

Aus dem Institut für Transfusionsmedizin des UKSH  
Leiter: PD Dr. med. S. Görg  
und der medizinischen Fakultät der Universität zu Lübeck  
Dekan: Prof. Dr. med. W. Solbach

---

# **Beeinflussung der Interferon- $\alpha$ Freisetzung aus plasmazytoiden dendritischen Zellen**

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung der Doktorwürde  
der Universität zu Lübeck  
– Aus der Medizinischen Fakultät –

vorgelegt von  
Michael Paulsen  
aus Niebüll

Lübeck 2008

1. Berichterstatter: PD Dr. med. Peter Schlenke  
2. Berichterstatter/Berichterstatterin: PD Dr. med. Thomas Witthöft  
Tag der mündlichen Prüfung: 02.03.2009  
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 02.03.2009

# Inhaltsverzeichnis

## Abkürzungsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Dendritische Zellen als integraler Bestandteil des Immunsystems	1
1.2. Interferon produzierende Zellen	6
1.3. Transplantationsimmunologie und dendritische Zellen	11
1.4. Zink und das Immunsystem	16
1.5. Atopische Diathese und dendritische Zellen	18
1.6. Fragestellungen	22
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>24</b>
2.1. Material	
2.1.1. Geräte	24
2.1.2. Laborbedarf	24
2.1.3. Biologische Materialien	25
2.1.4. Immunologische Reagenzien	25
2.1.5. Chemikalien und Reagenzien	26
2.2. Methoden	
2.2.1. Durchflusszytometrie	27
2.2.2. Aufreinigung dendritischer Zellen	29
2.2.3. Stimulationsassay	30
2.2.4. Interferon- $\alpha$ Quantifizierung	31
2.2.5. Auswertung der Ergebnisse	32
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>33</b>
3.1. Phänotypisierung und Quantifizierung dendritischer Zellen	33
3.2. IFN- $\alpha$ Produktion aus plasmazytoiden dendritischen Zellen	35
3.3. Einfluss von Immunsuppressiva auf die IFN- $\alpha$ -Produktion durch pDC	38

3.4. Einfluss von Zink auf die IFN- $\alpha$ Produktion aus pDC	40
3.5. Quantifizierung dendritischer Zellen sowie der IFN- $\alpha$ Produktion bei Atopikern	42
<b>4. Diskussion</b>	<b>47</b>
4.1. Beeinflussung der IFN- $\alpha$ Ausschüttung durch Immunsuppressiva	47
4.2. Beeinflussung der IFN- $\alpha$ Ausschüttung durch Zink	49
4.3. pDC als zellulärer Bestandteil der allergischen Reaktion	52
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>54</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>55</b>
<b>7. Danksagung</b>	<b>65</b>
<b>8. Lebenslauf</b>	<b>67</b>
<b>9. Publikationen</b>	<b>68</b>

## Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
APC	<i>antigen presenting cell</i>
BDCA	<i>blood dendritic cell antigen</i>
CD	<i>cluster of differentiation</i> (international standardisierte Nomenklatur)
CsA	Ciclosporin A
CXCR4	Chemokin-Rezeptor 4
DC	<i>dendritic cell</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FACS	<i>flourescent activated cell sorter</i>
FSC	<i>forward scatter</i>
FK506	Tacrolimus
FK-BP	Tacrolimus bindendes Protein
GM-CSF	<i>granulocytes-macrophages-colony-stimulating-factor</i>
HLA	Humanes Leukozyten Antigen
HIV	Humanes Immunodefizienz Virus
HSP	<i>heat shock protein</i>
HSV-1	Herpes simplex Virus 1
IFN	Interferon
IgE	Immunglobulin E
IL	Interleukin
IPC	<i>interferon producing cell</i>
IRF	Interferon regulierender Faktor
ISGF-3	Interferon stimulierter Genfaktor 3
JAK	Janus-Kinase
LC	Langerhans-Zellen
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>magnetic cell separation</i>
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
mDC-1	<i>type 1 myeloid dendritic cell</i>
mDC-2	<i>type 2 myeloid dendritic cell</i>
NDV	<i>New Castle disease virus</i>
NFAT	nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen

## Abkürzungsverzeichnis

---

NF $\kappa$ B	nukleärer Faktor kappa B
NK-Zellen	natürliche Killerzellen
PAMP	<i>pathogen-associated molecular patterns</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
pDC	<i>plasmacytoid dendritic cell</i>
PRR	<i>pattern-recognition receptors</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Raumtemperatur
SSC	<i>sideward scatter</i>
STAT	<i>signal transducers and activators of transcription</i>
T <sub>H</sub> -1	T-Helferzellen vom Typ 1
T <sub>H</sub> -2	T-Helferzellen vom Typ 2
TLR	<i>toll-like receptor</i>
TNF- $\alpha$	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TRAF	<i>TNF receptor associated factor</i>

