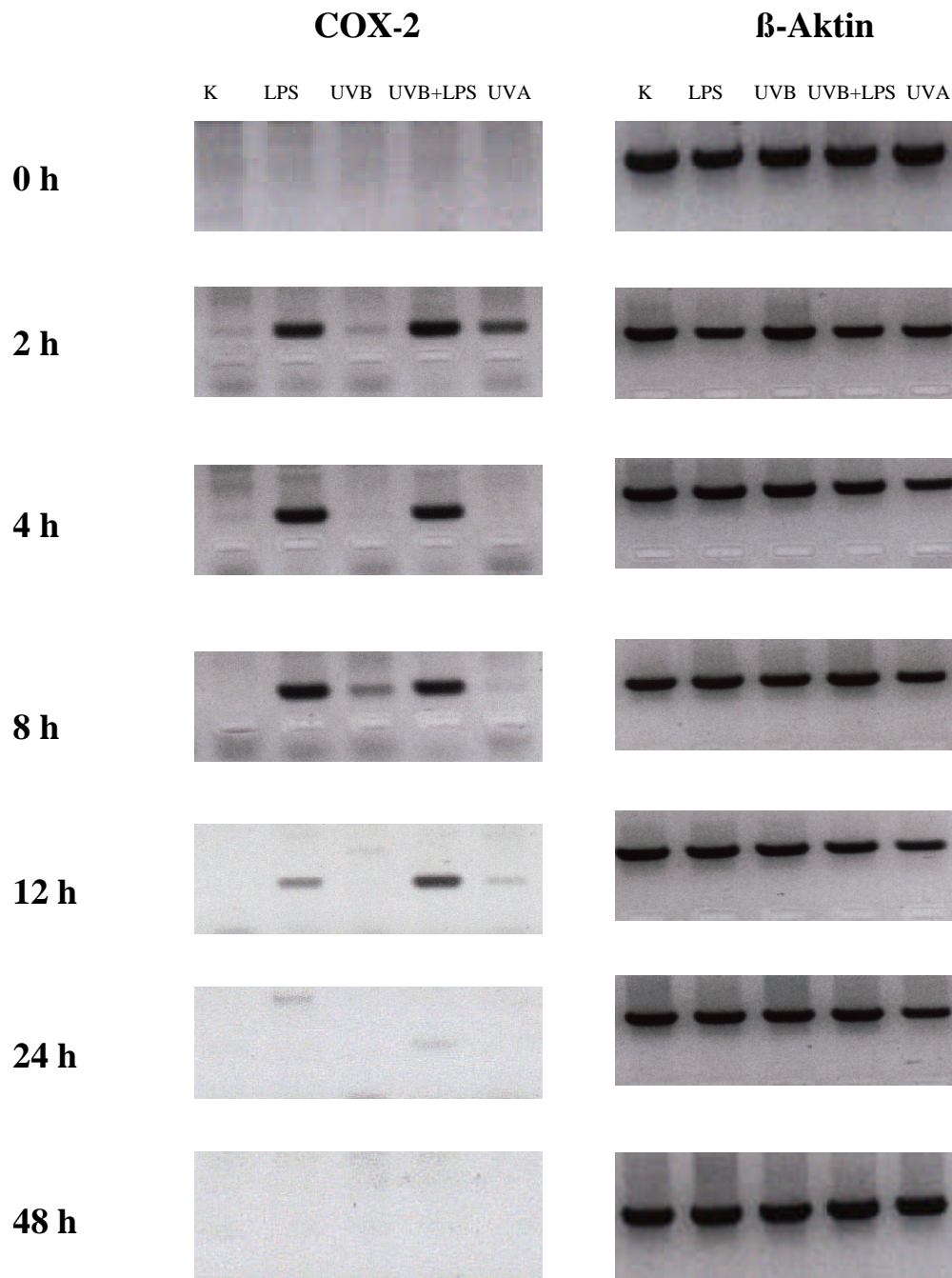
Aus den Zellen wurde die RNA extrahiert, während die Überstände in ELISAs oder Western-Blots eingesetzt wurden.

Die COX-2 wurde anhand ihrer mRNA über reverse Transkription mittels PCR analysiert und gegen das Housekeeping-Gen β -Actin aufgetragen.

Stimulationsplan

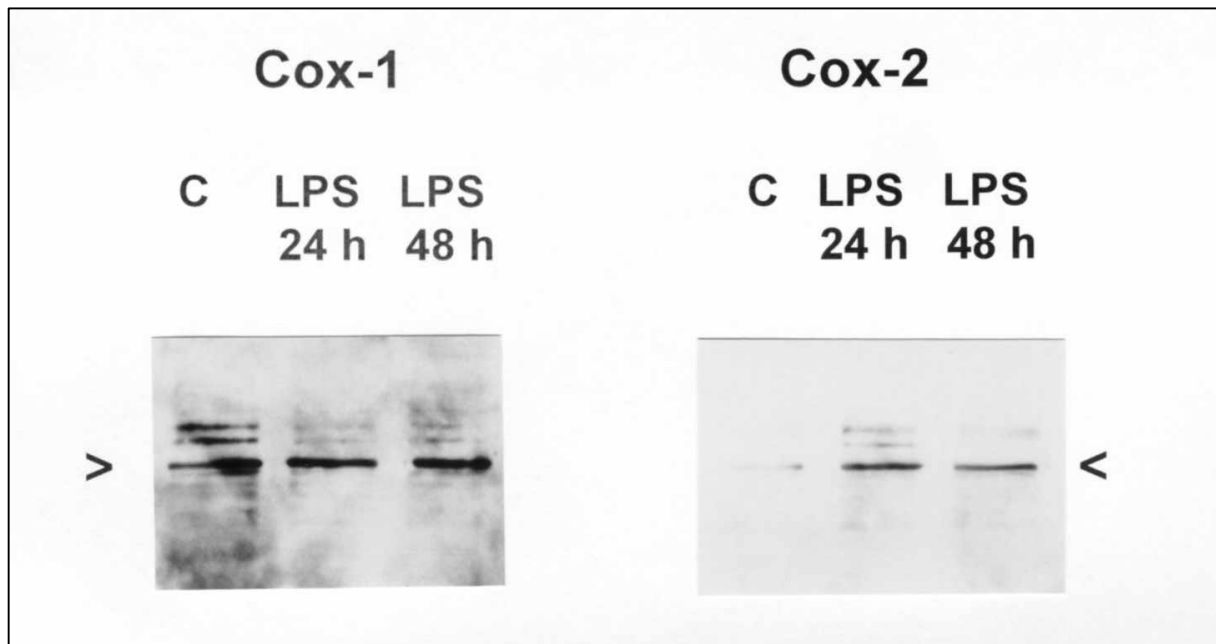
Nr.	Inkubationszeit (h)	Stimulation (Dosis)	Nr.	Inkubationszeit (h)	Stimulation (Dosis)
1	0	Kontrolle	19	8	UVB + LPS
2	0	LPS (100ng/ml)	20	8	UVA1
3	0	UVB (100J/m ²)	21	12	Kontrolle
4	0	UVB + LPS	22	12	LPS
5	0	UVA1 (30J/cm ²)	23	12	UVB
6	2	Kontrolle	24	12	UVB + LPS
7	2	LPS	25	12	UVA1
8	2	UVB	26	24	Kontrolle
9	2	UVB + LPS	27	24	LPS
10	2	UVA1	28	24	UVB
11	4	Kontrolle	29	24	UVB + LPS
12	4	LPS	30	24	UVA1
13	4	UVB	31	48	Kontrolle
14	4	UVB + LPS	32	48	LPS
15	4	UVA1	33	48	UVB
16	8	Kontrolle	34	48	UVB + LPS
17	8	LPS	35	48	UVA1
18	8	UVB			

Abb. 4.3.1. COX-2 RT-PCR



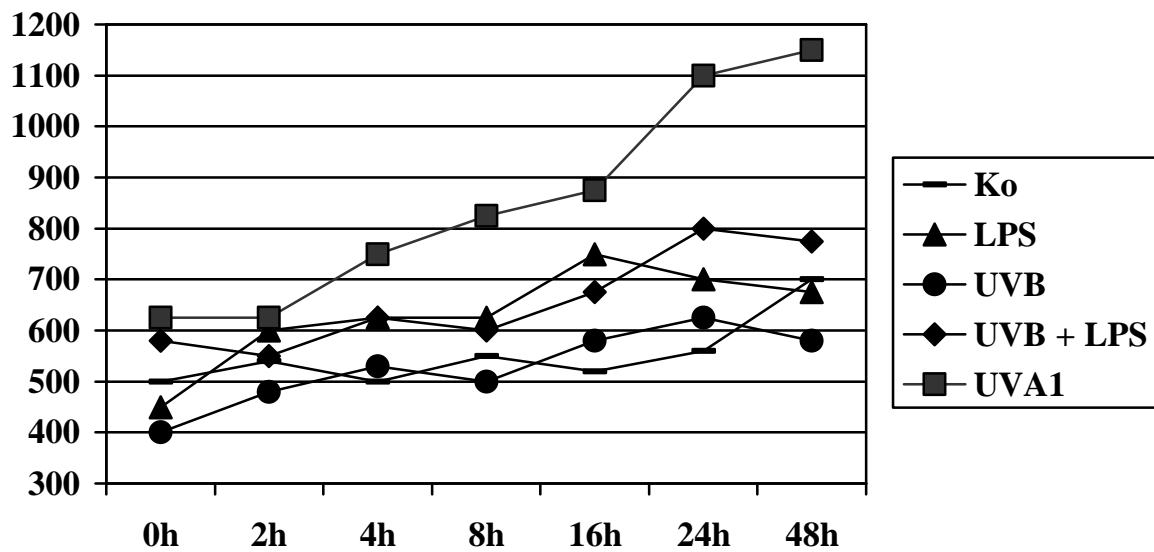
Ad Abb.4.3.1.: Die RNA der COX-2 wurde zwischen 2 und 12 h hochreguliert, während die COX-1 konstitutiv vorhanden war. Die Überstände wurden konzentriert, in einen Western Blot eingesetzt und mit COX-1 und COX-2 monoklonalen Antikörpern nachgewiesen. LPS ist der stärkste Induktor auf die COX-2 Produktion, UVA ist ebenfalls ein Induktor, während UVB alleine lediglich nach 8h eine Aufregulierung induzieren konnte. UVB in Kombination mit LPS führte nach 12 h zu einer Superinduktion.

Abb. 4.3.2. Western-Blot COX-1 und COX-2



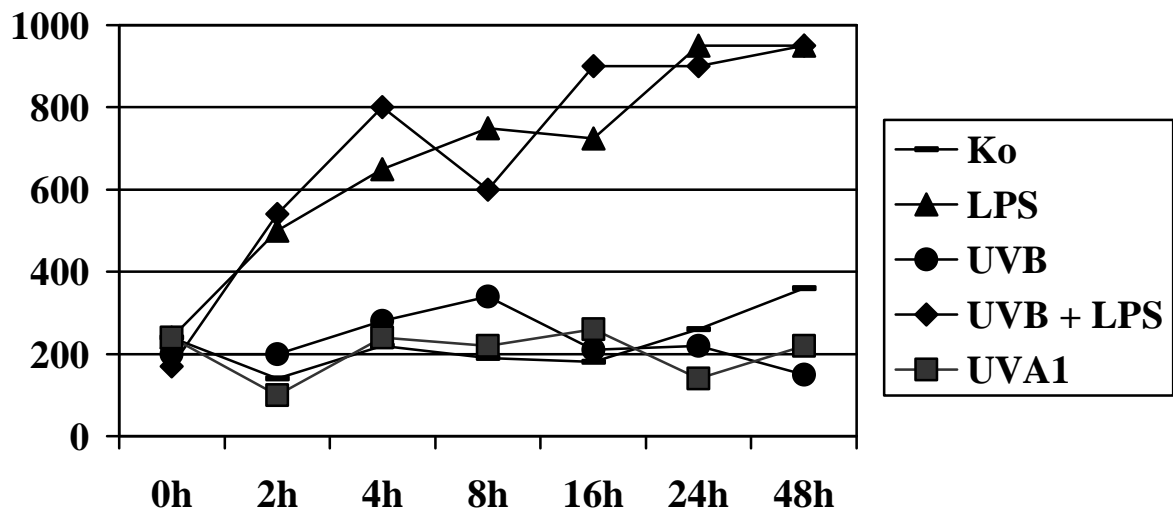
Ad Abb.4.3.2.: Das Protein konnte am besten nach 24 h mit einem Western Blot sichtbar gemacht werden, der ebenfalls zeigte, dass die COX-2 im Gegensatz zur COX-1 erst induziert werden musste.

Abb. 4.3.3. Zeitkinetik der PGE2-Produktion in Abhängigkeit verschiedener Stimuli



Ad Abb.4.3.3.: UVA ist in der Lage die PGE2-Produktion in DC signifikant und kontinuierlich über 48 h hochzuregulieren. LPS induziert die PGE2-Produktion geringfügig. UVB hat keinen Einfluß auf die PGE2-Produktion.

Abb. 4.3.4. Zeitkinetik der TXB2-Produktion in Abhängigkeit verschiedener Stimuli



Ad Abb.4.3.4.: LPS ist in der Lage die TXB2-Produktion in DC signifikant und kontinuierlich über 48 h hochzuregulieren. UVB und UVA hatten keinen Einfluß auf die TXB2-Produktion.

4.4. Prostanoidproduktion von DC unter Stimulation von Hausstaubmilben- (HM) und Wiesenlieschgrasextrakten (LG)

0,5 x 10⁶ Monozyten wurden ausplattiert und über einen Zeitraum von 7 Tagen mit IL-4 und GM-CSF in farblosem RPMI (1% Glutamin, 1% Antibiotikum/Antimykotikum, 10% FCS) zu DC ausdifferenziert. Die ersten Stimulationen erfolgten frühestens nach 4 Tagen, geerntet wurden die Zellen zwischen dem 7. und 9. Tag. Die Bestimmung der Reinheit der Kultur anhand spezifischer Oberflächenmarker wurde mittels des FACS-Scans analysiert. Die Reinheit betrug über 94%. Die Überstände der Zellen wurden in PGE₂- und TXB₂ -ELISAs eingesetzt.