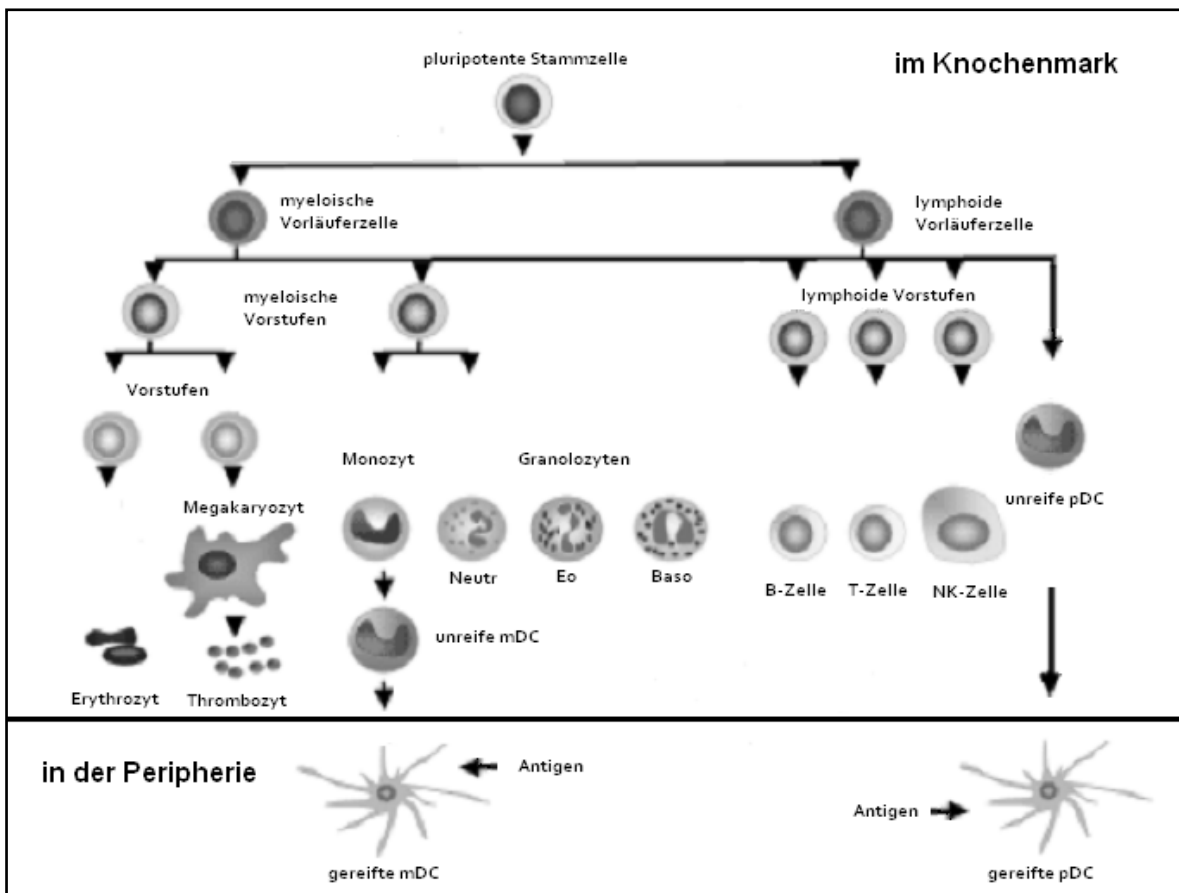
# 1. Einleitung

## 1.1. Dendritische Zellen als integraler Bestandteil des Immunsystems

Das Immunsystem hat die Aufgabe uns vor Mikroorganismen, Fremd- und Schadstoffen, Toxinen und malignen Zellen zu schützen. Es ist in der Lage destruktive Antworten gegen körpereigene Substanzen und irreparable Schäden umliegender Gewebe zu vermeiden. Immunologische Antworten haben in der Regel nur eine begrenzte Dauer und werden durch gegenregulatorische Mechanismen limitiert. Das Unterscheidungsvermögen zwischen bedrohlichem Erreger, ungefährlichem Umwelteinfluss und körpereigener Struktur ist eine wesentliche Leistung des Immunsystems. Die unspezifische oder angeborene Immunität beinhaltet vom Erreger unabhängige Abwehrmaßnahmen des Körpers. Zu ihr zählt eine intakte Haut mit Säureschutzmantel, das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme sowie unspezifische Mediatoren wie Interferone (IFN) und Interleukine (IL). Die spezifische oder erworbene Immunität richtet sich in ausgewählter Weise gegen den Erreger mit z.B. einem spezifischen Zytokin-Milieu, welches eher eine humorale oder zelluläre Abwehrreaktion hervorruft. Das Auswandern Antigen präsentierender Zellen (APC) in die lymphatischen Organe ruft eine systemische Immunreaktion hervor. Wesentliche Bestandteile des spezifischen Immunsystems sind B- und T-Lymphozyten. Ist der Auslöser der Reaktion bereits bekannt, kommt es zu einer beschleunigten Immunantwort, die „Boosterung“ genannt wird.

Eine Vielzahl von Leukozyten steht im Mittelpunkt der zellulären Abwehrreaktion. Sie leiten sich von pluripotenten Knochenmarkstammzellen ab. Im adulten Organismus findet die Proliferation und Differenzierung von Blutzellen im Knochenmark statt. Es können zwei unterschiedliche Reihen von einander getrennt werden: Zum einen die lymphatische Reihe; aus ihr gehen die B- und T- Lymphozyten, natürliche Killerzellen (NK-Zellen) und die plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC) hervor; zum anderen die myeloische Reihe mit einer „oligopotenten“ Vorläuferzelle aus der nicht nur Monozyten und Granulozyten hervorgehen, sondern auch Erythrozyten und Megakaryozyten. Aus den Monozyten können sich wiederum gewebsständige Makrophagen und myeloische dendritische Zellen (mDC) differenzieren. Die Megakaryozyten verlassen das Knochenmark nicht, sondern schnüren kernlose Blutplättchen, sogenannte Thrombozyten, aus dem Zytoplasma ab, die in das periphere Blut gelangen. Die Zellen

des Immunsystems können in verschiedene Funktionsbereiche unterteilt werden. Fresszellen wie z.B. neutrophile Granulozyten, Monozyten und Makrophagen, die Erreger über Phagozytose abwehren. Als wichtigste Zellen dieser Gruppe sind die neutrophilen Granulozyten zu nennen. Monozyten und Makrophagen haben noch weitere wichtige Funktionen. Sie sind in der Lage, bestimmte Antigene der Erreger an ihrer Zelloberfläche zu präsentieren und sind die klassischen Vertreter der APC.



**Abb. 1: Hämatopoese im Knochenmark:** Aus einer pluripotenten Stammzelle gehen die Zellreihen des Blutes hervor. Eine unterschiedliche Einwirkung von Zytokinen lässt die Vorstufen zu verschiedenen Zellen differenzieren. Über die Vorstufe der Monozyten können mDC gebildet werden. Diese kommen als Vorläuferzellen im Blut vor und reifen nach Antigen-Kontakt zu reifen mDC aus.

Dendritische Zellen (DC) sind hoch professionelle APC, die jedoch nur in geringen Mengen im Blut vorkommen. Sie nehmen eine zentrale Rolle bei der Aktivierung von spezifischen Immunreaktionen über T- und B-Zellen ein.

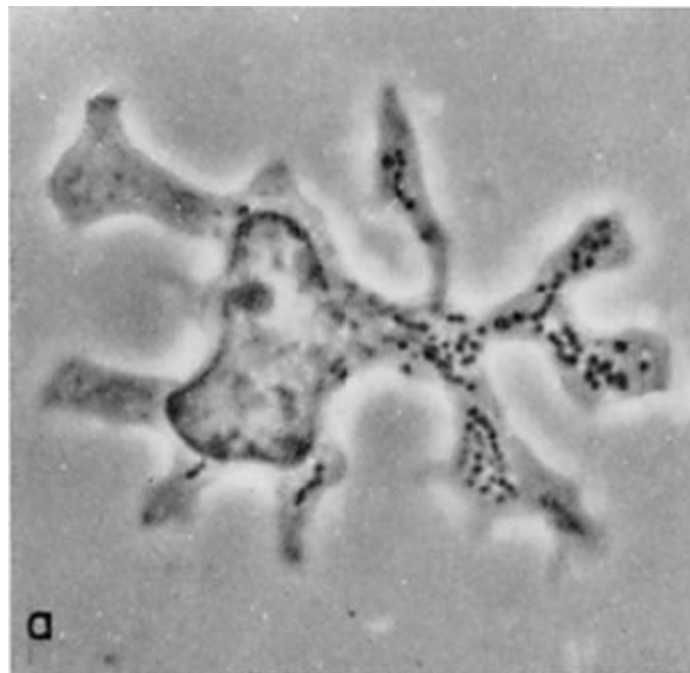
Die B- und T-Lymphozyten können über ein Schlüssel-Schloss Prinzip die einzelnen Erreger erkennen und eine hierauf abgestimmte Immunreaktion auslösen. Eine



Untergruppe der T-Zellen, die zytotoxischen T-Zellen sind in der Lage über direkten Zell-Zell-Kontakt bzw. Zell-Erreger-Kontakt eine Immunantwort hervorzurufen. Die humorale Immunität basiert vor allem auf spezifische Antikörper (AK). Diese komplexen Eiweiße sind in der Lage spezifische Antigenstrukturen auf Erregern zu erkennen, diese zu „markieren“ und für das Immunsystem angreifbar zu machen. Nach Antigenpräsentation durch APC können B-Lymphozyten zu Plasmazellen ausreifen, diese beginnen dann mit einer spezifische AK-Synthese. Die AK gelangen über das periphere Blut an den Wirkungsort.

Wie vorausgehend erwähnt, bedient sich das Immunsystem zur Abwehr von Pathogenen zweier Systeme, der angeborenen (unspezifischen) und der erworbenen (spezifischen) Immunität. Die erworbene Immunität ist hochentwickelt; ein überaus wichtiger Anteil besteht aus Antigen-spezifischen T- und B-Zellen. Durch somatische Rekombination während der Entwicklungsphase ist eine große Vielfalt an Immunglobulinen sowie Antigenrezeptoren auf T-Zellen sicher gestellt. Durch eine Selektion im Thymus werden Lymphozyten, die für körpereigenes Gewebe spezifisch sind, abgebaut. Resultierend ergibt sich eine große Wahrscheinlichkeit, dass für viele Erreger bereits ein passender Antigenrezeptor auf einem Lymphozyten existiert. Trifft ein Lymphozyt auf „sein“ Antigen, kommt es zu einer klonalen Proliferation dieses Lymphozyten sowie zu weiteren Immunreaktionen. Bis zur vollen Immunantwort über diesen Mechanismus sind einige Tage nötig. Im zeitlichen Ablauf einer Infektion ist das System der angeborenen Immunität der als erstes in Kraft tretende Abwehrmechanismus des menschlichen Körpers. Es besteht aus Phagozytose, Freisetzung von Entzündungsmediatoren und Antigenpräsentation und ist ebenso in der Lage, zwischen selbst und nicht-selbst zu unterscheiden. Dies ist über eine Vielzahl von keimbahncodierten Rezeptoren, die zur Erkennung unterschiedlicher konservierter pathogen-assoziiertes molekularer Muster (PAMP) befähigt sind, möglich. Bei den PAMP handelt es sich um Strukturen, die von Mikroorganismen oder Viren (z.B. Peptidoglykane oder Lipoteichonsäure), nicht aber von Säugetieren produziert werden und so dem Immunsystem auf einfache Art und Weise die Unterscheidung zwischen körperfremd und körpereigen erlauben. Die sogenannten mustererkennenden Rezeptoren (PRR), die PAMP erkennen können, kommen auf DC sowie auf vielen weiteren Immunzellen vor. DC werden heute als „Brücke“ zwischen dem angeborenen und erworbenen Immunsystem angesehen.

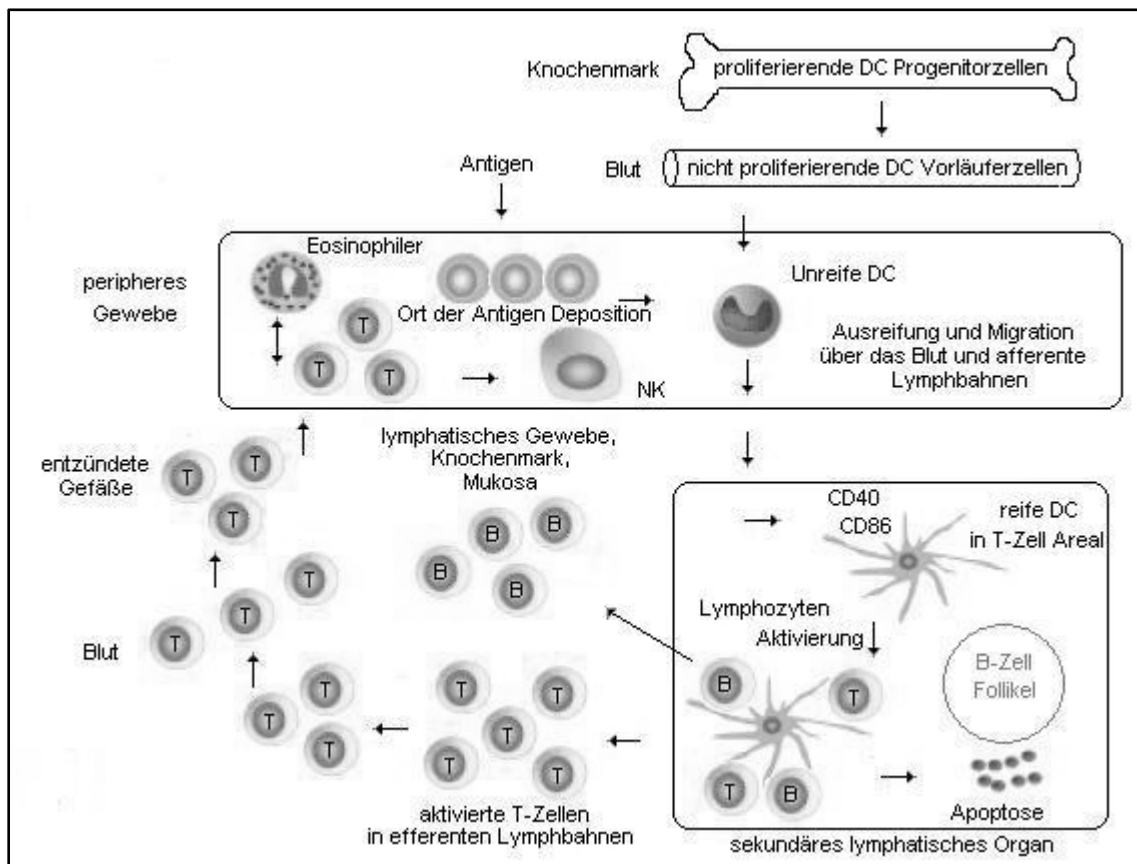
Im menschlichen Immunsystem nehmen die DC eine zentrale Rolle ein. Sie gehören zu einer eigenständigen Zelllinie von migratorisch aktiven Leukozyten, deren Hauptaufgabe darin besteht, eine primäre T-Zell-Antwort zu initiieren. Im peripheren Blut sind sie als noch nicht ausgereifte Vorläuferzellen in geringer Menge (0,1-0,5 % der Leukozyten) anzutreffen. Die erste Beschreibung von epidermalen DC geht auf Langerhans 1868 zurück. Erst etwa hundert Jahre später sollten die Zellen auch in den meisten anderen Geweben nachgewiesen werden (Steinman und Cohn, 1973).



**Abb. 2: Phasen-Kontrast Mikrographie:** Eine aus der Milz isolierte DC (4.500 fache Vergrößerung).  
(Abb. aus Steinman und Cohn, 1973)

Die Morphologie dendritischer Zellen ist von der Gewebelokalisation abhängig. Im peripheren Blut ist die Größe der noch unreifen dendritischen Zellen in etwa mit jener von Monozyten vergleichbar. Der Zellkern, der nur einen kleinen Teil des Durchmessers ausmacht, ist exzentrisch gelegen, etwas elongiert und häufig gelappt. Im Zytoplasma können in der Nähe der Zelloberfläche gelegentlich Vakuolen nachgewiesen werden. Eigentliche Granula sind sehr selten und der Nachweis von Phagolysosomen fehlt in der Regel. Ein ausgeprägtes endoplasmatisches Retikulum sowie viele Mitochondrien sprechen für einen ausgeprägten Metabolismus dieser Zellen. Nach einem geeigneten Stimulus erfolgt die Ausreifung der DC. Sie bilden die typische Morphologie mit vielfachen Zellfortsätzen aus, die den Zellen ihren Namen gab (Steinman und Cohn, 1973).

Dringt ein Antigen bzw. Pathogen ins Gewebe ein, treffen sie auf gewebeständige DC. Diese wandern in das nächste lymphoide Organ um dort auszureifen. DC brauchen nur eine kleine Menge Antigen um es zu prozessieren und auf ihrer Oberfläche zu exprimieren. Sie präsentieren es Zellen, die antigenspezifisch im Sinne des Schlüssel-Schloss Prinzips mit ihnen reagieren können. Resultierend wird eine starke Vermehrung und Reifung dieser Zellen ausgelöst.



**Abb. 3: Das Leben einer DC:** Im Knochenmark werden DC gebildet und werden als unreife dendritische Vorläuferzellen über das Blut in das Gewebe transportiert. Dort können sie auf eingedrungenes Antigen stoßen (z.B. Viren). Das Antigen wird aufgenommen, die noch unreifen DC verlassen das Gewebe und wandern in lymphatische Organe. Nach ihrer Ausreifung exprimieren sie Antigenstrukturen mit Hilfe von MHC-Molekülen auf ihrer Zelloberfläche. Zirkulierende seltene antigenspezifische T-Zellen treffen auf die DC, werden von ihnen aktiviert und bringen die DC zur letztendlichen Ausreifung, was wiederum die T-Zell Expansion und Differenzierung unterstützt. Die aktivierten T-Lymphozyten wandern wieder zurück in das entzündete Gewebe. Die T-Helferzellen sezernieren ihre Lymphokine und zytotoxische T-Zellen können infizierte Zellen lysieren. Aktivierte B-Zellen differenzieren sich in B-Lymphoblasten nach dem Kontakt zu T-Zellen und DC. Die B-Lymphoblasten wandern dann in verschiedene Areale, wo sie in Plasmazellen ausreifen und Antikörper produzieren, welche das ursprüngliche Pathogen neutralisieren. (In Anlehnung an Bell et. al (1999))

Hauptsächlich kennt man dieses von T-Helferzellen und B-Zellen, aber auch zytotoxische T-Zellen können aktiviert werden. Über T-Helferzellen kann die Art der Immunantwort im Sinne einer T-Helferzellantwort 1 ( $T_H-1$ ) bzw. T-Helferzellantwort 2 ( $T_H-2$ ) beeinflusst werden. Dieses geschieht über ein Zusammenwirken der myeloischen dendritischen Zellen Typ1 (mDC-1) und plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC). DC stehen nicht nur im Zentrum der aktiven Immunantwort, sondern sind auch an Mechanismen der Immuntoleranz beteiligt (Ochando et al., 2006).