Stimulationsplan

Nr.	Inkubationszeit (h)	Stimulation (Dosis)
1	24	Kontrolle
2	24	LPS (100ng/ml)
3	24	10-fache Konz. Hausstaubmilbe (HM)
4	24	1-fache Konz. HM
5	24	0,1-fache Konz. HM
6	24	0,01-fache Konz. HM
7	24	0,001-fache Konz. HM
8	24	0,0001-fache Konz. HM
9	24	Kontrolle
10	24	LPS
11	24	10-fache Konz. Wiesenlieschgras (LG)
12	24	1-fache Konz. LG
13	24	0,1-fache Konz. LG
14	24	0,01-fache Konz. LG
15	24	0,001-fache Konz. LG
16	24	0,0001-fache Konz. LG

Abb.4.4.1. Prostaglandin-Produktion von DC unter Stimulation mit Hausstaubmilbenextrakten (HM)

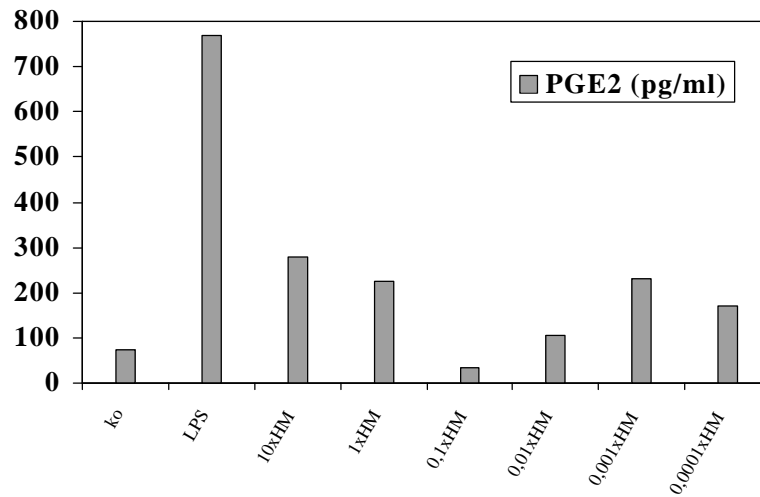
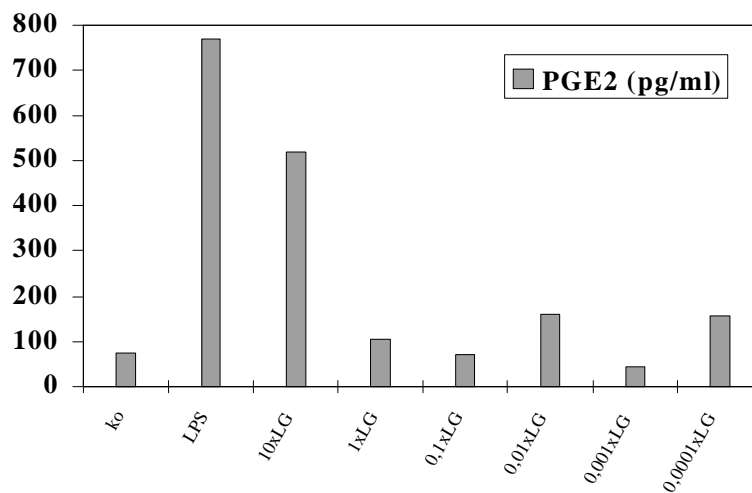


Abb.4.4.2. Prostaglandin-Produktion von DC unter Stimulation mit Wiesenlieschgrasextrakten (LG)



Ad Abb. 4.4.1. und 4.4.2.: LPS ist der stärkste Induktor für eine PGE2-Produktion. Hausstaubmilbenextrakt war in der Lage die PGE2-Produktion hochzuregulieren; insbesondere in den extrem hohen und den niedrigsten Konzentrationen. Wiesenlieschgrasextrakt war signifikant nur in der 10-fachen Konzentration in der Lage PGE2 hochzuregulieren.

Abb.4.4.3. Thromboxan-Produktion von DC unter verschiedenen Hausstaubmilbenextrakten (HM)

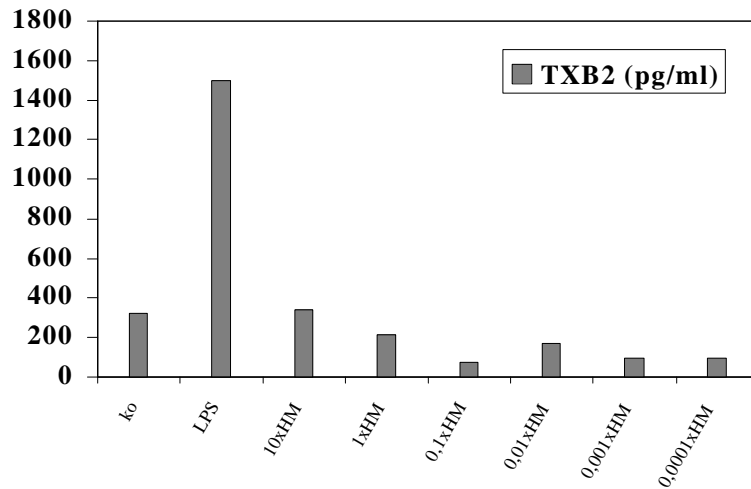
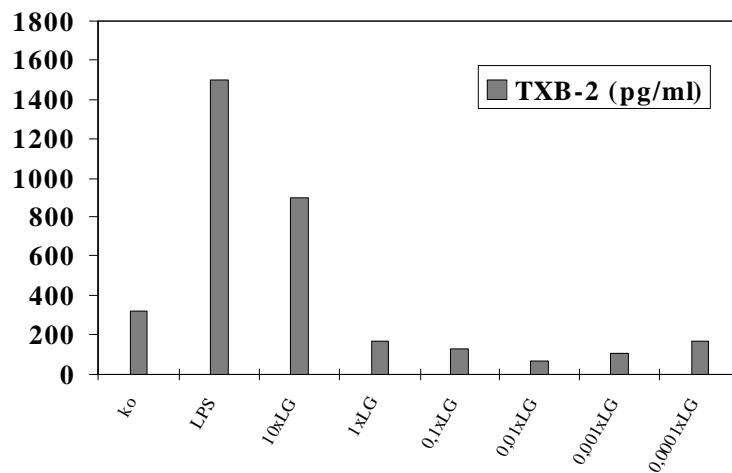


Abb.4.4.4. Thromboxan-Produktion von DC unter verschiedenen Wiesenlieschgraskonzentrationen (LG)



Ad Abb. 4.4.3. und 4.4.4.: LPS ist der stärkste Induktor für eine TXB2-Produktion. Hausstaubmilbenextrakt war nicht in der Lage TXB2 hochzuregulieren. LPS und die 10-fache Konzentration von Wiesenlieschgrasextrakt waren in der Lage die TXB2-Produktion hochzuregulieren. Die anderen Wiesenlieschgrasextraktkonzentrationen hatten keinen Einfluß auf die TXB2-Produktion.

4.5. Einfluss von TNF und IL-1 und Antikörpern auf die Prostanoidproduktion von DC

$0,5 \times 10^6$ Monozyten wurden ausplattiert und über einen Zeitraum von 7 Tagen mit IL-4 und GM-CSF in farblosem RPMI (1% Glutamin, 1% Antibiotikum/Antimykotikum, 10% FCS) zu DC ausdifferenziert. Die ersten Stimulationen erfolgten frühestens nach 4 Tagen, geerntet wurden die Zellen zwischen dem 7. und 9. Tag. Die Bestimmung der Reinheit der Kultur anhand spezifischer Oberflächenmarker wurde mittels des FACS-Scans analysiert. Die Reinheit betrug über 94%. Die Überstände der Zellen wurden in PGE2- und TXB2-ELISAs eingesetzt.

Stimulationsplan

Nr.	Inkubationszeit (h)	Stimulation (Dosis)
1	24	Kontrolle
2	24	LPS (100ng/ml)
3	24	IL1 β
4	24	TNF α
5	24	LPS + IL-1Rezeptor1Ak (20 μ l/ml)
6	24	LPS + TNF α Ak
7	24	LPS + IL-1Rezeptor1Ak + TNF α Ak

Abb. 4.5.1. PGE2-Produktion von DC unter Stimulation mit LPS, TNF α -AK und IL-1 Rez.Typ1-AK

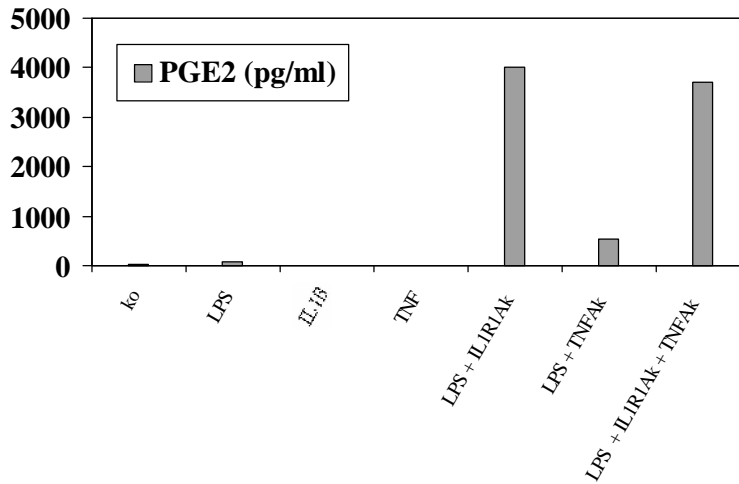
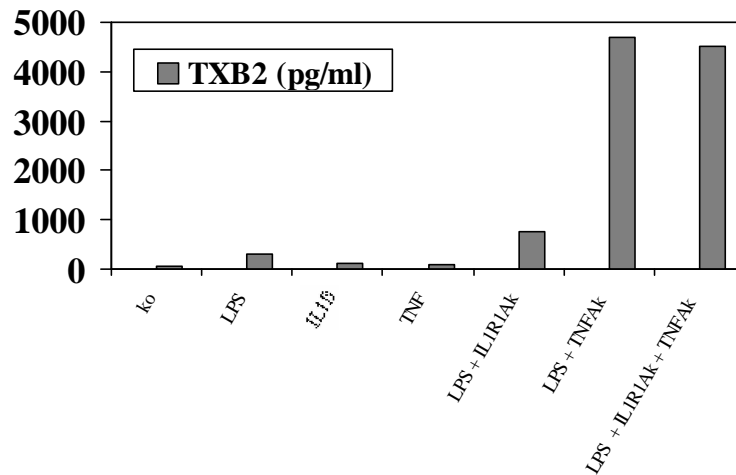


Abb. 4.5.2 TXB2-Produktion von DC unter Stimulation mit LPS, TNF α -AK und IL-1 Rez.Typ1-AK



Ad Abb.4.5.1. und 4.5.2.: TNF α und IL-1 β alleine sind nicht in der Lage PGE2 oder TxB2 zu produzieren. IL-1Rez-Typ1-Antikörper sind in der Lage, die LPS induzierte PGE2-Produktion der DC signifikant zu steigern. Auch TNF α -Antikörper sind dazu in der Lage, jedoch nicht im gleichen Ausmaß. TNF α -Antikörper sind in der Lage, die LPS induzierte TXB2-Produktion der DC signifikant zu steigern.

4.6. Expression von PGE2 und TXB2 unter Stimulation mit spezifischen Cyclooxygenase-Inhibitoren

0,5 x 10⁶ Monozyten wurden ausplattiert und über einen Zeitraum von 7 Tagen mit IL 4 und GM-CSF in farblosem RPMI (1% Glutamin, 1% Antibiotikum/Antimykotikum, 10% FCS) zu DC ausdifferenziert. Die ersten Stimulationen erfolgten frühestens nach 4 Tagen, geerntet wurden die Zellen zwischen dem 7. und 9. Tag. Die Bestimmung der Reinheit der Kultur anhand spezifischer Oberflächenmarker wurde mittels des FACS-Scans analysiert. Die Reinheit betrug über 94%. Als spezifischer COX-1-Inhibitor wurde Valerylsalicylsäure (VS) in einer 0,1-fachen Konzentration von 0,8 µl/ml und als spezifischer COX-2-Inhibitor wurde NS 398 in einer 0,1-fachen Konzentration von 0,3µl/ml eingesetzt. Die Zellüberstände wurden in ELISAS eingesetzt. Als spezifischer COX-1-Inhibitor wurde VS in einer 0,1-fachen Konzentration von 0,8 µl/ml und als spezifischer COX-2-Inhibitor wurde NS 398 in einer 0,1-fachen Konzentration von 0,3µl/ml eingesetzt.

Stimulationsplan

Nr.	Inkubationszeit (h)	Stimulation (Dosis)
1	24	Kontrolle
2	24	LPS (100ng/ml)
3	24	0,1* VS
4	24	0,1* VS + LPS
5	24	0,1* NS 398
6	24	0,1* NS 398 + LPS
7	24	0,1* VS + NS 398
8	24	0,1* VS + NS 398 + LPS
9	24	0,01* VS
10	24	0,01* VS + LPS
11	24	0,01* NS 398
12	24	0,01* NS 398 + LPS
13	24	0,01* VS + NS 398
14	24	0,01* VS + NS 398 + LPS
15	24	0,001* VS
16	24	0,001* VS + LPS
17	24	0,001* NS 398

18	24	0,001* NS 398 + LPS
19	24	0,001* VS + NS 398
20	24	0,001* VS + NS 398 + LPS

Abb.4.6.1

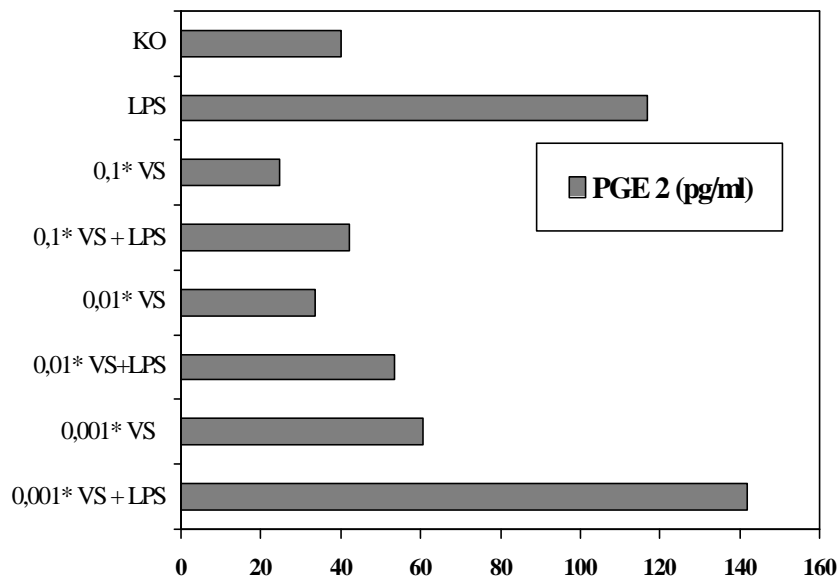
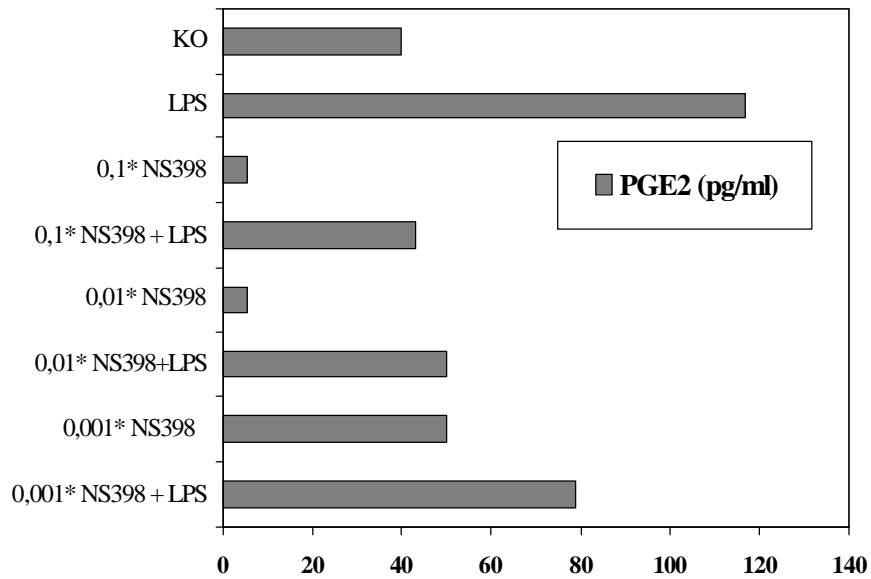


Abb.4.6.2



Ad Abb.4.6.1. und 4.6.2: Der spezifische COX-1-Inhibitor VS war in der Lage die LPS induzierte PGE2-Synthese partiell jedoch signifikant zu unterdrücken. Mit steigender Dosierung der VS-Konzentration konnte eine progrediente Inhibition beobachtet werden. Der spezifische COX-2-Inhibitor NS 398 war ebenfalls in der Lage die LPS induzierte PGE2 Synthese partiell jedoch signifikant zu unterdrücken. Mit steigender Dosierung der NS398-Konzentration konnte eine progrediente Inhibition beobachtet werden.