Bislang sind drei Ausprägungen von DC bekannt, zwei aus der myeloischen Reihe sowie eine aus der lymphatischen Reihe (Blom et al., 2000; Caux et al., 1996). Die zahlreichste dendritische Subpopulation im peripheren Blut ist die mDC-1; diese macht ca. 2/3 der DC aus. mDC-1 entstammen der myeloischen Reihe und lassen sich immunhistochemisch durch die Oberflächenmoleküle CD11c und CD11b anfärben. Sie tragen keine typischen Linienmarker (CD3, CD14, CD16, CD19, CD56). Etwa 1/3 machen die pDC an der Gesamtzahl aus. Sie entstammen der lymphatischen Reihe und lassen sich mit CD4, CD45RA und insbesondere mit CD123 (IL-3 Rezeptor- $\alpha$  Kette) anfärben; auch sie tragen, wie für DC üblich, keine Linienmarker (Olweus et al., 1997). Die kleinste Gruppe stellen die mDC-2 mit etwa 1 Zelle pro Mikroliter peripheren Blutes dar; diese werden über das „Blood dendritic cell Antigen-3“ (BDCA-3) identifiziert. Zu ihren Aufgaben im Immunsystem ist derzeit wenig bekannt. Allen Subpopulationen ist eine hohe Expression an HLA-DR-Antigen gemein, das zu dem „major histocompatibility complex“-Klasse II (MHC) gehört und typischerweise als Oberflächenmolekül auf APC vorkommt (Grabbe et al., 2000).

## 1.2. Interferon produzierende Zellen

IFN wurden erstmals 1957 von Isaacs und Lindenmann in Überständen von virusinfizierten Zellen entdeckt (Isaacs und Lindenmann, 1957). IFN sind in der Lage, die Zellen gegenüber Viren resistent zu machen. IFN gehören zu einer Superfamilie von kleinen Proteinen, die als Zytokine bezeichnet werden. Diese können sowohl Signale lokal von Zelle zu Zelle geben, als auch systemische Wirkungen entfalten und spielen im Abwehrsystem als Botenstoff eine bedeutende Rolle (Kirchner, 1986). Interferone werden aufgrund ihrer biologischen Eigenschaften in verschiedene Gruppen unterteilt: In Typ I IFN ( $IFN-\alpha$ ,  $IFN-\beta$  und andere wie  $IFN-\omega$ ,  $IFN-\varepsilon$  und  $IFN-\kappa$ ), in Typ II IFN ( $IFN-\gamma$ ) und neuerlich in Typ III IFN ( $IFN-\lambda_1$ ,  $IFN-\lambda_2$ ,  $IFN-\lambda_3$ ) (Pestka et al., 2004). Die Typ I und III IFN haben eine eindeutige, antivirale Wirkung und grenzen sich von den immunmodula-

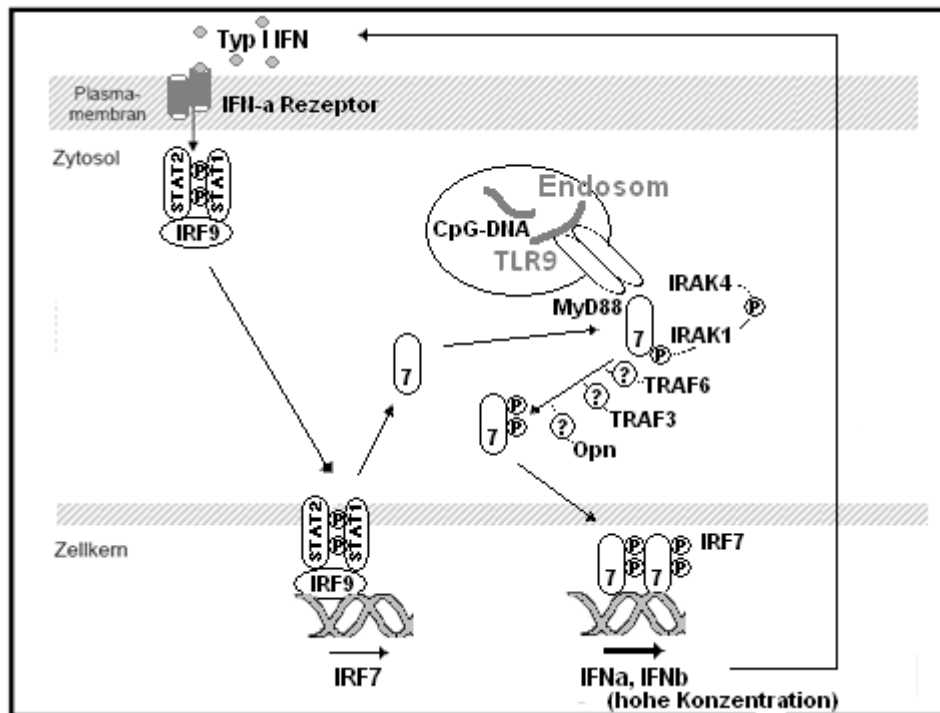
torischen Aktivitäten der Typ II IFN ab. Die Typ I IFN stellen die erste Barriere gegen virale Infektionen im Sinne der angeborenen Immunität dar. Sie werden aber auch bei Infektionen mit Bakterien und Protozoen gebildet. Eine Vielzahl von Desoxyribonukleinsäure (DNA) - und Ribonukleinsäure (RNA)-Viren werden durch IFN in ihrem Lebenszyklus gestört. Neben dem hemmenden Einfluss auf die virale Polypeptidsynthese können IFN- $\alpha/\beta$  auch die Zellinvasion und den Verlust des Kapsids hemmen bzw. die RNA und die Viruspartikelreifung blockieren. Zusätzlich zu den primär antiviralen Funktionen können IFN die Proliferation und Funktion von Zellen des Immunsystems modulieren bzw. stimulieren. Fast alle Komponenten des Immunsystems können durch IFN beeinflusst werden, einschließlich der AK-Antwort durch B-Zellen, Stimulation von zytotoxischen T-Lymphozyten, Förderung der Antigenprozessierung, MHC-Expression auf APC und der Rekrutierung von NK-Zellen.

Die meisten Körperzellen und vor allem Leukozyten sind befähigt, IFN zu bilden. Es wurde in den späten 70er Jahren klar, dass eine spezialisierte „Blutzelle“ existiert, die weitaus größere Mengen an IFN produzieren kann als alle anderen Zellen. Lange Zeit war unklar, welche Zellen im peripheren Blut die Interferon produzierenden Zellen (IPC) sind. Erste Studien wiesen auf NK-Zellen hin, die autokrin IFN ausschütten sollten (Djeu et al., 1982). 1996 konnte die Arbeitsgruppe um Svensson über die intrazelluläre Färbung von IFN- $\alpha$  bei gleichzeitiger Färbung der Oberflächenantigene eine genauere Beschreibung der IPC geben (Svensson et al., 1996). Es verdichteten sich die Hinweise, dass die pDC die IPC sein mussten. In einer Veröffentlichung in Science aus dem Jahre 1999 konnten Siegal et al. erstmalig den Beweis erbringen, dass pDC die eigentlichen IPC sind (Siegal et al., 1999). Die IPC konnten mittels Depletion über einen Ficoll-Gradienten und anschließender Selektion über einen Zellsorter isoliert werden. Die Zellen wurden mit dem Herpes Simplex Virus 1 stimuliert. In den Kulturüberständen konnten 200-1000 mal mehr IFN- $\alpha$  nachgewiesen werden als in gleichartig stimulierten mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC).

pDC sind als IPC an der angeborenen Immunreaktion gegen Virusinfektionen maßgeblich beteiligt. Darüber hinaus haben sie eine große Bedeutung als sogenannte hochspezialisierte APC im Rahmen der spezifischen Immunreaktion. pDC können im Gegensatz zu anderen Körperzellen schnell große Mengen an IFN- $\alpha$  bilden. Dieses ist durch unterschiedliche Wege in der Signaltransduktion zu erklären.

In den meisten Körperzellen wird IFN- $\alpha$  in geringen Mengen über einen positiven Feedback-Mechanismus von IFN- $\beta$  über Bindung an Typ I IFN-Rezeptoren gebildet. Die Regulationsmechanismen, in denen ein positiver Feedback-Mechanismus gefunden wurde, sind bislang am ausführlichsten an Fibroblasten untersucht worden (Taniguchi und Takaoka, 2002). Hierbei wird bei einer viralen Infektion der IFN-regulierende-Faktor-3 (IRF-3) phosphoryliert und in den Kern transloziert. Dort aktiviert er die IFN- $\beta$ -Gen Transkription. Das IFN- $\beta$ , das von den infizierten Zellen ausgeschüttet wird, aktiviert auto- und parakrin die Jak/Stat Signaltransduktionskaskade, welche zu einer Transkription von IRF-7 führt. Mit Hilfe von IRF-7 wird nun das IFN- $\beta$ -Signal verstärkt (Autoamplifikation) und die Expression von IFN- $\alpha$  Genen und IFN- $\beta$  Genen wird induziert.

Die molekularen Mechanismen, die einer schnelleren Ausschüttung großer Mengen IFN in pDC zu Grunde liegen, sind derzeit Gegenstand der Forschung und vereinfacht in Abbildung 4 in Anlehnung an Honda et al. (2006) dargestellt.



**Abb. 4: Toll-Like-Rezeptor (TLR) vermittelte Induktion von Typ I IFN in pDC**

Nach Stimulation von TLR9 (oder TLR7), welche in den Endosomen exprimiert werden, interagiert der Interleukin-related-factor 7 (IRF7) mit dem Adapterprotein MyD88 (Myeloid differentiation primary response gene (88)), welches in einer Kaskade von Kinasen (IRAK1 und IRAK4) aktiviert wird. Eine weitere Anzahl von Molekülen wie z.B. der TRAF3 und TRAF6 (TNF receptor associated factor) haben einen bisher ungeklärten

Einfluss auf den IRF7. Freigesetztes Typ I IFN steigert die Expression von IRF7 Genen und führt so zu einer weiteren Steigerung der Typ I IFN Gen Induktion (nach Honda et al., 2006).

Im Unterschied zu anderen Körperzellen (insbesondere Fibroblasten) wird in pDC IFN- $\alpha$  in großer Menge produziert. Hierfür wird IRF-7 konstitutionell sehr hoch exprimiert, was eine schnelle Synthese großer Mengen an IFN- $\alpha$  begünstigt. pDC sind unabhängig von dem Feedback-Mechanismus über die Typ 1 IFN-Rezeptoren (Coccia et al., 2004; Izaguirre et al., 2003; Kerkmann et al., 2003); jedoch kann angenommen werden, dass dieser Feedback-Mechanismus grundsätzlich auch in pDC existiert (Honda et al., 2006).

Unreife pDC exprimieren eine geringe Anzahl von MHC II Molekülen und eine geringe Anzahl bis nicht nachweisbare Mengen von CD80 und CD86, so dass keine signifikante Proliferation von Antigen spezifischen T-Zellen ausgelöst werden kann. In vitro Versuche weisen darauf hin, dass pDC auf zwei verschiedene Wege ausreifen, um mit T-Zellen zu korrespondieren. Zum einen ist die Ausreifung über die Stimulation mit IL-3 möglich; alternativ auch unter Zugabe von CD40L (Olweus et al., 1997). Treten sie hiernach mit T-Zellen in Kontakt, wird nachfolgend IL-4, IL-5 und IL-10 ausgeschüttet. Zum anderen kann die Ausreifung über IFN- $\alpha$  und Tumor Nekrose Faktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) bei viraler Infektion geschehen. Hierbei sind die Toll-like Rezeptoren (TLR) 7 und 9 von Bedeutung. Bei einer viralen Infektion wird IFN- $\alpha$  produziert; dieses führt über Interaktion mit den T-Zellen auch zur IFN- $\gamma$  und IL-10 Ausschüttung.

Bei verschiedenen Erkrankungen haben pDC eine pathophysiologische Bedeutung: Im Rahmen der Humanen Immundefizienz Virusinfektion (HIV) sind die pDC durch den CD4 und die Chemokinrezeptoren (CXCR) 4 bzw. CXCR5 vulnerabel. Nach Bindung des Virus an die Rezeptoren gelangt es in die Wirtszelle, um sich in dieser zu vermehren. Immunhistochemische Färbungen an Tonsillen von HIV-Patienten beweisen über das HIV assoziierte Protein p24 die Infektion der pDC. Vorangegangene Studien zeigten, dass die PBMC von AIDS Erkrankten eine geringere Interferon-Antwort nach HSV Infektionen generierten. Neuere Studien beweisen eine Reduktion der Zellzahl von pDC in höheren Krankheitsstadien, so dass ein Verlust an zirkulierenden pDC mit einer hohen Viruslast und einer höheren Anzahl von opportunistischen Infektionen korreliert (Soumelis et al., 2001).

Beim Systemischen Lupus Erythematoses werden häufig erhöhte IFN- $\alpha$  Spiegel bestimmt, jedoch erniedrigte Zellzahlen von zirkulierenden pDC im Blut gesehen. Eine Erklärung hierfür ist die Einwanderung der pDC in die Hautläsionen im Rahmen des entzündlichen Geschehens, um dort die erhöhten Mengen an IFN- $\alpha$  zu produzieren (Farkas et al., 2001).

Als ein zentraler Bestandteil des Immunsystems sind DC auch im Zusammenhang mit tumorimmunologischen Fragestellungen von Bedeutung. Die immunologische Erkennung einer Tumorzelle durch den Wirtsorganismus sollte zur Vernichtung dieser durch das Immunsystem führen. mDC-1 und pDC werden immunhistologisch in Tumoren nachgewiesen und können somit solide Tumore infiltrieren (Kim et al., 2007). Jedoch war das Immunsystem bei den diagnostizierten Tumorerkrankungen nicht in der Lage, diesen zu zerstören. Nachfolgend sind beispielhaft einige Beobachtungen in diesem Zusammenhang aufgeführt. Die tumorinfiltrierenden pDC beeinflussen mDC zur Präsentation des Tumorantigens, um zytotoxische T-Zellen zu induzieren. Jedoch tumorinfiltrierende, unreife mDC-1 scheinen refraktär auf die Stimulation mit LPS oder CD40L zu sein. Sie sind nicht mehr in der Lage T-Zellen zu stimulieren. Wird beim Mammakarzinom eine hohe Anzahl von pDC gefunden, ist dieses mit einem erhöhtem Risiko der Metastasierung und der Entstehung von Rezidivtumoren korreliert (Treilleux et al., 2004). Beim Ovarialkarzinom wird eine hohe Anzahl von pDC im Aszites gefunden. Diese pDC waren nicht in der Lage, T-Zellen zur Zerstörung der Tumorzellen zu aktivieren und induzierten stattdessen IL-10 produzierende T-Zellen. Eine neuere Studie weist darauf hin, dass pDC in den Tumor drainierenden Lymphknoten Indolamin-2,3-dioxygenase exprimieren. Diese kann möglicherweise eine Mikroentzündung hervorrufen, die die antitumoröse T-Zell-Antwort supprimieren könnte (Munn et al., 2004). Zusammenfassend ist das bessere Verständnis der Bedeutung von DC im Zusammenhang mit vielen Erkrankungen wichtig; insbesondere auch, um neue Therapiestrategien zu entwickeln. Als eindrucksvolles Beispiel sei an dieser Stelle die Tumorstimmulierung genannt. Hier werden mDC-1 mit aufgearbeiteten Tumorantigenen stimuliert, so dass nachfolgend die Tumorzellen erkannt werden können und es zu einer Immunreaktion gegen den Tumor kommt (Schnurr et al., 2002).