Abb. 4.6.3

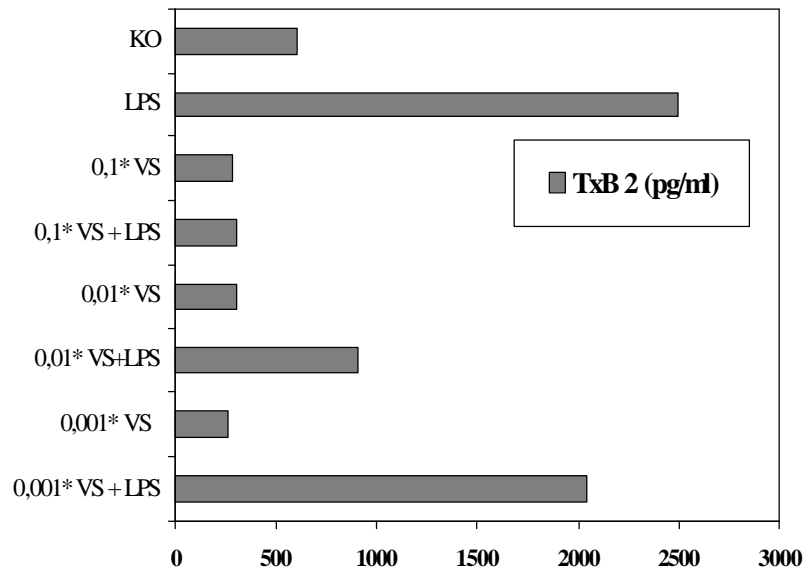
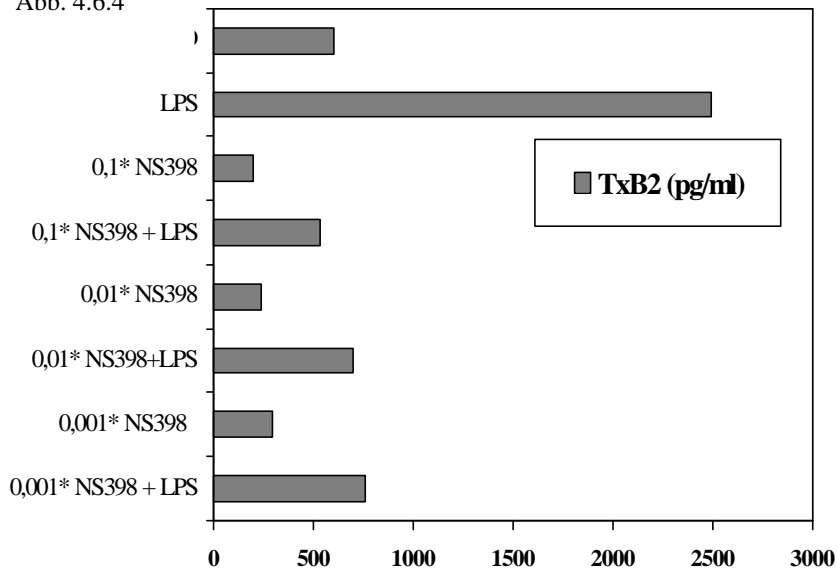


Abb. 4.6.4



Ad Abb.4.6.3. und 4.6.4.: Der spezifische COX-1-Inhibitor VS war in der Lage die LPS induzierte TXB2-Synthese fast vollständig zu unterdrücken. Mit steigender Dosierung der VS-Konzentration war die Inhibition progredient. Bei der Dosierung von 0,001 VS war die Inhibition der LPS induzierten TXB2 –Synthese fast komplett aufgehoben. Der spezifische COX-2-Inhibitor NS 398 war in der Lage die LPS induzierte TXB2-Synthese fast vollständig zu unterdrücken. Es ergab sich jedoch hierbei keine signifikante Dosisabhängigkeit.

Abb. 4.6.5.

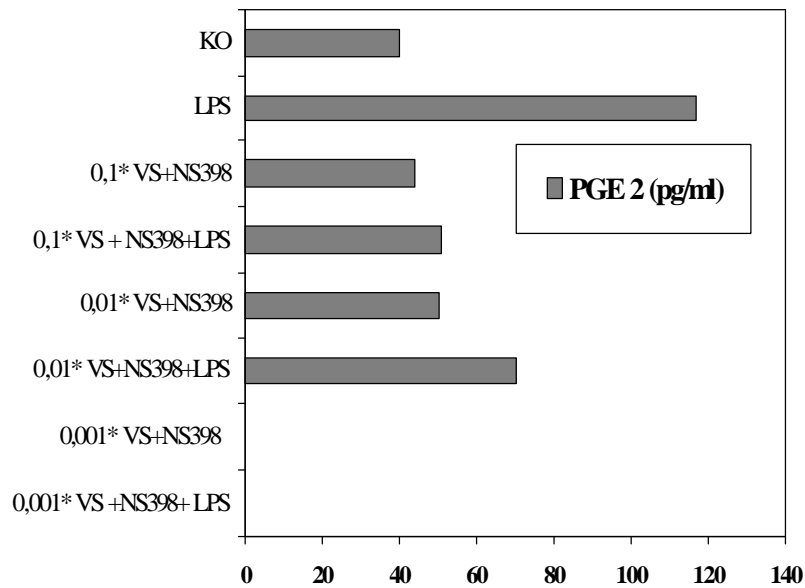
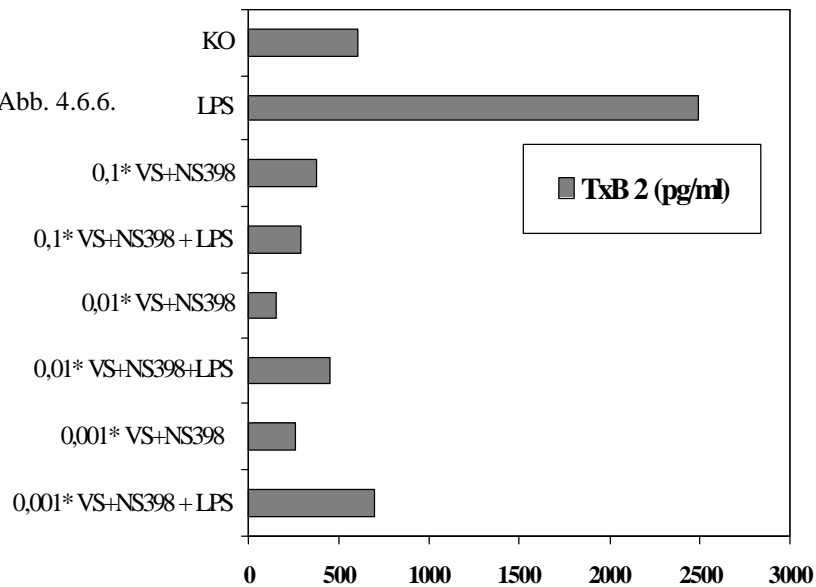


Abb. 4.6.6.



Add Abb.4.6.5. und 4.6.6.: Die Kombination aus dem spezifischen COX-1-Inhibitor VS und dem spezifischen COX-2-Inhibitor NS398 war in der Lage die LPS induzierte PGE2-Synthese komplett zu hemmen. Die Kombination aus dem spezifischen COX-1-Inhibitor VS und dem spezifischen COX-2-Inhibitor NS398 war in der Lage die LPS induzierte TXB2-Synthese komplett zu hemmen.

4.7. Expression von IL-12 und IL-10 nach Stimulation mit LPS bei Hausstaubmilben – präinkubierten DC

0,5 x 10⁶ Monozyten wurden ausplattiert und über einen Zeitraum von 7 Tagen mit IL-4 und GM-CSF in farblosem RPMI (1% Glutamin, 1% Antibiotikum/Antimykotikum, 10% FCS) zu DC ausdifferenziert. Die ersten Stimulationen erfolgten frühestens nach 4 Tagen, geerntet wurden die Zellen zwischen dem 7. und 9. Tag. Die Bestimmung der Reinheit der Kultur anhand spezifischer Oberflächenmarker wurde mittels des FACS-Scans analysiert. Die Reinheit betrug über 94%.

Die Überstände der Zellen wurden in IL-10- und IL-12 –ELISAs eingesetzt.

Stimulationsplan

Nr.	Inkubationszeit (h)	Stimulation (Dosis)
1	72	Kontrolle
2	72	10-fache Konz. Hausstaubmilbe (HM)
3	72	1-fache Konz. HM
4	72	0,1-fache Konz. HM
5	72	0,01-fache Konz. HM
6	72	Kontrolle + 24 h LPS (10 ng/ml)
7	72	10-fache Konz. HM + 24 h LPS (10 ng/ml)
8	72	1-fache Konz. HM + 24 h LPS (10 ng/ml)
9	72	0,1-fache Konz. HM + 24 h LPS (10 ng/ml)
10	72	0,01-fache Konz. HM + 24 h LPS (10 ng/ml)

Abb. 4.7.1.

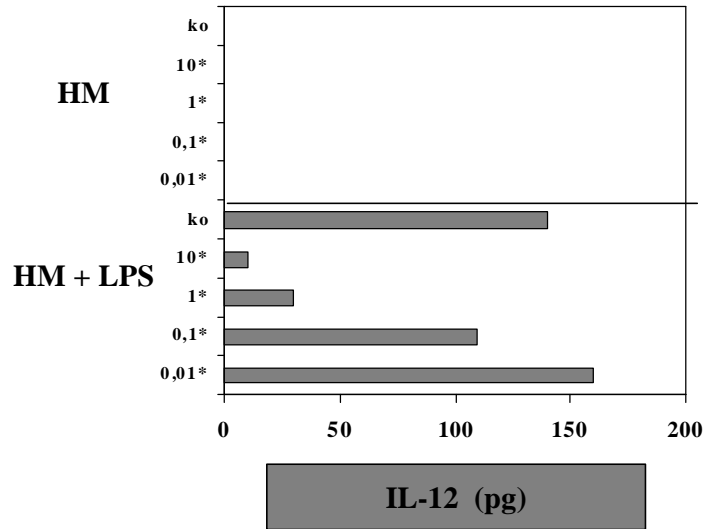
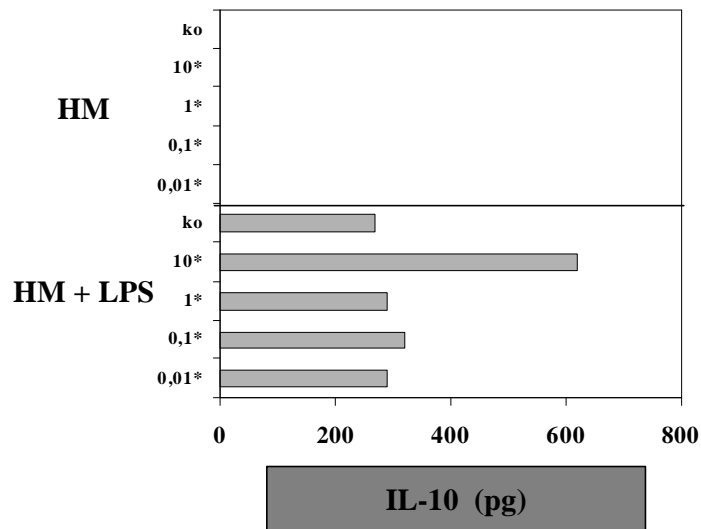


Abb. 4.7.2.



Ad Abb.4.7.1. und 4.7.2.: Eine Präinkubation mit hohen Hausstaubmilbenkonzentrationen war in der Lage, die LPS induzierte IL-12 Expression zu inhibieren. Bei niedrigeren Verdünnungsstufen war der Hemmungseffekt rückläufig. Nur eine 10-fache Konzentration der Hausstaubmilben war in der Lage die LPS induzierte IL-10 Induktion hochzuregulieren. Die niedrigeren Konzentrationen hatten keinen Effekt auf die LPS induzierte IL-10 Induktion.

4.8. Expression von IL-12p35 und p40 mRNA in Hausstaubmilben - stimulierten DC

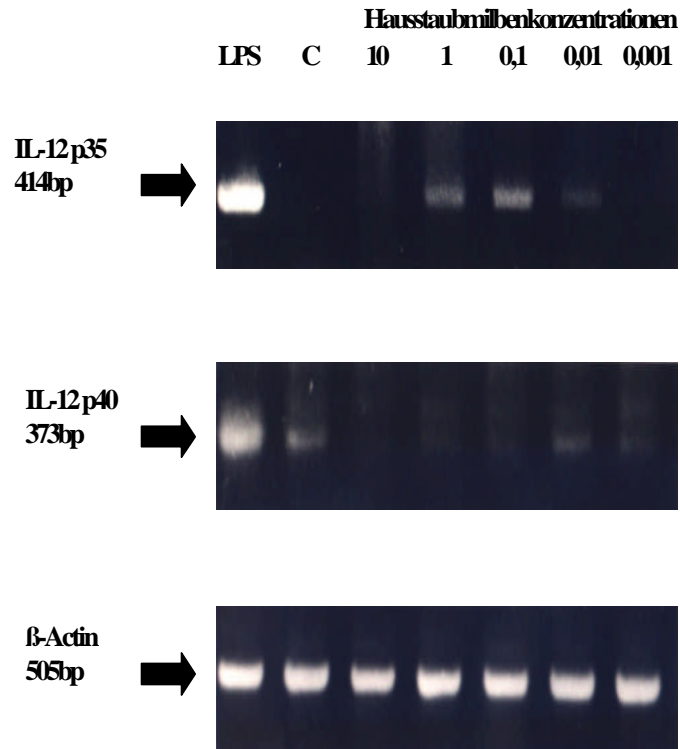
$0,5 \times 10^6$ Monozyten wurden ausplattiert und über einen Zeitraum von 7 Tagen mit IL-4 und GM-CSF in farblosem RPMI (1% Glutamin, 1% Antibiotikum/Antimykotikum, 10% FCS) zu DC ausdifferenziert. Die ersten Stimulationen erfolgten frühestens nach 4 Tagen, geerntet wurden die Zellen zwischen dem 7. und 9. Tag. Die Bestimmung der Reinheit der Kultur anhand spezifischer Oberflächenmarker wurde mittels des FACS-Scans analysiert. Die Reinheit betrug über 94%.

Aus den DC wurde die RNA extrahiert und in eine RT-PCR eingesetzt. Für die RT-PCR wurden IL-12p40, IL-12p35 und β -Actin als Primer benutzt. Die Amplifikationsprodukte wurden mittels der Agarosegel-Elektrophorese getrennt und mit Ethidiumbromid als interkallierende Substanz gefärbt und somit sichtbar gemacht.

Stimulationsplan

Nr.	Inkubationszeit (h)	Stimulation (Dosis)
1	24	Kontrolle
2	24	LPS (100ng/ml)
3	24	10-fach Hausstaubmilbe (HM)
4	24	1-fach HM
5	24	0,1-fach HM
6	24	0,01-fach HM
7	24	0,001-fach HM

Abb.4.8.1.



Ad Abb.4.8.1.: Die IL-12p35-m-RNA wird durch die Inkubation der DC mit unterschiedlichen Hausstaubmilbenkonzentrationen aufreguliert. Die stärkste m-RNA Expression bei einer Konzentration von 0,1-fach liegt, dies entspricht ca.1 $\mu\text{g/ml}$ Hausstaubmilbenprotein. LPS dient als Positivkontrolle. Die IL-12p-40-m-RNA wird durch die Inkubation der DC mit Hausstaubmilbenkonzentrationen von 10- bis 0,1-fach herunterreguliert, während es in unstimulierten und in den niedrigen Konzentrationen exprimiert wird. LPS dient auch hier als Positivkontrolle. β -Aktin ist ein Housekeeping-Gene und wird konstitutiv in DC exprimiert. Die angegebenen Hausstaubmilbenkonzentrationen ergeben sich aus den Verdünnungsreihen in „Material und Methoden“, Kapitel 3.2.6..

4.9. Einfluss von Prostanoiden auf die LPS induzierte IL-12 und IL-10 Expression

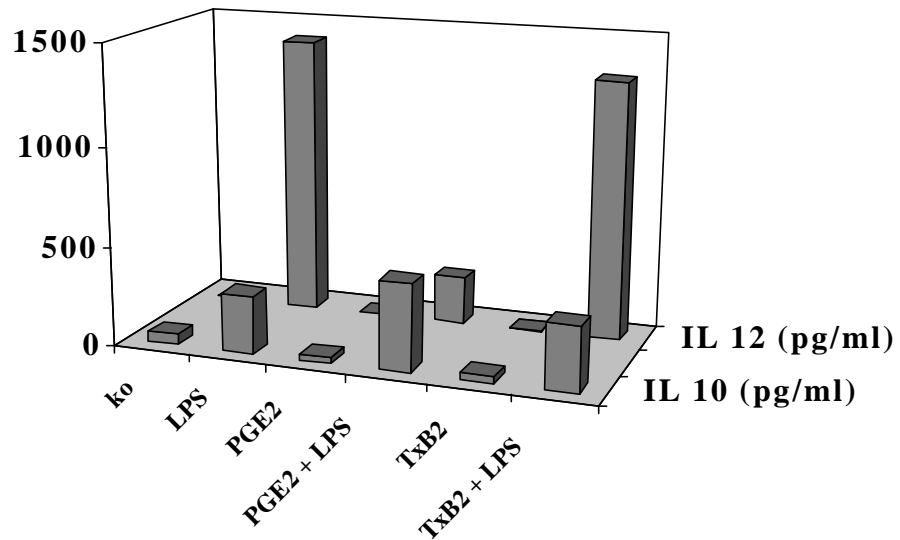
0,5 x 10⁶ Monozyten wurden ausplattiert und über einen Zeitraum von 7 Tagen mit IL-4 und GM-CSF in farblosem RPMI (1% Glutamin, 1% Antibiotikum/Antimykotikum, 10% FCS) zu DC ausdifferenziert. Die Stimulationen erfolgten am 6. Tag, geerntet wurden die Zellen zwischen am 7. Tag. Die Bestimmung der Reinheit der Kultur anhand spezifischer Oberflächenmarker wurde mittels des FACS-Scans analysiert. Die Reinheit betrug über 94%.

Die Überstände wurden in einen IL-10 ELISA und einen IL-12 ELISA eingesetzt

Stimulationsplan

Nr.	Inkubationszeit (h)	Stimulation (Dosis)
1	24	Kontrolle
2	24	LPS (100ng/ml)
3	24	PGE2 (1µmolar)
4	24	PGE2 + LPS
5	24	TXB2 (1µmolar)
6	24	TXB2 + LPS

Abb. 4.9.1.



Ad Abb.4.9.1.: TXB2 hat keinen Einfluss auf die LPS induzierte IL-12 und IL-10 Synthese. Die LPS induzierte IL-12 Produktion bei DC konnte signifikant durch PGE2 herunter reguliert werden. Während die LPS induzierte IL-10 Produktion durch PGE2 einen Anstieg von ca 30% zeigte. PGE2 und TXB2 alleine hatte keinen Einfluss auf die IL-12 und auf die IL-10 Synthese von DC.

4.10. IL-10 und MCP-1 Expression unter LPS-Stimulation bei Atopikern vs. Nicht-Atopikern

0,5 x 10⁶ Monozyten wurden ausplattiert und über einen Zeitraum von 7 Tagen mit IL 4 und GM-CSF in farblosem RPMI (1% Glutamin, 1% Antibiotikum/Antimykotikum, 10% FCS) zu DC ausdifferenziert. Die Stimulation erfolgte am 6. Tag, geerntet wurden die Zellen am 7. Tag. Die Bestimmung der Reinheit der Kultur anhand spezifischer Oberflächenmarker wurde mittels des FACS-Scans analysiert. Die Reinheit betrug über 94%.

Die Überstände der Zellen wurden in ELISAs eingesetzt.

Stimulationsplan

Nr.	Inkubationszeit (h)	Stimulation Atopiker (Dosis)	Nr.	Inkubationszeit (h)	Stimulation Nicht-Atopiker (Dosis)
1	24	Kontrolle	1	24	Kontrolle
2	24	LPS (1ng/ml)	2	24	LPS (1ng/ml)
3	24	LPS (5ng/ml)	3	24	LPS (5ng/ml)
4	24	LPS (10ng/ml)	4	24	LPS (10ng/ml)
5	24	LPS (50ng/ml)	5	24	LPS (50ng/ml)
6	24	LPS (100ng/ml)	6	24	LPS (100ng/ml)
7	24	LPS (500ng/ml)	7	24	LPS (500ng/ml)

Abb. 4.10.1.

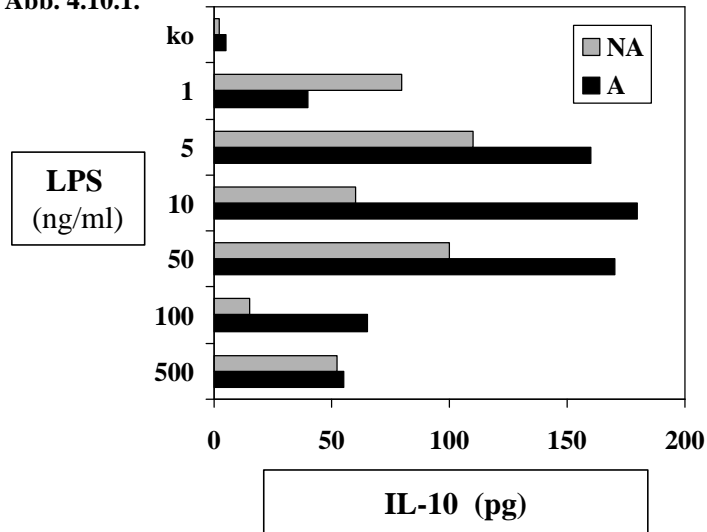
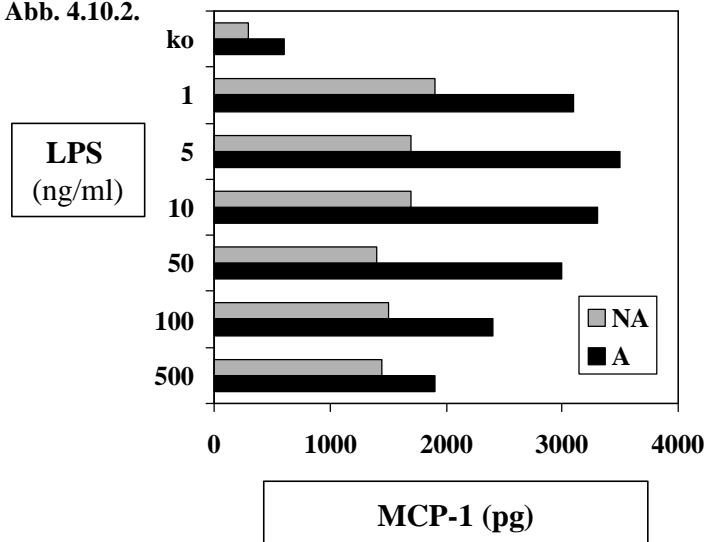


Abb. 4.10.2.



Ad Abb. 4.10.1 und 4.10.2.: Bei 7/8 gepaarten Untersuchungen von alters-und geschlechts-gematchten Paaren war nach LPS-Stimulation der aus dem Blut gewonnenen DC die maximale Produktion sowohl von IL-10 als auch von MCP-1 bei Atopikern um das 1,5-2-fache höher als bei Nicht-Atopikern.

4.11. MCP-1 Produktion von Hausstaubmilben- oder LPS-stimulierten DC unter dem Einfluß von IFN γ , IL-10 und anti-IL-10: Vergleich Nicht-Atopiker vs. Atopiker

0,5 x 10⁶ Monozyten wurden ausplattiert und über einen Zeitraum von 7 Tagen mit IL 4 und GM-CSF in farblosem RPMI (1% Glutamin, 1% Antibiotikum/Antimykotikum, 10% FCS) zu DC ausdifferenziert. Die ersten Stimulationen erfolgten mit den Zytokinen (IFN γ , IL-10, anti-IL-10) am 5. Tag, die 2. Stimulation erfolgte einen Tag später über 24 Std. mit Hausstaubmilbenextrakt oder LPS, geerntet wurden die Zellen am 7. Tag. Die Bestimmung der Reinheit der Kultur anhand spezifischer Oberflächenmarker wurde mittels des FACS-Scans analysiert. Die Reinheit betrug über 94%.

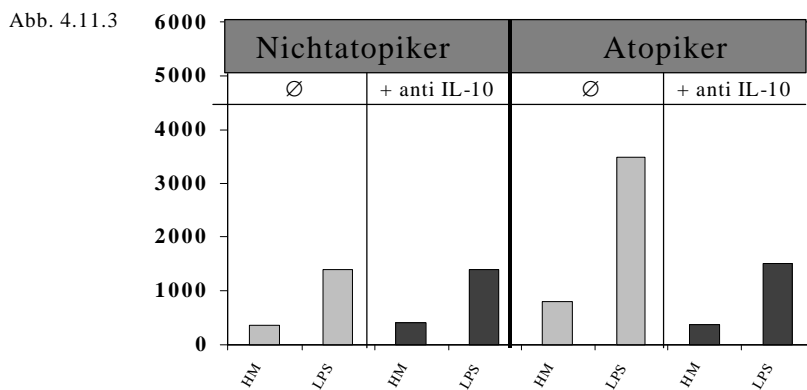
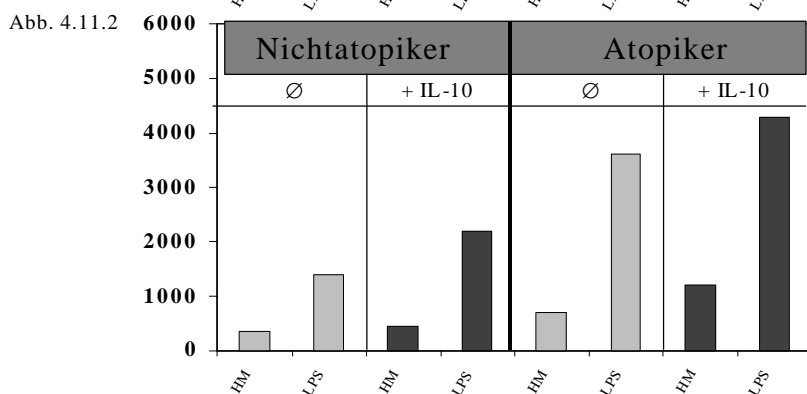
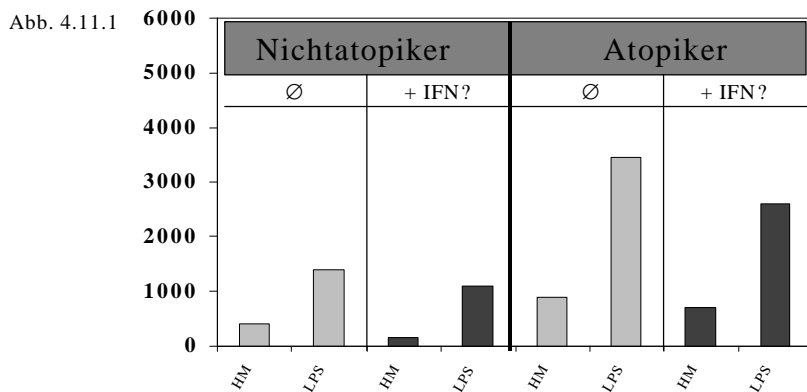
Die Überstände der Zellen wurden in einen MCP-1-ELISA eingesetzt.

Stimulationsplan Nicht-Atopiker

Nr.	Inkubationszeit (h)	Stimulation (Dosis) Nicht-Atopiker
1	24	Hausstaubmilbe (HM) (100 μ g/ml)
2	24	LPS (100ng/ml)
3	24	HM + IFN γ
4	24	LPS + IFN γ
5	24	Hausstaubmilbe (HM) (100 μ g/ml)
6	24	LPS (100ng/ml)
7	24	HM + IL-10
8	24	LPS + IL-10
9	24	Hausstaubmilbe (HM) (100 μ g/ml)
10	24	LPS (100ng/ml)
11	24	HM + anti-IL-10
12	24	LPS + anti-IL-10

Stimulationsplan Atopiker

Nr.	Inkubationszeit (h)	Stimulation (Dosis) Atopiker
1	24	Hausstaubmilbe (HM) (100µg/ml)
2	24	LPS (100ng/ml)
3	24	HM + IFN?
4	24	LPS + IFN?
5	24	Hausstaubmilbe (HM) (100µg/ml)
6	24	LPS (100ng/ml)
7	24	HM + IL-10
8	24	LPS + IL-10
9	24	Hausstaubmilbe (HM) (100µg/ml)
10	24	LPS (100ng/ml)
11	24	HM + anti- IL-10
12	24	LPS + anti-IL-10



Ad Abb. 4.11.1.: Atopiker sind in der Lage auf LPS-Stimulation hin mehr MCP-1 zu produzieren als Nicht-Atopiker. Bei einer Präinkubation mit IFN γ kommt es zu einer dezenten Reduktion der LPS-induzierten MCP-1 Produktion in beiden Patientengruppen.

Ad Abb. 4.11.2.: Bei einer Präinkubation mit IL-10 kommt es zu einer dezenten Induktion der LPS-induzierten MCP-1 Produktion in beiden Patientengruppen.

Ad Abb. 4.11.3. Bei einer Präinkubation mit anti-IL-10 kommt es zu einer selektiven Hemmung der MCP-Produktion bei Atopikern, sodass sogar die MCP1-Level eines Nicht-Atopikers erreicht werden.

5. Ergebnisse

5.1. Regulation der Prostanoiden bei DC

Die Isolierung der Monozyten (CD14 positiv) aus dem Blut und deren anschließender Kultur in Kulturmedium mit GM-CSF und IL-4 für ca. 7 Tage resultierte in mehr als 98 % reinen CD1a positiven (CD14 negative) Zellen. Mikroskopisch zeigen diese dendritische Ausläufer und ähneln DC. Weniger als 0,5% der Zellen waren CD3-positiv (Ergebnis 1, Abb. 1.1.).

Die so gewonnenen Zellen waren in der Lage TXB₂, PGE₂ und geringe Mengen PGD₂ zu produzieren (Ergebnis 2, Abb. 4.2.1.-3.). Bestrahlung der DC mit UVB resultierte in nur sehr geringer Prostanoidfreisetzung, während eine Bestrahlung mit UVA in der Lage war, selektiv PGE₂ zu induzieren (Abb.4.2.1.). UVB Bestrahlung modulierte die LPS induzierte Prostanoid-Bildung insofern, als dass eine Bestrahlung unmittelbar vor der LPS Exposition im Vergleich zum LPS Effekt alleine zu einem Anstieg der Sekretion von sowohl TxB₂ als auch PGE₂ führte (Abb.4.2.1.-2.).

Die Expression der mRNA der beiden Cyclooxygenasen wurde von der korrespondierenden Proteinexpression begleitet. Das COX-1-Protein war konstitutiv nachweisbar im Westernblot von DC-Lysaten, während das COX-2-Protein bei mit LPS-stimulierten DC nach 24 und 48 h hochreguliert wurde (Abb. 4.3.2.)

Die Proteinexpression der COX2 war immer mit einer Induktion ihrer mRNA gekoppelt. Die Expression von COX-2 wurde zwischen 2-8 h nach LPS Stimulation beobachtet (Abb. 4.3.1.). Nach 12 h war die COX-2-mRNA immer noch mäßig erhöht, wurde danach aber auf den Background Level reduziert. UVB Bestrahlung vor der LPS Behandlung hat die Zeitkinetik der COX-2 mRNA nicht beeinflusst, jedoch war die Intensität der maximalen Expression verstärkt (Abb. 4.3.1.). UVA Bestrahlung zeigte einen anderen Effekt auf die COX-2-mRNA Expression. Es kam dabei zu einer moderaten mRNA Induktion zu zwei Zeitpunkten, nach 2 und 12 Stunden (Abb. 4.3.1.).

Die näherer Betrachtung der Zeitabhängigkeit der Prostanoid-, insbesondere der TXB₂-Bildung nach LPS-Stimulation, zeigte eine erste Produktionszeit innerhalb von 6 h, die von einem zweiten geringeren Peak bei 16-48 h gefolgt war. LPS ist in der Lage, die TXB₂-Produktion in DC signifikant und kontinuierlich über 48 h hochzuregulieren.

UVB und UVA alleine hatten keinen Einfluss auf die TXB₂-Produktion. (Abb. 4.3.4.).

UVA ist in der Lage die PGE₂-Produktion in DC signifikant und kontinuierlich über 48 h hochzuregulieren. LPS induziert die PGE₂-Produktion geringfügig. UVB hat keinen Einfluss auf die PGE₂-Produktion (Abb.4.3.3.).