### 1.3. Transplantationsimmunologie und DC

Die Transplantation stellt eine Möglichkeit dar, den irreversiblen Verlust physiologischer Zell- und Gewebefunktionen von Organen zu ersetzen. Als Beispiel sei die terminale Niereninsuffizienz genannt. Mit Hilfe einer Nierentransplantation kann eine „Entgiftungsfunktion“ des Körpers wieder hergestellt werden. Die für den Patienten anstrengende und Lebensqualität einschränkende Dialyse kann ausgesetzt werden. Viele ungünstige Folgeerkrankungen der Niereninsuffizienz und Dialysebehandlung treten nicht mehr auf, insbesondere auch die erhöhte Komorbidität und Mortalität bezüglich chronisch vaskulärer Erkrankungen (z.B. Herzinfarkt und Schlaganfall). Auch aus volkswirtschaftlichen Aspekten heraus ist eine Organtransplantation mit Folgekosten preiswerter als eine langwierige Dialysebehandlung. Ca. 60.000 Patienten haben in Deutschland eine terminale dialysepflichtige Niereninsuffizienz mit jährlichen Behandlungskosten von ca. 50.000 Euro pro Patient pro Jahr bzw. 3 Milliarden Euro Gesamtkosten. 2006 wurden in Deutschland 2258 Nieren transplantiert und es warteten 8473 auf ein Nierentransplantat (Annual Report 2006, Eurotransplant International Foundation) Ein transplantiertes Organ hat eine mediane Überlebensdauer von etwa 5 Jahren. Das Immunsystem stellt mit seinen humoralen und zellulären Abwehrmechanismen eine wichtige Barriere für die Organtransplantation dar: Insbesondere kann es nach erfolgter Organtransplantation zu schweren Transplantatabstoßungen mit z.T. vollständigem Verlust des Transplantat-Organs kommen. Den Risiken kann erstens durch eine möglichst optimale Auswahl der Organe in Bezug auf die Übereinstimmung von Gewebemerkmale von Spender und Empfänger sowie zweitens durch Fortschritte in der immunsuppressiven Therapie begegnet werden.

Bei der Organentnahme wird das Gewebe des potentiellen Spenders im ABO-Blutgruppen- sowie im Humanen Leukozyten Antigen (HLA)-System typisiert. Die Priorität der HLA-Kompatibilität wird in der Reihenfolge HLA-DR, HLA-B und HLA-A gesetzt. Eine komplette Übereinstimmung der HLA-Merkmale gelingt bei der Nierentransplantation nur in ca. 20%. Eine Kreuzprobe zwischen Spenderzellen und Empfängerserum sollte vor Organtransplantation negativ sein und die Verträglichkeit untermauern. Nach Transplantation kommt die Immunogenität des übertragenen Organs durch dessen fremde MHC-Klasse-I-Moleküle zur Bedeutung. Sowohl das MHC-Klasse-I-Molekül als auch das durch ihn präsentierte Peptid können aufgrund genetischer Polymorphismen für das Immunsystem des Empfängers fremd sein, so dass es zu Abstoßungsreaktionen

kommen kann. Dieses ist nach wie vor auch bei verbesserter immunsuppressiver Therapie ein sehr wichtiger Faktor für die Überlebenswahrscheinlichkeit des Transplantats (Opelz und Döhler, 2007).

Die hyperakute Abstoßung, d.h. die AK-vermittelte Abstoßung, ist vor allem dann von Bedeutung, wenn der Empfänger vorsensibilisiert ist (z.B. durch Anti-HLA-AK durch Schwangerschaft, Bluttransfusionen oder vorausgegangene Transplantationen). Präformierte AK sind vornehmlich gegen das Endothel des Transplantats gerichtet; insbesondere über die primäre Aktivierung des Komplementsystems kommt es zur Schädigung der Gefäßendothelien und zur inflammatorischen Immunantwort. In deren Folge treten insbesondere Aggregate von Thrombozyten auf, die die Blutversorgung des transplantierten Organs irreversibel beeinträchtigt. Diese Form der Abstoßung ist durch Fortschritte in der serologischen Diagnostik (Ausschluss bzw. Berücksichtigung von präformierten HLA-AK) selten geworden (Racusen und Haas, 2006).

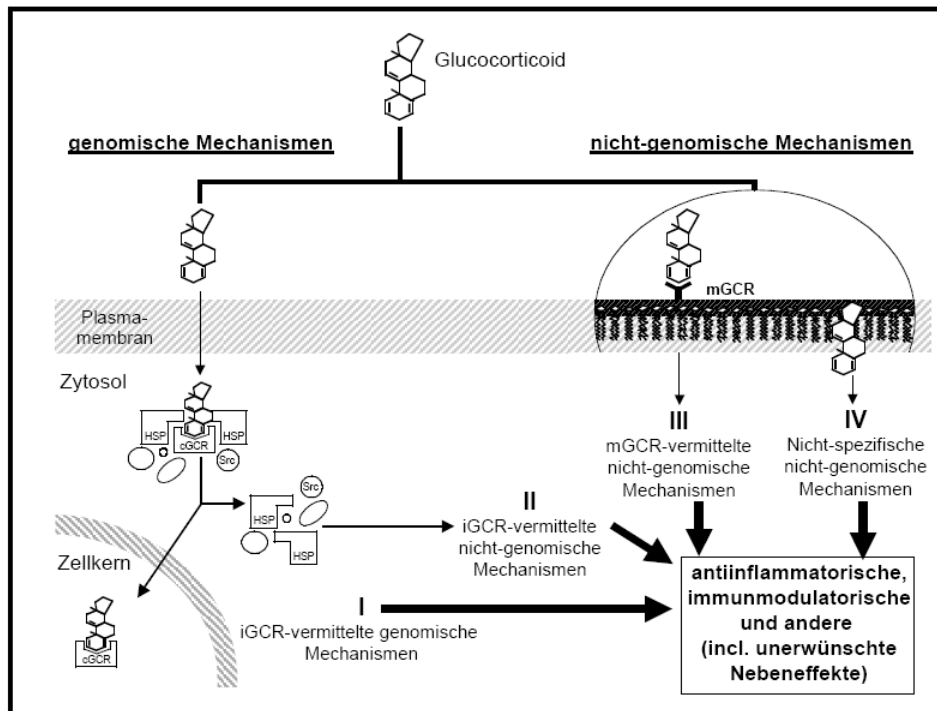
Hiervon wird die frühe bzw. akute Abstoßungsreaktion unterschieden, die Tage bis Wochen nach Nierentransplantation auftritt. Diese Form der Abstoßung wird über professionelle APC vermittelt. APC des Transplantats (also des Spenders) können auswandern und auf direktem Wege T-Zellen des Empfängers aktivieren. Diese T-Zellen sind dann Antigen spezifisch für die MHC-Moleküle des Spenders. Antigene eines Transplantats können aber auch von den APC des Empfängers phagozytiert und zusammen mit MHC-I-Molekülen prozessiert werden. Die Präsentation auf dem eigenen MHC aktiviert aber nur T-Zellen, die die MHC-Moleküle des Donors nicht erkennen können. Bei der zellulären Abstoßung infiltrieren diese aktivierten T-Zellen das Gewebe in der Nähe der APC sowie auch perivaskuläres Gewebe. Die  $T_H1$ -Population überwiegt. Die Freisetzung von Zytokinen wirkt direkt toxisch auf das umliegende Gewebe und bewirkt vor allem die Rekrutierung weiterer T-Zellen, Makrophagen und Granulozyten. Die aktivierten Effektorzellen setzen prokoagulatorische Mediatoren, Kinine und Eicosanoide frei. Unter dem Einfluss der Zytokine kommt es auf dem umliegenden Gewebe zur verstärkten Expression von Adhäsions- und MHC-Molekülen.