Diese Beobachtung zusammen mit der Zeitkinetik der mRNA und der Proteinexpression weist darauf hin, dass in DC beide Cyclooxygenasen zur Prostanoid-Formation beitragen.

Um dieser Annahme nachzugehen, wurden die DC in Gegenwart von spezifischen Inhibitoren der jeweiligen Cyclooxygenasetypen stimuliert. Der spezifische COX-1-Inhibitor Valerylsalicylsäure (VS) war in der Lage, die LPS induzierte PGE₂-Synthese partiell, jedoch signifikant zu unterdrücken. Mit steigender Dosierung der VS-Konzentration konnte eine progrediente Inhibition beobachtet werden (Abb.4.6.1.).

Der spezifische COX-2-Inhibitor NS 398 war ebenfalls in der Lage die LPS induzierte PGE₂-Synthese partiell, jedoch signifikant zu unterdrücken. Mit steigender Dosierung der NS398-Konzentration konnte eine progrediente Inhibition beobachtet werden (Abb.4.6.2.).

Der spezifische COX-1-Inhibitor VS war in der Lage die LPS induzierte TXB₂-Synthese fast vollständig zu unterdrücken. Mit steigender Dosierung der VS-Konzentration war die Inhibition progredient. Bei der Dosierung von 0,001 VS war die Inhibition der LPS induzierten TXB₂-Synthese fast komplett aufgehoben (Abb.4.6.3.).

Der spezifische COX-2-Inhibitor NS 398 war in der Lage die LPS induzierte TXB₂-Synthese fast vollständig zu unterdrücken. Es ergab sich jedoch hierbei keine signifikante Dosisabhängigkeit (Abb.4.6.4.).

Die Kombination aus dem spezifischen COX-1-Inhibitor VS und dem spezifischen COX-2-Inhibitor NS398 war in der Lage, sowohl die LPS induzierte PGE₂-Synthese als auch die TXB₂-Synthese komplett zu hemmen (Abb.4.6.5.-6.).

5.2. Effekte von Inhalationsallergenen auf Prostanoiden und Zytokinen

Neben LPS konnte auch durch Hausstaubmilbenextrakt die PGE₂-Produktion hochreguliert werden; insbesondere in den extrem hohen und den niedrigsten Konzentrationen (Abb.4.4.1.).

Im Gegensatz zum Hausstaubmilbenextrakt war Wiesenlieschgrasextrakt nur in der 10-fachen Konzentration in der Lage, PGE₂ signifikant hochzuregulieren (Abb.4.4.2.).

LPS und die 10-fache Konzentration von Wiesenlieschgrasextrakt waren in der Lage die TXB₂-Produktion hochzuregulieren. Die anderen Wiesenlieschgrasextraktkonzentrationen hatten keinen Einfluß auf die TXB₂-Produktion (Abb.4.4.4.). Hausstaubmilbenextrakt war in keiner Konzentration in der Lage TXB₂ hochzuregulieren (Abb.4.4.3.).

Eine Präinkubation mit von hohen Hausstaubmilbenkonzentrationen war in der Lage die LPS induzierte IL-12 Expression zu inhibieren. Bei niedrigeren Verdünnungsstufen war der Hemmungseffekt rückläufig (Abb.4.7.1.).

IL-12p35 wurde durch die Inkubation der DC mit Hausstaubmilbenkonzentrationen von 1fach, 0,1-fach und 0,01-fach aufreguliert, wobei die stärkste m-RNA Expression bei einer Konzentration von 0,1-fach lag, dies entspricht ca. 1 µg/ml. LPS diente als Positivkontrolle.

IL-12p40 wurde durch die Inkubation der DC mit Hausstaubmilbenkonzentrationen von 10-fach, 1-fach und 0,1-fach herunterreguliert, während es in unstimulierten und in den niedrigen Konzentrationen exprimiert wurde. β-Aktin wird als Housekeeping-Gene konstitutiv in DC exprimiert (Abb.4.8.1.). IL-10 m-RNA konnte nicht nachgewiesen werden.

Nur eine 10-fache Konzentration der Hausstaubmilben war in der Lage die LPS induzierte IL-10 Induktion hochzuregulieren. Die niedrigeren Konzentrationen hatten keinen Effekt auf die LPS induzierte IL-10 Induktion (Abb.4.7.2.).

Für die Regulation der Prostanoid-Produktion sind bestimmte Zytokine notwendig. In Makrophagen ist die Produktion von Prostanoiden über einen autokrinen Mechanismus reguliert, in dem IL-1 und TNFα eine Rolle spielen, die in der Lage sind, die Prostanoidsynthese zu induzieren. Die Stimulation von DC mit entweder 100 U/ml IL-1β, 100 U/ml TNFα oder einer Kombination von beiden führte weder zu einer signifikanten PGE2- und TXB2-Synthese noch zu einer COX-2-mRNA Expression. Gibt man neutralisierenden anti-TNFα oder anti-IL-1β Antikörper dazu oder eine Kombination der beiden Antikörper, führt dies nicht zu einer totalen Inhibierung der LPS induzierten Prostanoid-Produktion. Das Sekretionsmuster der Prostanoiden wurde tiefgreifend durch diese Antikörper moduliert: Die Präsenz von anti-TNFα-Antikörpern steigerte die TXB2-Synthese auf Kosten der PGE2-Produktion, während umgekehrt, anti IL-1β-Antikörper die PGE2-Produktion an hob und die TXB2-Synthese herunterregulierte (Abb.4.5.1.-2.).

Beim nächsten Schritt wurde der autokrine Einfluß der Prostanoiden der DC auf die Zytokinproduktion dieser Zellen untersucht. Gibt man TXB2 oder PGE2 alleine zu einer Kultur von DC hinzu, hat dies keinen Einfluss auf die IL-10 und IL-12 Produktion dieser Zellen. Dem hingegen führt die Zugabe von 1µM PGE2 zu LPS stimulierten DC zu einer fast kompletten Hemmung der IL-12 Produktion, während die IL-10 Produktion um ca. 30 % induziert wurde (Abb. 4.9.1.).

5.3. Regulationsmechanismus von MCP-1

Bei den anschließenden vergleichenden Untersuchungen zwischen Atopikern und Nicht-Atopikern zeigten sich folgende Ergebnisse:

Bei der Expression folgender Oberflächenmarker und Zytokine zeigten sich bei den hier durchgeführten Untersuchungen keine signifikanten Unterschiede zwischen den DC von

Atopikern und denen von Nicht-Atopikern: CD83, CD86, IL12, TNF α , IL-1 β , IL1-Rez-Typ1, IL6, IL6-Rez, GM-CSF, GM-CSF-Rez, PGE2, TxB2 (Daten nicht gezeigt).

Dahingegen war bei 7/8 gepaarten Untersuchungen von alters-und geschlechtsgematchten Paaren nach LPS-Stimulation der aus dem Blut gewonnenen DC die maximale Produktion sowohl von IL-10 als auch von MCP-1 bei Atopikern um das 1,5-2-fache höher als bei Nicht-Atopikern (Abb.4.10.1.-2.).

Atopiker waren in der Lage auf LPS-Stimulation hin mehr MCP-1 zu produzieren als Nicht-atopiker. Bei einer Präinkubation mit IFN γ kam es zu einer dezenten Reduktion der LPS-induzierten MCP-1 Produktion in beiden Patientengruppen (Abb.4.11.1.).

Bei einer Präinkubation mit IL-10 kam es zu einer dezenten Induktion der LPS-induzierten MCP-1 Produktion in beiden Patientengruppen (Abb.4.11.2.).

Bei einer Präinkubation mit anti-IL-10 kam es zu einer signifikanten selektiven Hemmung der MCP-Produktion bei Atopikern, so dass die MCP-1-Level eines Nicht-Atopikers erreicht wurden (Abb.4.11.3.).

6. Diskussion

Bis jetzt beschränken sich die Kenntnisse über die Prostanoid Produktion von dendritischen Zelltypen auf Experimente mit hoch gereinigten humanen LC. Diese produzierten in erster Linie PGD₂ und vernachlässigbare Mengen von anderen Prostanoiden (Rosenbach, 1990). Bei diesen experimentellen Ansätzen kann es zu unphysiologischer Entstehung von Eicosanoiden kommen, weil Arachidonsäure von außen zugegeben wurde, um den Metabolismus über den Cyclooxygenasestoffwechselweg zu stimulieren. Daher ist die physiologische Bedeutung dieser Ergebnisse fraglich; sie weisen daraufhin, dass diese Zellen die „Werkzeuge“ zur Produktion haben, aber nicht darauf, ob sie tatsächlich in physiologischer Weise Produzenten sind. PGE₂ wird von einer großen Anzahl von Zelltypen in den meisten Geweben produziert und von Monozyten im peripheren Blut. Zellaktivierung von Mitogenen, Endotoxinen, IFN oder Antigen-Antikörper Komplexen erhöhen die PGE₂ Produktion (Goodwin, 1977; Goodwin, 1983; Ceuppens 1983).

Die hier präsentierten Daten von hoch gereinigten aus dem Blut gewonnener DC zeigen zum ersten Mal, dass DC die Kapazität zur Synthese besitzen und zur Ausschüttung von großen Mengen bestimmter Prostanoiden in der Lage sind. Bei den Prostanoiden handelt es sich in erster Linie um PGE₂, TXB₂ und kleinen Mengen an PGD₂ und sind daher auch gut vergleichbar mit verschiedenen anderen Zelltypen aus der monozytären Zelllinie. (Grewe, 1992; Gonzalez-Crussi, 1981; Nusing, 1990). 24 h nach LPS Stimulation wurden die Maximalwerte für beide Prostanoiden im Überstand erreicht. Der LPS-Effekt war dosisabhängig und erreichte sein Maximum ab 100 ng/ml. Bei DC ist die Endotoxin-induzierte Prostanoidproduktion am ehesten auf die Aktivität sowohl der COX-1 als auch der COX-2 zurückzuführen. Eine genauere Analyse der Zeitkinetik ihrer Produktion zeigte, dass insbesondere TXB₂ innerhalb der ersten 6 h nach LPS-Stimulation besonders rasch freigesetzt wurde. Dieser Synthesephase folgte eine zweite zwischen 16 h und 48 h. Interessanterweise ging nur der zweiten Synthesephase die Induktion der Expression der mRNA und des Proteins von COX-2 voraus, während RT-PCR und Western-Blot Untersuchungen zur COX-1 eine unveränderte konstitutive Expression zeigten. Diese Beobachtungen legen eine Relevanz beider Cyclooxygenasen für die Prostanoidproduktion von DC nahe. Die initiale schnelle Ausschüttung von TXB₂ muß ein Ergebnis der COX-1 Aktivität sein, da zu diesem frühen Punkt die COX-2 Protein Produktion noch nicht voll erreicht ist. Die spätere Produktionsperiode kann sehr gut durch die Aktivität beider Cyclooxygenase Typen erklärt werden. Zu diesen Zeitpunkten kann eine Proteinexpression für beide Enzyme detektiert werden.

Neben LPS konnte die Prostanoidsynthese durch DC auch durch Bestrahlung der Zellen mit unterschiedlichen Ultraviolett-Lichtqualitäten erreicht werden. UVA1 Bestrahlung induzierte selektiv die PGE₂, nicht jedoch die TXB₂ Synthese. UVB Bestrahlung alleine hatte keinen Effekt, unmittelbar vor LPS-Stimulation der DC führte sie jedoch zu einer deutlichen Superinduktion sowohl der Prostanoidfreisetzung als auch der COX-2 Expression. Auch die Prostanoidfreisetzung nach UVA1 Bestrahlung der DC führte zu einer Induktion der COX-2 mRNA (Hla, 1992), und zwar mit zwei Maxima 2 h und 24 h nach Bestrahlung.

Zusätzlich dazu zeigen die Experimente der spezifischen Inhibierung der beiden Cyclooxygenasen, dass beide an der Produktion der Prostanoiden beteiligt sind. Tatsächlich zeigten Untersuchungen mit Cyclooxygenase Typ-spezifischen Inhibitoren, dass eine selektive Inhibition sowohl des Typ 1 als auch des Typ 2 nur zu einer partiellen Inhibition der Prostanoidsynthese führten. Funktionelle Blockade beider Cyclooxygenasentypen führten dagegen zu einer kompletten Inhibition der PGE₂ und TxB₂ Synthese.

Zusammengefasst zeigen diese Daten, dass die Produktionskapazität für Prostanoiden von der Expression und Funktion von beiden Cyclooxygenase Typen abhängig ist.

PGE₂ hat zahlreiche Funktionen im Immunsystem. Abgesehen von Inhibition von mitogenstimulierten Maus und humanen T-Helferzellproliferation (Goodwin, 1983; Goodwin, 1977) und der Modulation der Zytokinproduktion in Maus T-Zellen (Betz, 1991) inhibiert es die Produktion von IL-2 und TNF α von Maus Makrophagen (Kunkel, 1986) und es supprimiert die humane Killerzell-Aktivität (Goto, 1983). Weiterhin gibt es sich häufende Hinweise, die die Rolle des PGE₂ im Zusammenspiel und Wechsel zwischen den Immunglobulinen zeigt (Phipps, 1991) und es wurde gezeigt, dass PGE₂ mit dem IL-4 synergisiert, was die Induktion der IGE Produktion bei mitogenstimulierten B-Lymphozyten betrifft (Roper, 1990).

Die Einführung des TH1 / TH2 Paradigma der Immunregulation hat zu einer Reevaluierung der Immunpathogenese z.B. der atopischen Dermatitis geführt (Grewe, 1998). Bei Mäusen ist der Th1-Subtyp durch eine vornehmliche Produktion von IFN- γ und IL-2 charakterisiert, während der TH2-Subtyp IL-4, IL-5 und IL-10 synthetisiert. Diese bestimmten Zytokinmuster sind mit spezifischen Funktionen verknüpft (Mosmann, 1989). Die TH1-Zellen sind in die zelluläre Immunantwort involviert, während die TH2-Zellen entscheidend für die humorale Immunantwort sind, insbesondere für die IgE-Synthese (Maggi, 1988) und für die Differenzierung der eosinophilen Granulozyten (Wardlaw, 1995). Eine ähnliche Einteilung in TH1- und TH2-Subtypen wurde bei den menschlichen T-Helferzellen ebenfalls beobachtet (Umetsu, 1988; Romagnani, 1991; Del Prete, 1993), obwohl deren Zytokinprofil heterogener

ist, insbesondere die Expression von IL-2 und IL-10 ist nicht auf spezielle TH-Subtypen beschränkt.

Die Rolle des PGE₂ in der Regulierung der T-Helferzell-Untergruppen wird noch immer diskutiert und bedarf noch weiterer Untersuchungen, aber die Daten, die hier präsentiert werden stützen die Annahme, dass PGE₂ die TH1-Zell Aktivierung inhibiert und dafür möglicherweise die TH2-Zellaktivierung erleichtert.

Die physiologische Bedeutung der bevorzugten PGE₂ und Thromboxan Produktion ist noch unklar. Basierend auf deren physiologischen Funktionen könnte spekuliert werden, dass eine gesteigerte Thromboxan Produktion einen Effekt zum Beispiel auf die Endothelfunktionen hat und es könnte daher sein, dass eine Migration der DC durch die Lymphgefäße vereinfacht wird dadurch, dass Thromboxan die Expression von Adhäsionsmolekülen der Endothelzellen verändert. Die bevorzugte Produktion von PGE₂ ist auf der einen Seite möglicherweise verantwortlich für die gesteigerte Entzündung in bestimmten Gebieten des jeweiligen Organs. Es könnte aber auch auf der anderen Seite dafür verantwortlich sein, die Zytokinproduktion in der Nachbarschaft von aktivierten DC herunterzuregulieren, um so den regionalen Entzündungsprozeß zu limitieren. Untersuchungen an Mäusen haben gezeigt, dass eine Vorbehandlung der Haut mit UVB-Bestrahlung oder externe Applikation von PGE₂ in der Lage war, eine antigen-spezifische Toleranz auf ein Kontaktallergen herbeizuführen (Rheins, 1987).

Die letztere Vermutung wird gestützt durch die Beobachtung, dass PGE₂ sehr stark in die Regulation der Zytokinproduktion der DC involviert ist. PGE₂ scheint einen allgemein bremsenden Effekt auf die DC Interleukin Synthese zu haben, da sowohl IL-10 als auch IL-12 signifikant in ihrer Produktionsrate reduziert sind. Bemerkenswert ist, dass PGE₂ die Produktion eines Leitzytokins, das IL-12, für die TH1-Aktivierung komplett inhibiert. Diese Fähigkeit scheint jedoch nur in unreifen bzw. heranreifenden DC vorhanden zu sein (Kalinski, 1998; Kalinski, 1999). Erhöhte Gewebekonzentrationen von PGE₂ scheint eine TH2-Immunantwort zu induzieren, in dem sie bei DC die IL-12 Produktion unterdrücken und in T-Helferzellen die Produktion von IL-4 und IL-5 fördern (Kalinski, 1997).

Rieser und Bock konnten zeigen, dass PGE₂ die Produktion von IL-12 in Makrophagen, die durch LPS aktiviert wurden, inhibiert. In Abwesenheit von LPS ist PGE₂ jedoch dosisabhängig in der Lage die Produktion von IL-12 in DC zu stimulieren. Alleine vermag PGE₂ die IL-12 Produktion gering zu induzieren, in Kombination mit TNF jedoch zeigt sich ein synergistischer Effekt mit hoher IL-12 Freisetzung. TNF α alleine hatte keinen Effekt auf die IL-12 Produktion. In Anwesenheit von LPS inhibierte PGE₂ die IL-12 Produktion in DC dosisabhängig, was auch in den hier gezeigten Experimenten bestätigt wurde. DC, die mit PGE₂ und

TNF α behandelt wurden, waren hochpotente Stimulatoren der T-Zell Proliferation. Diese Daten zeigen, dass PGE₂ zur Reifung von humanen DC beitragen und dass PGE₂ ein möglicher Stimulator der IL-12 Produktion von humanen DC sein kann (Rieser, 1997).

Während für Thromboxan keine biologischen Effekte auf DC selbst identifiziert werden konnten, war die PGE₂-Synthese von DC für diese selbst von großer funktioneller Bedeutung. PGE₂ ist nicht nur von parakriner Wichtigkeit für die Zytokin-Produktion von DC. Sowohl die COX-1 als auch die COX-2 konnten in Form der m-RNA mittels rt-PCR und das Protein mittels Westernblot nachgewiesen werden, wobei die COX-1 konstitutiv vorhanden zu sein scheint, während die COX-2 aufreguliert wird. Der funktionelle Nachweis konnte durch die Inhibitionsversuche mit den beiden spezifischen Cyclooxygenaseinhibitoren Valerylsalicylat als spezifischer COX-1-Inhibitor (Bhattacharyya, 1995) und NS 398 als spezifischer COX-2-Inhibitor (Futaki, 1994; Kanda, 2002) geführt werden. Aus den Inhibitionsversuchen geht hervor, dass beide Cyclooxygenasen von funktioneller Bedeutung für die Prostanoidsynthese sind. Die Gegenwart von 1 μ M PGE₂ in Kulturen von LPS-stimulierten DC inhibierte die IL-10 Freisetzung um 30-50% und blockierte die IL-12 Produktion vollständig. Umgekehrt führte die Blockade der PGE₂ Produktion durch unspezifische Cyclooxygenase-Inhibitoren zu einer überschießenden Freisetzung beider Zytokine nach LPS-Stimulation von DC. Kelsall et al. konnte zeigen, dass DC hohe Mengen an IL-12 p40 als Antwort auf eine CD40 Bindung an den CD40 Ligand produzieren und dass IL-10 die Kapazität hat, die CD40-induzierte IL-12 p40 Produktion abzubrechen; und zusätzlich ist IL-4 in der Lage, die CD40 induzierte IL-12 p40 Sekretion zu inhibieren und die IL-10 induzierte Inhibition zu verstärken (Kelsall, 1996). In dieser Hinsicht ist es ebenfalls bemerkenswert, dass in DC die proinflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF α in die Prostanoid Produktion involviert sind. In zahlreichen Säugetierzelltypen verschiedenen Ursprungs werden die Prostanoiden und Zytokine über verschiedene Wechselwirkungen reguliert, in welchen die TNF α und IL-1 Produktion autokrin negativ reguliert wird, ausgelöst durch die Ausschüttung und die biologische Aktivität von PGE₂ (Grewe, 1993; Pentland, 1990; Blanton, 1989; Krutmann, 1990). Es gibt jedoch auch einzelne Beobachtungen, in denen z.B. von Keratinozyten produziertes IL-1 α zu einer Aufregulation von COX-2 in Fibroblasten führt und damit zu einer Induktion der PGE₂-Synthese (Raz, 1988; Barr, 1988; Sato, 1997; Dinarello, 1987).

Insbesondere wird die PGE₂-Produktion von TNF und IL-1 in fast jeder der untersuchten Zelltypen der monozytären Zelllinie induziert, und diese zwei Zytokine zusammen sind die autokrinen Mediatoren der Endotoxin induzierten Prostanoid-Produktion. Im Gegensatz dazu waren in DC aus dem Blut weder TNF noch IL-1, noch die Kombination von beiden, in der

Lage die PGE₂ oder TXB₂-Produktion zu induzieren, was darauf hinweist, dass die Regulation der Prostanoid-Produktion der DC sich entscheidend von den anderen aus den Monozyten entstandenen Zelltypen unterscheidet. Diese Annahme wird dadurch bestätigt, dass durch die Blockierung der TNF α und IL-1 Effekte durch die jeweiligen Antikörper die Prostanoidbildung nicht komplett inhibiert werden konnte, obwohl die Experimente einen regulatorischen Effekt auf die Produktion der einzelnen Prostanoiden PGE₂ und TXB₂ aufzeigten. Es scheint so, als ob für eine ausreichende PGE₂ Synthese TNF α benötigt würde, während IL-1 in erster Linie für die Thromboxan Produktion verantwortlich ist. In Anbetracht der Beobachtung, dass die PGE₂ Produktion der DC durch die biologische Aktivität des TNF α unterstützt wird, könnte man spekulieren, dass TNF α die TH-Zellaktivierung indirekt durch eine bevorzugte Induktion des PGE₂ beeinflusst.

Endotoxin, Zytokine und Cox-Inhibitoren sind nicht die einzigen Mediatoren, die die Prostanoid Produktion der aus dem Blut gewonnenen DC in einer quantitativen wie auch qualitativen modulieren können. UV-Bestrahlung ist ein wichtiger physiologischer Stimulus für die DC der Haut. Die aus dem Blut gewonnenen DC könnten ein wichtiges Werkzeug für die Untersuchung der UV-Effekte auf diese Art von Zellen sein, wie auch die UV-Bestrahlung nützlich sein könnte zur Modulation der DC Funktionen in einem möglichen zukünftigen therapeutischen Nutzen dieser Zellen. In Bezug auf die Prostanoid Produktion zeigen die Daten, dass UVB- und UVA-Bestrahlung beide in der Lage sind, die Prostanoid-Bildung zu modulieren. UVB-Bestrahlung alleine hatte überhaupt keinen Einfluss auf die Prostanoid-Bildung der DC (Ikai, 1989), und das unterscheidet sich entscheidend von dem Einfluss, den die UVB-Bestrahlung auf die Keratinozyten hat (Grewé, 1993). Inkubiert man jedoch die Zellen vorher mit Endotoxin steigt die Prostanoid-Produktion entscheidend im Gegensatz zu nur Endotoxin exponierten Zellen. Die Präaktivierung scheint die UVB-Bestrahlungseffekte auf die Prostanoid-Bildung zu bahnen, was darauf hindeutet, dass unter vorbestehenden entzündlichen Bedingungen, UVB-Licht in der Lage ist, die Entzündung über die Bildung von Prostanoiden aus DC zu modulieren. Der zusätzliche Effekt der UVB-Bestrahlung wird weiter gestützt durch die Superinduktion von COX-2-mRNA in DC, die mit Endotoxin und UVB behandelt wurden.

Im Gegensatz zum UVB- ist die UVA-Bestrahlung in der Lage, selbst die Prostanoid-Synthese sowie die COX-2 Expression zu induzieren. Die Zeitkinetik der COX-2 mRNA Expression in DC nach UVA1-Bestrahlung ist ähnlich den Zeitkinetiken, die bei verschiedenen anderen UVA1 induzierbaren Genen beobachtet wurde, als ein Prototyp sei das ICAM-1 aufgeführt (Krutmann, 1995). Von daher kann angenommen werden, dass ähnliche

Mechanismen der Genregulation ebenfalls in DC vorkommen, und dass diese Zelllinie als ein wichtiges immunologische Ziel der UVA1-Bestrahlung dient. Die Prostanoiden der DC könnten zu den Mediatoren gehören, die verantwortlich sind für die komplexen, immunmodulatorischen Effekte der UVA1-Bestrahlung. Die selektive Synthese des PGE₂, aber nicht des TXB₂, könnte zu der Annahme führen, dass die UVA1-Bestrahlung zu einer Hemmung der Zytokin-Produktion über das PGE₂ führt. Dies könnte zu den antiinflammatorischen Effekten der UVA-Therapie bei entzündlichen Erkrankungen beitragen (Krutmann, 1998; Stege, 1996; Stege, 1997; Krutmann, 1999; Krutmann, 2000).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass diese Beobachtungen zeigen, dass aus dem Blut gewonnene DC in der Lage sind, Prostanoiden, insbesondere PGE₂ und TXB₂ zu bilden. Ihre intrazelluläre Synthese wird durch die beiden Cyclooxygenasen 1 und 2 intrazellulär, und durch TNF α und IL-1 β extrazellulär reguliert. DC dienen nicht nur als Prostanoidhersteller, sondern auch als Zielzellen. Dies trifft zumindest für PGE₂ auf eine para- und autokrine Weise zu. Dadurch können sie an der Aktivierung einer TH-1 oder TH-2 Reaktion durch die Produktion entsprechender Zytokinen beteiligt sein.

Im Rahmen der Prostanoidproduktion zeigten sich keine spezifischen Unterschiede zwischen atopischen und nicht-atopischen DC. Im Gegensatz dazu führte die Charakterisierung weiterer Mediatoren zu Erkenntnissen über spezifische Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen atopischen und nicht-atopischen DC. Beide DC Phänotypen werden durch unterschiedliche Inhalationsallergene in ihrem funktionellen Verhalten beeinflusst. Dies betrifft insbesondere die Reifung und das Priming für die Synthese von auch für die T-Zelldifferenzierung und –stimulierung wichtiger Mediatoren wie IL-12 und IL-10. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte als wohl interessantestes Ergebnis erstmals ein spezifischer funktioneller Unterschied zwischen atopischen und nicht-atopischen DC festgestellt werden: Die Synthesekapazität für MCP-1 und in geringerem Maße auch für IL-10 war in atopischen DC wesentlich stärker ausgeprägt als in nicht atopischen. Die bisher vorliegenden Arbeiten beschäftigten sich noch nicht mit der Bedeutung dieses Befundes für die T-Zell-Aktivierung und Differenzierung. MCP-1 knock-out Mäuse jedoch zeigten eine Unfähigkeit zur Ausbildung von TH2-Zellende (De Schoolmeester, 2003; Traynor, 2002; Kim, 2001; Huang, 2001), und diese Beobachtung verleitet zu der Spekulation, dass evtl. eine Überproduktion von MCP-1 zu einer verstärkten Ausprägung von TH2-Zellen führt, wie es ja in vivo in Atopikern beobachtet wird. Bei einer Präinkubation mit IFN γ , ein TH1-Zytokin, kam es zu einer dezenten Reduktion der LPS-induzierten MCP-1 Produktion in beiden Patientengruppen.

Bei einer Präinkubation mit IL-10, ein TH2-Zytokin, kam es zu einer dezenten Induktion der LPS-induzierten MCP-1 Produktion in beiden Patientengruppen. Bei einer Präinkubation mit anti-IL-10 kam es zu einer signifikanten selektiven Hemmung der MCP-Produktion bei Atopikern, so dass die MCP-1-Level eines Nicht-Atopikers erreicht wurden.

Die Beobachtung der verstärkten MCP-1 Produktion erfährt durch die Möglichkeit ihrer Normalisierung einen weiteren wichtigen Aspekt. Es scheint denkbar, dass ex vivo generierte humane DC von Atopikern in vitro „normalisiert“ werden können und damit eine therapeutische Möglichkeit für atopische Erkrankungen eröffnen.

7. Zusammenfassung

Das atopische Ekzem beruht unter anderem auf einer angeborenen Fehlregulation des Immunsystems gegenüber Inhalations- und Nahrungsmittelallergenen, die zur Auslösung einer T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion in der Haut führt. Im vorliegenden Projekt wurde die Mediatorsynthese von antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (DC) und ihre mögliche Bedeutung für die T-Zell-Aktivierung untersucht. Diese Untersuchungen wurden an aus peripherem Blut differenzierten DC durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass DC in der Lage sind, auf verschiedene Stimuli Prostanoiden zu bilden. Die Prostanoidproduktion wurde sowohl über die COX-1 als auch durch die de novo Expression der COX-2 reguliert. DC erwiesen sich nicht nur als Produzenten von Prostanoiden, sondern konnten auch als Zielzellen für biologische Wirkungen insbesondere von PGE₂ identifiziert werden. Erstmals konnten autokrine Wechselwirkungen von DC-synthetisierte Prostanoiden und der Synthese von Interleukin-12 und Interleukin-10 durch diese Zellen nachgewiesen werden. Nach der Charakterisierung der Prostanoidproduktion wurden vergleichende Untersuchungen zur Mediatorsynthese von DC von Atopikern versus Nicht-Atopikern durchgeführt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Mediatorfreisetzung von nicht-atopischen als auch atopischen DC durch eine Vorinkubation mit Inhalationsallergenen moduliert werden kann. Hierbei zeigten sich jedoch keine Unterschiede in Hinblick auf die Prostanoiden als auch auf TH1- und TH2-typische Zytokine (IL-10, IL-12). Mit MCP-1 konnte jedoch ein Mediator identifiziert werden, der in typischer Weise von atopischen DC signifikant stärker synthetisiert wird und ebenfalls wesentlich stärker induzierbar ist. Die MCP-1-Synthese konnte durch Präinkubation mit typischen Inhalationsallergenen zudem wesentlich verstärkt werden. Diese Eigenart von atopischen DC konnte normalisiert werden, indem den DC-Kulturen neutralisierende anti-IL-10 Antikörper zugesetzt wurden.

Die vorgestellte Arbeit konnte erstmals die Prostanoidsynthese in humanen, aus dem peripheren Blut gewonnenen DC charakterisieren. Die Prostanoidsynthese in DC unterliegt dem Einfluß unterschiedlicher exogener Mediatoren und Stimuli, sowie der Aktivität beider Cyclooxygenasetypen. PGE₂ spielt eine autokrine Rolle in der Mediatorfreisetzung von DC. Die weiteren Untersuchungen haben jedoch auch gezeigt, dass sich die Prostanoidproduktion von atopischen und nicht-atopischen DC nicht wesentlich unterscheidet.

Im Gegensatz dazu führte die Charakterisierung weiterer Mediatoren zu Erkenntnissen über spezifische Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen atopischen und nicht-atopischen DC. Beide DC Phänotypen werden durch unterschiedliche Inhalationsallergene in ihrem

funktionellen Verhalten beeinflusst. Dies betrifft insbesondere die Reifung und das Priming für die Synthese von auch für die T-Zelldifferenzierung und –stimulierung wichtiger Mediatoren wie IL-12 und IL-10. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte als wohl interessantestes Ergebnis erstmals ein spezifischer funktioneller Unterschied zwischen atopischen und nicht-atopischen DC festgestellt werden: Die Synthesekapazität für MCP-1 war in atopischen DC wesentlich stärker ausgeprägt als in nicht atopischen. Die bisher vorliegenden Arbeiten beschäftigten sich noch nicht mit der Bedeutung dieses Befundes für die T-Zell-Aktivierung und Differenzierung. MCP-1-knock-out Mäuse jedoch zeigten eine Unfähigkeit zur Ausbildung von TH2-Zellen, und diese Beobachtung verleitet zu der Spekulation, dass evtl. eine Überproduktion von MCP-1 zu einer verstärkten Ausprägung von Th2-Zellen führt, wie es in vivo in Atopikern beobachtet wird.