Darüber hinaus werden klinisch auch Abstoßungsreaktionen beschrieben, die Monate bis Jahre nach Nierentransplantation auftreten, klinisch langsam progredient verlaufen und zu einer interstitiellen Fibrose führen. Immunologisch stellen sie eine Mischform dar,

einerseits mit dem Nachweis von Antigen/AK-Komplexen an den Gefäßwänden und andererseits mit einer T-Zell vermittelten Abstoßung.

Um Abstoßungsreaktionen zu unterdrücken, werden unterschiedliche Immunsuppressiva benutzt. Ein wichtiger Grundsatz in der immunsuppressiven Therapie ist idealerweise eine balancierte Einstellung zwischen ausreichender Immunsuppression und erhaltener Immunkompetenz z.B. gegenüber Infektionserregern. Im Rahmen der durchgeführten Experimente wurden drei unterschiedliche Immunsuppressiva verwendet, in deren Wirkungsweise hier eingeführt werden soll.

Glucocorticoide haben einen besonders hohen therapeutischen Stellenwert bei entzündlichen und autoimmunologischen Erkrankungen als auch zur Prophylaxe bzw. Therapie der Abstoßungsreaktionen nach allogener Organtransplantation. Der Wirkungsmechanismus von Glucocorticoiden ist abhängig von der Dosis. Verschiedene zelluläre Mechanismen kommen zum Tragen. Einige sind erst bei hohen Konzentrationen zu beobachten. Diese macht man sich bei der Therapie von Abstoßungsreaktionen zunutze. Bei der prophylaktischen Gabe werden regelmäßig geringe Mengen an Corticoid verabreicht. Die meisten Wirkungen werden durch die Beeinflussung der Transkription von Genen hervorgerufen. Nach der Bindung an einen zytosolischen Glucocorticoid-Rezeptor dissoziiert dieser von einem Komplex aus Hitzeschockproteinen und ist fähig, an bestimmte Stellen der genomischen DNA im Zellkern zu binden, die sogenannten „hormone response elements“. Dieses führt zur Aktivierung bestimmter Gene, deren Produkte die Entzündungsausbreitung hemmen. Andererseits wird die Produktion entzündungsfördernder Proteine (z.B. Enzyme des Prostaglandinstoffwechsels) durch Wechselwirkung mit dem nukleären Faktor kappa-B (NF- $\kappa$ B) und anderen Transkriptionsfaktoren auf Gen-Ebene gehemmt. Bei höheren Konzentrationen treten bei manchen Zelltypen schon nach kurzer Zeit Effekte auf, die nicht über genomische Wirkungen erklärbar sind. Diese macht man sich bei akuten Abstoßungsreaktionen im Sinne einer Cortison-Stoß-Therapie mit Gabe weniger hoher Dosen zunutze. Es wird daher zusätzlich ein membranständiger Glucocorticoid-Rezeptor postuliert. Bei sehr hohen Konzentrationen von Glucocorticoiden werden diese zunehmend auch in die Zellmembran integriert. Damit verändern sich unspezifisch die physikalischen Eigenschaften der Zellmembran (Buttgereit et al., 2004). Der transmembranöse Kationentransport nimmt ab; die gesamte Aktivierbarkeit der Zelle wird vermindert.

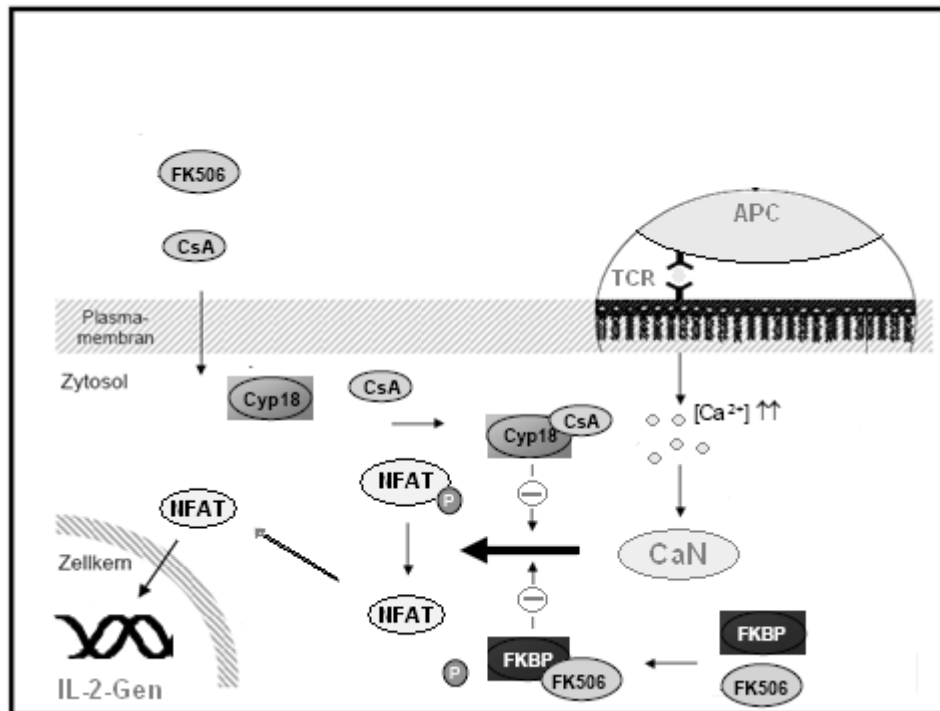


**Abb. 5: Mechanismen der intrazellulären Wirkung von Glucocorticoiden:** Als lipophile Substanzen gelangen sie sehr leicht durch die Zellmembran in das Zellinnere. Dort binden sie an ubiquitär, zytosolisch vorkommende Glucocorticoidrezeptoren. Dieses führt zu genomischen Effekten (I) oder zu nicht genomischen Effekten (II). Alternativ können sie aber auch über einen Glucocorticoidrezeptor an der Zelloberfläche interagieren (III). Glucocorticoide können direkt die physikalischen Eigenschaften der Zellmembran beeinflussen (IV) und hierüber immunsuppressive Effekte hervorrufen. (nach Buttgeriet et al., 2004)

Im Hinblick auf die pDC konnten Shodell und Siegal (2001) eine Verminderung der IFN- $\alpha$  Ausschüttung sowie eine Verminderung der Anzahl der pDC unter Corticoideinnahme von gesunden Probanden im Vergleich zu einer Kontrollgruppe finden. Auch an mDC sind immunsupprimierende Effekte durch Corticoide bekannt.

Die Einführung von Ciclosporin A (CsA) als Immunsuppressivum im Jahre 1980 trug entscheidend zur Verlängerung des Transplantatüberlebens bei (Vollmer et al., 1983). CsA ist ein Calcineurin-Inhibitor, hemmt die frühe T-Zell-Aktivierung und wirkt spezifisch auf die T-Zellfunktionen. Diese hängen von der Interaktion der T-Zelle mit ihrem Rezeptor ab und beziehen den kalziumabhängigen Signalübermittlungsweg ein. Es werden die Interleukine 2, 3 und 4, die TNF- $\alpha$  Antwort und andere Lymphokine gehemmt. CsA hemmt auch verschiedene B-Zell-Funktionen, ohne das Knochenmark in der Proliferation zu beeinflussen.

Tacrolimus (FK506) ist ein Makrolid-Lakton-Antibiotikum, das aus dem Kulturmedium eines japanischen Bakteriums, *Streptomyces tsukubaensis*, isoliert wurde. FK506 wirkt auf ähnliche Weise wie CsA, nur ist die Wirkung in vitro 10 bis 100 mal stärker (Kino et al., 1987).



**Abb. 6: Molekularer Wirkungsmechanismus der Calcineurininhibitoren:** Wird der T-Zell Rezeptor über eine APC stimuliert, strömt Kalzium in die Zelle ein. Kalzium aktiviert das Calcineurin. CsA bindet an das Cyclophilin. Dieser Komplex hemmt das Calcineurin. Der Transkriptionsfaktor (NFAT) kann nicht mehr dephosphoryliert werden und kann nicht mehr in den Zellkern übertreten. Eine T-Zell Antwort wird supprimiert. Analoges gilt für FK506 und seinem FK-Bindungsprotein (in Anlehnung an Liu J et al., 1991).