Die Beobachtung der verstärkten MCP-1-Produktion erfährt durch die Möglichkeit ihrer Normalisierung einen weiteren wichtigen Aspekt. Es scheint denkbar, dass ex vivo generierte humane DC von Atopikern in vitro „normalisiert“ werden können und damit eine therapeutische Möglichkeit für atopische Erkrankungen eröffnen.

8. Literatur

Aiba-S; Kats-SI: J-Immunol. 1991; 146:2479 The ability of cultured Langerhans cells to process and present protein antigen is MHC dependent.

Azzawi-M; Bradley-B; Jeffery-PK; Frew-AJ; Wardlaw-AJ; Knowles-G; Assoufi-B; Collins-JV; Durham-S; Kay-AB : Am. Rev. Resp. Dis. 1990; 142: 1407-13 Identification of activated T lymphocytes and eosinophils in bronchial biopsies in stable atopic asthma.

Azzawi-M; Johnston-PW; Majumdar-S; Kay-AB; Jeffery-PK: Am. Rev. Resp. Dis. 1992; 145: 1477-82 T-lymphocytes and activated eosinophils in airway mucosa in fatal asthma and cystic fibrosis.

Barr-RM; Symonds-PH; Akpan-AS; Greaves-MW: Exp. Cell. Res. 1988; 198 (2): 321-7 Culture of human dermal fibroblasts in collagen gels: modulation of interleukin 1-induced prostaglandin E₂ synthesis by an extracellular matrix.

Bentley-AM; Meng-Q; Robinson-DS; Hamid-Q; Kay-AB; Durham-SR: Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 1993; 8: 35-42 Increases in activated T lymphocytes, eosinophils and cytokine mRNA expression for interleukin-5 and granulocyte/macrophage colony-stimulating factor in bronchial biopsies after allergen challenge in atopic asthmatics.

Betz-M; Fox-B: J. Immunol. January 1991; 146 (1) : 108-13 Prostaglandin E₂ inhibits production of Th1 lymphokines but not of Th2 lymphokines.

Bhattacharyya-DK; Lecomte-M; Dunn-J: Arch. Biochem. Biophys. 1995; 317: 19-24 Selective inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-1 (cyclooxygenase-1) by valeryl salicylic acid.

Blanton-RA; Kupper-TS; McDougall-JK; Dower-S: Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1989; 86: 1273-7 Regulation of IL-1 and its receptor in human keratinocytes.

Bradley-BL; Azzawi-M; Jacobson-M; Assoufi-B; Collins-J-V; Irani-AMA; Schwartz-LB; Durham-SR; Jeffery-PK; Kay-AB: J. Allergy Clin. Immunol. 1991; 88: 661-74 Eosinophils,

T-lymphocytes, mast-cells, neutrophils, and macrophages in bronchial biopsy specimens from atopic subjects with asthma-comparison with biopsy specimens from atopic subjects without asthma and normal control subjects and relationship to bronchial hyperresponsiveness.

Brown-DM; Phipps-RP: *Cell Immunol.* 1995 Mar;161(1):79-87 Characterization and regulation of prostaglandin E2 receptors on normal and malignant murine B lymphocytes.

Bruijnzeel-Koomen-C; C.A.F.M.; van-Wichen-D-F; Spry-CJ; Venge-P; Bruijnzel-PLB; *Br. J. Dermatol.*,1988a; 118: 229-38 Active participation of eosinophils in patch test reactions to inhalant allergens in patients with atopic dermatitis.

Cella-M; Engering-A; Pinet-V; Pieters-J; Lanzavecchia-A: *Nature*; 388: 782-6 Inflammatory stimuli induce accumulation of MHC class II complexes on dendritic cells.

De-Schoolmeester-ML; Little-MC; Rollins-BJ; Else-J: *Immunol.* 2003 May 1; 170(9): 4693-700. Absence of CC chemokine ligand 2 results in an altered Th1/Th2 cytokine balance and failure to expel *Trichuris muris* infection.

Del-Prete-G; De-Carli-M; Almerigogna-F; Giudizi-MG; Biagotti-R; Romagnani-S: *J Immunol.* 1993 Jan 15;150(2):353-60 Human IL-10 is produced by both type 1 helper (Th1) and type 2 helper (Th2) T cell clones and inhibits their antigen-specific proliferation and cytokine production.

Dieter-P: *J. Immunol. Methods.* 1994 Sep 14;174(1-2):223-9 Arachidonic acid and eicosanoid release.

Dionarello-CA : *Immunol-Lett.* 1987 Dec; 16 (3-4) : 227-31 The biology of interleukin 1 and comparison to tumor necrosis factor.

Djukanovic-R; Wilson-JW; Britten-KM; Wilson-SJ; Walls-AF; Roche-WR; Howarth-PH; Holgate-ST ; *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1990; 142: 863-71 Quantitation of mast cells and eosinophils in the bronchial mucosa of symptomatic atopic asthmatics and healthy control subjects using immunohistochemistry.

Enk-AH; Angeloni-VL; Udey-MC; Katz-SI: J. Immunol., 1993; 151: 2390-8 Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance.

Enk-AH; Jonuleit-H; Saloga-J; Knop-J: Int. J. Cancer, 1997; 73: 309-16 Dendritic cells as mediators of tumor-induced tolerance in metastatic melanoma.

Enk-AH; Saloga-J; Becker-D; Mohamadzadeh-M; Knop-J: J. Exp. Med., 1994; 179: 1397-402 Induction of hapten-specific tolerance by interleukin 10 in vivo.

Frew-AJ; O`Hehir-RE: J. Allergy Clin. Immunol., 1992; 89: 783-8 What can we learn from studies of lymphocytes present in allergic-reaction sites?

Futaki-N; Takahashi-S; Yokoyama-M: Prostaglandins 1994; 47, 55-9 NS-398, a new anti-inflammatory agent, selectively inhibits prostaglandin G/H synthase/ cyclooxygenase (COX-2) activity in vitro.

Godiska-R; Chantry-D; Raport-CJ; Sozzani-S; Allavena-P; Leviten-D; Mantovani-AF; Gray-PW: J. Exp. Med., 1997; 185: 1595-604 Human macrophage-derived chemokine (MDC), a novel chemoattractant for monocytes, monocyte-derived dendritic cells, and natural killer cells.

Gonzalez-Crussi-F; Hsueh-W; Wiederhold-MD: Am-J-Clin-Pathol. 1981 Feb; 75 (2) : 243-53 Prostaglandins in histiocytosis-X. PG synthesis by histiocytosis-X cells.

Goodwin-JS; Bankhurst-AD; Messner-RP : J-Exp-Med. 1977 Dec; 146 (6) : 1719-34 Suppression of human T-cell mitogenesis by prostaglandin. Existence of a prostaglandin-producing suppressor cell.

Goodwin-JS; Ceuppens-J: J. Clin. Immunol. 1983; 3: 295 Regulation von Immune response by prostaglandins.

Goto-T; Herberman-RB; Maluish-A; Strong-DM: J.Immunol. 1983; 130: 1350 Cyclic AMP as a mediator of prostaglandin E-induced suppression of human natural killer cell activity.

Grewe-M; Duyster-J; Dieter-P; Henninger-H; Schulze-Specking-A; Decker-K: Biol Chem Hoppe-Seyler 1992; 373: 655-64 Prostaglandin D₂ and E₂ Synthese in rat Kupffer cells are antagonistically regulated by LPS and phorbol ester.

Grewe-M; Trefzer-U; Ballhorn-A; Gyufko-K; Henninger-HP; Krutmann-J: J of Invest. Dermatology 1993, Vol.101,4: 528-31: Analysis of the mechanism of ultraviolet (UV) B radiation-induced prostaglandin E₂ synthesis by human epidermoid carcinoma cells

Grewe-M; Bruijnzeel-Koomen-CA; Schöpf-E; Thepen-T; Langeveld-Wildschut-AG; Ruzicka-T; Krutmann-J: Immunol Today 1998 Aug; 19(8): 359-61 A role for Th1 and Th2 cells in the immunopathogenesis of atopic dermatitis.

Groux-H; O`Garra-A; Bigler-M; Rouleau-M; Antonenko-S; deVries-JE; Roncarolo-MG: Nature 1997; 389: 737-42 A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis.

Heufler-C; Koch-F; Schuler-G: J. Exp. Med. 1988; 167: 700-5 Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor and interleukin-1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells.

Hla-R; Neilson-K : Proc-Natl-Acad-Sci. August 1992; Vol 89 : 7384-88 Human cyclooxygenase-2 cDNA

Holt-PG; Haining-S; Nelson-DJ; Sedgwick-JD: J. Immunol. 1994; 153: 256-61 Origin and steady-state turnover of class II MHC-bearing dendritic cells in the epithelium of the conducting airways.

Huang-DR; Wang-J; Kivisakk-P; Rollins-BJ; Ransohoff-RM: J. Exp. Med. 2001 Mar 19; 193(6): 713-26. Absence of monocyte chemoattractant protein 1 in mice leads to decreased local macrophage recruitment and antigen-specific T helper cell type 1 immune response in experimental autoimmune encephalomyelitis.

Ikai-K; Ujihara-M; Kanauchi-H; Urade-Y: J-Invest-Dermatol.1989 Sep; 93 (3) : 345-8 Effect of ultraviolet irradiation on the activity of rat skin prostaglandin D synthetase.

Kalinski-P; Hilkens-CM; Snijders-A; Snijdewint-FG; Kapsenberg-ML : Adv-Exp-Med-Biol. 1997; 417: 363-7 Dendritic cells, obtained from peripheral blood precursors in the presence of PGE₂, promote TH₂ responses.

Kalinski-P; Hilkens-CM; Snijders-A; Snijdewint-FG; Kapsenberg-ML : J-Immunol. 1997 Jul 1; 159 (1) : 28-35 IL-12-deficient dendritic cells, generated in the presence of prostaglandin E₂, promote type 2 cytokine production in maturing human naive T helper cells.

Kalinski-P; Schuitemaker-JH; Hilkens-CM; Kapsenberg-ML : J-Immunol. 1998 Sep 15; 161 (6) : 2804-9 Prostaglandin E₂ induces the final maturation of IL-12 deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation.

Kalinski-P; Schuitemaker-JH; Hilkens-CM; Wierenga-EA; Kapsenberg-ML: J-Immunol. 1999 Mar 15; 162 (6) : 3231-6 Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN- γ and to bacterial IL-12 inducers: decreased ability of mature dendritic cells to produce IL-12 during the interaction with Th cells.

Kanda-N, Watanabe-S: J. Invest. Dermatol. 2002 Nov; 119(5): 1080-9 Cyclooxygenase-2 inhibitor enhances whereas prostaglandin E₂ inhibits the production of interferon-induced protein of 10 kDa in epidermoid carcinoma A431.

Kang-Rotondo-C; Miller-CC; Morrison-AR; Pentland-AP : Am-J-Physiol.Feb.1993; 264 (2 Pt 1): 396-401 Enhanced keratinocyte prostaglandin synthesis after UV injury is due to increased phospholipase activity.

Kapsenberg-ML; Wierenga-EA; Bos-JD; Jansen-HM: Immunol. Today, 1991; 12: 392-5 Functional subsets of allergen-reactive human CD4+ T cells.

Kapsenberg-ML; Hilkens-CM; Wierenga-EA; Kalinski-P : Clin-Exp-Allergy 1999 Jun; 29 Suppl 2: 33-6 The paradigm of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. Implications for atopic allergy.

Kay-AB; Ying-S; Varney-V; Gaga-M; Durham-SR; Moqbel-R; Wardlaw-AJ; Hamid-Q; J. Exp. Med., 1991; 173: 775-8 Messenger RNA expression of the cytokine gene cluster interleukin 3 (IL-3), IL-4, IL-5 and granulocyte/macrophage colony stimulating factor, in allergen-induced late-phase cutaneous reactions in atopic subjects.

Kelsall-BL; Stuber-E; Neurath-M; Strober-W; Ann N Y Acad Sci. 1996 Oct 31;795:116-26 Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses.

Kim-Y; Sung-SS; Kuziel-WA; Feldman-S; Fu-SM; Rose-CE: J Immunol. 2001 Apr 15; 166(8): 5183-92 Enhanced airway Th2 response after allergen challenge in mice deficient in CC chemokine receptor-2 (CCR2).

Knolle-PA; Uhrig-A; Hegenbarth-S; Loser-E; Schmitt-E; Gerken-G; Lohse-AW: Clin Exp Immunol 1998 Dec; 114(3): 427-33 IL-10 down-regulates T cell activation by antigen-presenting liver sinusoidal endothelial cells through decreased antigen uptake via the mannose receptor and lowered surface expression of accessory molecules.

Krueger-GG; Daynes-RA; Emam-M: Proc Natl Acad Sci 1982; USA 80: 1650-4 Biology of Langerhans cells: selective migration of Langerhans cells into allogeneic and xenogeneic grafts on nude mice.

Krutmann-J; Köck-A; Schauer-E; Parlow-F; Moller-A; Kapp-A; Forster-E; Schöpf-E; Luger-TA: J Invest Dermatol 1990 Aug; 95(2): 127-31 Tumor necrosis factor beta and ultraviolet radiation are potent regulators of human keratinocyte ICAM-1 expression.

Krutmann-J; Grewe-M: J Invest Dermatol 1995 Jul; 105(1 Suppl): 67S-70S Involvement of cytokines, DNA damage, and reactive oxygen intermediates in ultraviolet radiation-induced modulation of ICAM-1 expression

Krutmann -J; Diepgen-TL; Luger-TA; Grabbe-S; Meffert-H; Sönnichsen-N; Czech-W; Kapp-A; Stege-H; Grewe-M; Schöpf-E: J Am Acad Dermatol 1998 Apr; 38(4): 589-93 High-dose UVA1 therapy for atopic dermatitis: results of a multicenter trial.

Krutmann-J; Morita-A: J Invest Dermatol Symp Proc. 1999 Sep; 4(1): 70-2 Mechanisms of ultraviolet (UV) B and UVA phototherapy

Krutmann-J: Clin Exp Dermatol 2000 Oct; 25(7): 552-558 Phototherapy for atopic dermatitis

Kunkel-SL; Wiggins-RC; Chensue-SW; Larrick-J: Biochem-Biophysical-Research-Comm. May 1986; 137 (1) : 404-10 Regulation of macrophage tumor necrosis factor production by prostaglandin E2.

Lenz-A; Heine-M; Schuler-G; Romani-N: J Clin Invest 1993; 92: 2587-96 Human and murine dermis contain dendritic cells. Isolation by means of a novel method and phenotypical and functional characterization.

Luger-TA; Bhardwaj-RS; Grabbe-S; Schwarz-T: J. Dermatol. Sci. 1996; 13: 5-10 Regulation of the immune response by epidermal cytokines and neurohormones.

Macatonia-SE; Knight-SC; Edwards-AJ; Griffiths-S; Fryer-P: J. Exp. Med. 1987; 166: 1654-67 Localization of antigen on lymph node dendritic cells after exposure to the contact sensitizer fluorescein isothiocyanate. Functional and morphological studies.

Maggi-E; Del-Prete-G; Macchia-D: Eur. J. Immunol. 1988 Jul;18(7):1045-50 Profiles of lymphokine activities and helper function for IgE in human T cell clones.

Maurer-D, Stingl-G: J. Invest. Dermatol. 1995 May;104(5):707-10 Immunoglobulin E-binding structures on antigen-presenting cells present in skin and blood.

Metz-DP; Bacon-AS; Holgate-S; Lightman-SL: J. Allergy Clin. Immunol. 1996; 98: 686-96 Phenotypic characterization of T-cells infiltrating the conjunctivas in chronic allergic eye disease.

Meunier-L; Gonzalez-Ramos-A; Cooper-DK: J Immunol 1993; 151: 4067-80 Heterogeneous populations of MHC class II cells in human dermal suspensions. Identification of a small subset responsible for potent dermal antigen-presenting cell activity with features analogous to Langerhans cells.

Mommaas-AM; Mulder-AA; Out-CJ; Girolomoni-G; Koerten-HK; Vermeer-BJ; Koning-FD: Eur. J. Immunol., 1995; 25:520-5 Distribution of HLA class II molecules in epidermal Langerhans cells in situ.

Mosmann-TR; Coffman-RL: Annu. Rev. Immunol. 1989;7:145-73 TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties.

Niizeki-H; Streilein-JW: J. Invest. Dermatol., 1997; 309-16 Hapten-specific tolerance induced by acute, low-dose ultraviolet B radiation of skin is mediated via interleukin-10.

Nüsing-R; Lesch-R; Ullrich-V : Eicosanoids. 1990; 3 (1) 53-8 Immunohistochemical localization of thromboxane synthase in human tissues.

Ozawa-H; Aiba-S; Nakagawa-N; Tagami-H: Eur. J. Immunol., 1996; 26: 648-52 Interferon- γ and interleukin-10 inhibit antigen presentation by Langerhans cells for T helper type 1 cells by suppressing their CD80 (B7-1) expression.

Pentland A; Mahoney-M: J. Invest. Dermatol. 1990; 94: 43-6, Keratinocyte Prostaglandin synthesis is enhanced by IL-1.

Phipps-RP; Stein-SH, Roper-RL: Immunol Today 1991; 12: 349 A new view of prostaglandin regulation of the immune response.

Poston-RN; Chanez-P; Lacost-JY; Litchfield-T; Lee-TH; Bousquet-J: Am. Rev. Respir. Dis., 1992; 145: 918-21 Immunohistochemical characterisation of the cellular infiltration in asthmatic bronchi.

Raz-A; Wych-A; Siegel-N; Needleman-P: J Biol. Chem. 1988; 263: 3021-28 Regulation of fibroblast cyclooxygenase synthesis by interleukin-1.

Rheins-LA; Barnes-L; Amornsiripanitch-S; Collins-CE; Nordlund-JJ: Cell-Immunol. 1987 Apr 15; 106 (19) : 33-42 Suppression so the cutaneous immune response following topical application of the prostaglandin PGE₂.

Rieser-C; Bock-G; Klocker-H; Bartsch-G; Thurnher-M : J-Exp-Med. 1997 Nov 3; 186(9) : 1603-8 Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells; synergistic activation of interleukin 12 production.

Romagnani-S: Immunol Today. 1991 Aug;12(8):256-7 Human TH1 and TH2 subsets: doubt no more.

Roper-RL; Conrad-DH; Brow-DM; Warner-GL; Phipps-RP: J. Immunol., 1990; 145: 2644 Prostaglandin E2 promotes IL-4 induced IgE und IgG1-Synthese.

Rosenbach-T; Czernielewski-J; Hecker-M; Czarnetzki-B : J-Invest-Dermatol. 1990 Jul; 95 (1): 104-7 Comparison of eicosanoid generation by highly purified human Langerhans cells and keratinocytes.

Ruzicka-T; Aubock-J : J-Immunol. 1987 Jan 15; 138 (2) : 539-43 Arachidonic acid metabolism in guinea pig Langerhans cells: studies on cyclooxygenase and lipoxygenase pathways.

Ruzicka-T; Ring-J: Acta-Derm-Venereol. 1987; 67(6): 469-75 Enhanced releasability of prostaglandin E2 and leukotrienes B4 and C4 from leukocytes of patients with atopic eczema

Sallusto-F; Cella-M; Danielli-C; Lanzavecchia-A: J. Exp. Med., 1995; 182:389-400 Dendritic cells use macropinocytosis cytokines and bacterial products.

Sato-T; Kirimura-Y; Mori-Y : J-Invest-Dermatol., Sep. 1997; 109 (3) : 334-9 The co-culture of dermal fibroblasts with human epidermal keratinocytes induces increased prostaglandin E2 production and cyclooxygenase 2 activity in fibroblasts.

Schreiber-S; Kilgus-O; Payer-E; Kutil-R; Elbe-A; Mueller-C; Stingl-G: J. Immunol. 1992; 149: 3524-34 Cytokine pattern of Langerhans cells isolated from murine epidermal cell cultures.

Schuler-G: CRC Press, Boca Raton, Fl. 1991: Epidermal Langerhans Cells

Schuler-G; Steinmann-RM: J Exp Med, 1985; 161: 526-46. Murine epidermal Langerhans cells mature into potent immunostimulatory dendritic cells in vitro.

Schuler-G; Thurner-B; Romani-N: Int. Arch. Allergy Immunol., 1997; 112: 317-22. Dendritic cells: from ignored cells to major players in T cell-mediated immunity.

Silberberg-Sinakin-I; Thorbecke-GJ; Baer-RL; Rosenthal-SA; Berezowsky-V: Cell. Immunol., 1976; 166: 1654-67 Antigen-bearing Langerhans cells in skin, dermal lymphatics and in lymph nodes.

Sozzani-S; Sallusto-F; Luini-W, Zhou-D; Pietmontli-L; Allavena-P; VanDamme-J; Valitutti-S; Lanzavecchia-A; Mantovani-A: J. Immunol., 1995; 155: 3292-6 Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a and a distinct set of chemokines.

Stege-H; Schöpf-E; Ruzicka-T; Krutmann-J: Lancet 1996 Jan 6; 357(8993): 64 High-dose UVA1 for urticaria pigmentosa.

Stege-H; Berneburg-M; Humke-S; Klammer-M; Grewe-M; Grether-Beck-S; Boedeker-R; Diepgen-T; Kierks-K; Goerz-G; Ruzicka-T; Krutmann-J: J Am Acad Dermatol. 1997 Jun; 36 (6 Pt 1): 938-44 High-dose UVA1 radiation therapy for localized scleroderma.

Steinbrink-K; Wölfl-M; Jonuleit-H; Knop-J; Enk-A-H: J. Immunol., 1997; 159: 4772-80. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells.

Steinman-RM : Annu-Rev-Immunol., 1991; 9: 271 The dendritic cell system and its role in immunogenicity.

Traynor-TR; Herring-AC; Dorf-ME; Kuziel-WA; Toews-GB; Huffnagel-GB: J Immunol. 2002 May 1; 168(9): 4659-66 Differential roles of CC chemokine ligand 2/monocyte chemoattractant protein-1 and CCR2 in the development of T1 immunity.

Umetsu-DT; Jabara-HH; de Kruyff-RH; Abbas-AK; Abrams-JS; Geha-RF: J. Immunol., 1988 Jun 15; 140(12): 4211-16 Functional heterogeneity among human inducer T cell clones.

Van-Reijssen-FC; Bruijnzeel-Koomen-CAF; Kalthoff-FS; Maggi-E; Romagnani-S; Westland-JKT; Mudde-G-C: *J. Allergy Clin. Immunol.*, 1992; 90: 184-92 Skin-derived aeroallergen-specific T-cell clones of Th2 phenotype in patients with allergic dermatitis.

Wardlaw-AJ; Moqbel-R and Kay-AB: *Adv. Immunol.*, 1995;60:151-166 Eosinophils: biology and role in disease.

Wierenga-EA; Snoek-M; De-Groot-C; Chretien-I; Bos-JD; Jansen-HM; Kapsenberg-ML: *J. Immunol.*, 1990; 144: 4651-6 Evidence for compartmentalization of functional subsets of CD4+ T lymphocytes in atopic patients.

Wilson-JW; Djukanovic-R; Howart-PH; Holgate-ST: *Am. Rev. Respir. Dis.*, 1992; 145: 17-26 Lymphocyte activation in bronchoalveolar lavage and peripheral blood in atopic asthmatics.

Xu-LL; Warren-MK; Rose-WIL; Gong-WH; Wang-JM: *J. Leukocyte Biol.*, 1996; 60: 365-71 Human monocyte chemoattractant protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro.

Zweiman-B: *Curr. Opin. Immunol.*, 1993; 5: 950-5 The late-phase reaction: role of IgE, its receptor and cytokines.

Danksagungen

Herrn PD Dr. Markus Grewe danke ich für die Überlassung des Themas, die intensive Betreuung und die stete Gesprächsbereitschaft bei der Erstellung der Dissertation, auch wenn dabei „manches Solitaire-Spiel unterbrochen werden musste“. Als medizinische Doktorandin in seiner Arbeitsgruppe hatte ich oft Gelegenheit, meinen Beitrag zur Arbeit auf Tagungen vorstellen zu dürfen. Für die Möglichkeit, eigene Arbeiten präsentieren zu können, bin ich ihm zu besonderem Dank verpflichtet. In seiner Arbeitsgruppe möchte ich den technischen Assistentinnen Frau Nicole Gross und Frau Biggi Marx danken.

Mein Dank gilt auch insbesondere Herrn Prof. Dr. Jean Krutmann für die Möglichkeit, über Jahre in seiner Arbeitsgruppe mitzuwirken, sowohl als biologisch-technische Assistentin als auch später während meines Studiums als studentische Hilfskraft. Seiner Arbeitsgruppe insbesondere den technischen Assistentinnen Frau Viola Kürten und Frau Kathrin Vogelsang möchte ich für die zuverlässige Zusammenarbeit und die Bereitschaft, mich in neue molekularbiologische Techniken einzuarbeiten, danken.

Herrn PD Dr. Martin Wagenmann danke ich für die freundliche Begutachtung dieser Dissertation.

CURRICULUM VITAE

Name: Michaela Alexandra Ostendorf geb. Klammer
Adresse: Königstr. 39-41, 41460 Neuss
Geburtsdatum: 01.11.1970
Geburtsort: Zell am Harmersbach
Konfession: römisch-katholisch
Familienstand: verheiratet
Ehemann: Dr. med. Benedikt Ostendorf
Eltern: Heinz Klammer
Angela Klammer geb. Lehmann
Geschwister: Claudia Klammer, Patrick Klammer

Schulbildung: 1977-1981 Grundschule, Zell-Unterharmersbach
1981-1990 Grimmelshausen Gymnasium, Offenburg
1990 Abitur

Hochschulausbildung: SS 1995 - SS 2001 Studium der Humanmedizin
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf

10/2000 - 9/2001 Praktisches Jahr
Heinrich-Heine-Universität, Düsseldorf
3. Staatsexamen 12/2001

Famulaturen: 03/1998 chirurgische Praxis, Zell a.H.
03/1999 Radiologie, Harvard University, Boston
07/1999 Innere Medizin, Martinus Krankenhaus, Düsseldorf
08/2000 Chirurgie, St. Vinzenz Krankenhaus, Düsseldorf
03/2000 Hautklinik, Universitätsklinikum, Düsseldorf

Praktika: 04/2000 Gynäkologie, ev. Krankenhaus, Düsseldorf
02/2000 Hausarztpraktikum, Südtirol/ Brixen

Nebentätigkeiten: 01.05.1995 – 24.08.2000 Studentische Hilfskraft
Universitätsklinikum Düsseldorf, Hautklinik
Labor für experimentelle und klinische Photoimmunologie
(Prof. Dr. J. Krutmann)
Labor für Immunologie
(PD Dr. M. Grewe)
SS 1998 – WS 1998/1999 Tutorin des 1. Hilfe Kurses
Universitätsklinikum Düsseldorf, Institut für Anästhesiologie
01.01.1999 – 31.12.2001 Studentische Hilfskraft
Chirurgische, internistische und orthopädische Ambulanz
St. Vinzenz Krankenhaus, Düsseldorf

Abstract

Regulation der Mediatorfreisetzung von dendritischen Zellen: Bedeutung für die Immunpathogenese des atopischen Ekzems

Das atopische Ekzem beruht unter anderem auf einer angeborenen Fehlregulation des Immunsystems gegenüber Inhalations- und Nahrungsmittelallergenen, die zur Auslösung einer T-Zell-vermittelten Entzündungsreaktion in der Haut führt. Im vorliegenden Projekt wurde die Mediatorsynthese von antigenpräsentierenden dendritischen Zellen (DC) und ihre mögliche Bedeutung für die T-Zell-Aktivierung untersucht. Diese Untersuchungen wurden an aus peripherem Blut differenzierten DC durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass DC in der Lage sind, auf verschiedene Stimuli Prostanoiden zu bilden. Die Prostanoidproduktion wurde sowohl über die Cyclooxygenase (COX)-1 als auch durch die de novo Expression der COX-2 reguliert. DC erwiesen sich nicht nur als Produzenten von Prostanoiden, sondern konnten auch als Zielzellen für biologische Wirkungen insbesondere von Prostaglandin (PG)E₂ identifiziert werden. Erstmals konnten autokrine Wechselwirkungen von DC-synthetisierte Prostanoiden und der Synthese von Interleukin (IL)-12 und IL-10 durch diese Zellen nachgewiesen werden. Nach der Charakterisierung der Prostanoidproduktion wurden vergleichende Untersuchungen zur Mediatorsynthese von DC von Atopikern versus Nicht-Atopikern durchgeführt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass die Mediatorfreisetzung von nicht-atopischen als auch atopischen DC durch eine Vorinkubation mit Inhalationsallergenen moduliert werden kann. Hierbei zeigten sich jedoch keine Unterschiede in Hinblick auf die Prostanoiden als auch auf T-Helfer (TH)1- und TH2-typische Zytokine (IL-10, IL-12). Mit dem Makrophagen-Chemotaktischen-Protein (MCP)-1 konnte jedoch ein Mediator identifiziert werden, der in typischer Weise von atopischen DC signifikant stärker synthetisiert wird und ebenfalls wesentlich stärker induzierbar ist. Die MCP-1-Synthese konnte durch Präinkubation mit typischen Inhalationsallergenen zudem wesentlich verstärkt werden. Diese Eigenart von atopischen DC konnte normalisiert werden, indem den DC-Kulturen neutralisierende anti-IL-10 Antikörper zugesetzt wurden.

Die vorgestellte Arbeit konnte erstmals die Prostanoidsynthese in humanen, aus dem peripheren Blut gewonnenen DC charakterisieren. Die Prostanoidsynthese in DC unterliegt dem Einfluß unterschiedlicher exogener Mediatoren und Stimuli, sowie der Aktivität beider Cyclooxygenasen. PGE₂ spielt eine autokrine Rolle in der Mediatorfreisetzung von DC. Die weiteren Untersuchungen haben jedoch auch gezeigt, dass sich die Prostanoidproduktion von atopischen und nicht-atopischen DC nicht wesentlich unterscheidet.

Im Gegensatz dazu führte die Charakterisierung weiterer Mediatoren zu Erkenntnissen über spezifische Unterschiede und Gemeinsamkeiten zwischen atopischen und nicht-atopischen DC. Beide DC Phänotypen werden durch unterschiedliche Inhalationsallergene in ihrem funktionellen Verhalten beeinflusst. Dies betrifft insbesondere die Reifung und das Priming für die Synthese von auch für die T-Zelldifferenzierung und –stimulierung wichtiger Mediatoren wie IL-12 und IL-10. Im Rahmen dieser Untersuchungen konnte als wohl interessantestes Ergebnis erstmals ein spezifischer funktioneller Unterschied zwischen atopischen und nicht-atopischen DC festgestellt werden: Die Synthesekapazität für MCP-1 war in atopischen DC wesentlich stärker ausgeprägt als in nicht-atopischen. Die Beobachtung der verstärkten MCP-1-Produktion in atopischen DC erfährt durch die Möglichkeit ihrer Normalisierung einen weiteren wichtigen Aspekt. Es scheint denkbar, dass ex vivo generierte humane DC von Atopikern in vitro „normalisiert“ werden können und damit eine therapeutische Möglichkeit für atopische Erkrankungen eröffnen.

PD Dr. Markus Grewe