Calcineurin wird aktiviert, wenn sich der intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Spiegel erhöht. Dieses geschieht bei der T-Zelle infolge der Bindung des T-Zell-Rezeptors an entsprechende Antigen-MHC-Komplexe von APC unter Kostimulation weiterer Oberflächenmoleküle. Wenn Calcineurin aktiv ist, dephosphoryliert es die cytosolische Komponente des Transkriptionsfaktors NF-AT, die daraufhin in den Zellkern wandert und die Transkription des IL-2-Gens induziert. CsA und FK506 binden an unterschiedliche Gruppen von Immunophilinen: Erstes an die Cyclophiline und zweites an die sogenannten FK-bindenden Proteine. Bei beiden Immunophilinen handelt es sich um eine Peptidyl-Prolyl-cis-trans-Isomerase. Die Isomeraseaktivität der Bindungsproteine scheint jedoch nicht mit

der immunsuppressiven Wirkung der Medikamente zusammenzuhängen. Der Komplex aus Immunophilin und Medikament bindet vielmehr an die  $\text{Ca}^{2+}$ -aktivierte Serin/Threonin-Phosphatase und hemmt deren Aktivität (Liu J et al., 1991).

#### **1.4. Zink und das Immunsystem**

Zink ist neben Eisen und Selen ein wichtiges Spurenelement im menschlichen Körper. Es ist Co-Faktor von mehr als 300 Enzymen in allen 6 Enzymklassen (Coleman, 1992; Vallee & Falchuk, 1993). In einigen Enzymen ist Zink für die strukturelle Integrität des Proteins verantwortlich. Bei anderen Enzymen stellt es hingegen das Zentral-Ion für die enzymatische Aktivität. Von einigen Enzymen, wie z.B. bei der Alkoholdehydrogenase, sind beide Funktionen von Bedeutung. Eine große Anzahl von Zellaktivitäten ist zinkabhängig. So sind Faktoren, die mit DNA und RNA interagieren, wie zum Beispiel Zinkfinger-Proteine (z.B. Transkriptions- und Replikationsfaktoren) zinkabhängig. Insbesondere Zellteilungen können ohne Zink nicht stattfinden, so dass sich schnell teilende Gewebe wie z.B. das Knochenmark, die Haut oder die Reproduktionsorgane sensible Indikatoren für einen Zinkmangel darstellen. Darüber hinaus sind Mechanismen zur Stabilisierung von mRNA (Taylor und Blackshear, 1995) und der Apoptose (Jiang et al., 1995) zinkabhängig.

Starker Zinkmangel kann zur Störung der zellulären Immunität führen und ist Ursache der Acrodermatitis enteropathica. Die Acrodermatitis enteropathica geht einher mit einer Wachstumsretardierung, einem Immundefekt mit nachfolgend schweren Infektionen, einer Alopezie, schwerer Dermatitis, Diarrhoe und führt zu zentralnervösen Störungen. Diese seltene Erkrankung wird autosomal rezessiv vererbt und stellt einen Defekt der intestinalen Zinkabsorption dar. Seit kurzem ist bekannt, dass es sich um einen Defekt im Gen eines transmembranösen Proteins handelt, welches Zink transportiert (Wang et al., 2002).

Ein milder, erworbener Zinkmangel kann am ehesten durch immunologische Effekte, wie z.B. in Form einer erhöhten Neigung zu Infektionen beobachtet werden (Rink et al., 2000). Vor allem sind T-Zellen betroffen. Zinkmangel resultiert hier sowohl in einer verminderten Zellzahl als auch in einer Funktionsstörung, einschließlich einer Verschiebung einer T-Helferzellantwort in Richtung einer  $\text{T}_\text{H}$ -2 Antwort (Ibs und Rink, 2003). Aber auch andere Immunzellen sind zinkabhängig. Zinkmangel kann ebenso eine verminderte Fähigkeit zur

AK-Bildung zur Folge haben, bedingt durch eine verminderte Reaktivität von naiven B-Zellen gegenüber neuen Antigenen. NK-Zellen zeigen eine reduzierte zytotoxische Aktivität. Granulozyten, Monozyten und Makrophagen können nur eingeschränkt phagozytieren und intrazelluläre Erreger eliminieren. Des Weiteren ist auch die Aktivierung von Mastzellen über den  $Fc\epsilon$ -Rezeptor zinkabhängig (Kabu et al., 2003). Monozyten und Makrophagen sind stärker resistent gegenüber zu niedrigen oder zu hohen Zinkspiegeln im Vergleich zu anderen Immunzellen, jedoch kann beides mit intrazellulären Signaltransduktionswegen interferieren (Bülow von et al., 2005).

Kitamura et al. untersuchten die Rolle von Zink auf die Aktivierung von DC durch Lipopolysaccharide (LPS) (Kitamura et al., 2006). Sie konnten hierüber interessante neue Erkenntnisse gewinnen. Die Stimulation von DC mit LPS führt zu einer Aktivierung des TLR4, welcher eine verstärkte Expression von MHC-Proteinen sowie kostimulatorischer Moleküle (CD40, CD80 und CD86) bewirkt. Außerdem werden proinflammatorische Zytokine ausgeschüttet. Die Aktivierung mit LPS bewirkt eine differenzierte Expression von Zinktransporter-Proteinen an DC. Es kommt so zu Veränderungen in der Zink-Homöostase in den Zellen. Weitere Versuche geben Hinweise darauf, dass das Zink-Gleichgewicht wichtig für die Aktivierung von DC ist. Eine Zinksupplementation hebt die immunsupprimierenden Effekte wieder vollständig auf. Wird diese jedoch deutlich gesteigert, können sich wiederum inhibierende Effekte auf das Immunsystem ausbilden. Die Zink-Homöostase der Immunzelle gewinnt als ein primär wichtiger Faktor für die Zellfunktion an Bedeutung.

Zink gelangt über „Zink bindenden Proteine“ in die Zelle; der Ausstrom wird über Zinktransporter vermittelt. Fünfzehn Zink bindende Proteine und neun Zinktransporter konnten in menschlichen Zellen gefunden werden (Liuzzi et al., 2004). Overbeck et al. konnten 2007 einer B-, T-Zell- und Monozyten-Zelllinie eine unterschiedliche Verteilung der Zinktransporter zuordnen (Overbeck et al., 2007). Hierüber lässt sich eine unterschiedliche Empfindlichkeit der Immunzellen in Abhängigkeit zum Zinkspiegel bei Zinkmangelzuständen oder hoher Zinksupplementation erklären.

Im Alter sinkt der Zinkspiegel kontinuierlich ab. Eine milde Zinksubstitution soll bei älteren Patienten die IFN-Produktion rekonstituieren (Cakman et al., 1997). Gerade ältere Menschen sind gefährdet, virale Infektionen oder Tumorerkrankungen zu entwickeln. Die milde Zinksupplementation konnte die Interferon Ausschüttung von Leukozyten anheben.

Bei deutlich erhöhten Zinkdosierungen, 7-8 mal höher als der physiologische Zinkspiegel, kann dem gegenüber ein hemmender Effekt für die IFN- $\alpha$  Synthese beobachtet werden (Cakman et al., 1997). Der direkte Nachweis, dass die IFN- $\alpha$  Produktion von pDC durch Zink beeinflusst ist, wurde noch nicht erbracht.

Möglicherweise bietet eine hohe Zinksupplementation einen neuen Therapieansatz zur Immunsuppression bei moderatem Nebenwirkungsprofil. Anwendungen könnte dies bei T-Zell vermittelten Autoimmunerkrankungen finden wie z.B. bei rheumatoider Arthritis, bei der Spender-gegen-Wirt-Reaktion nach Knochenmarktransplantationen oder nach Organtransplantationen.

### **1.5. Atopische Diathese und dendritische Zellen**

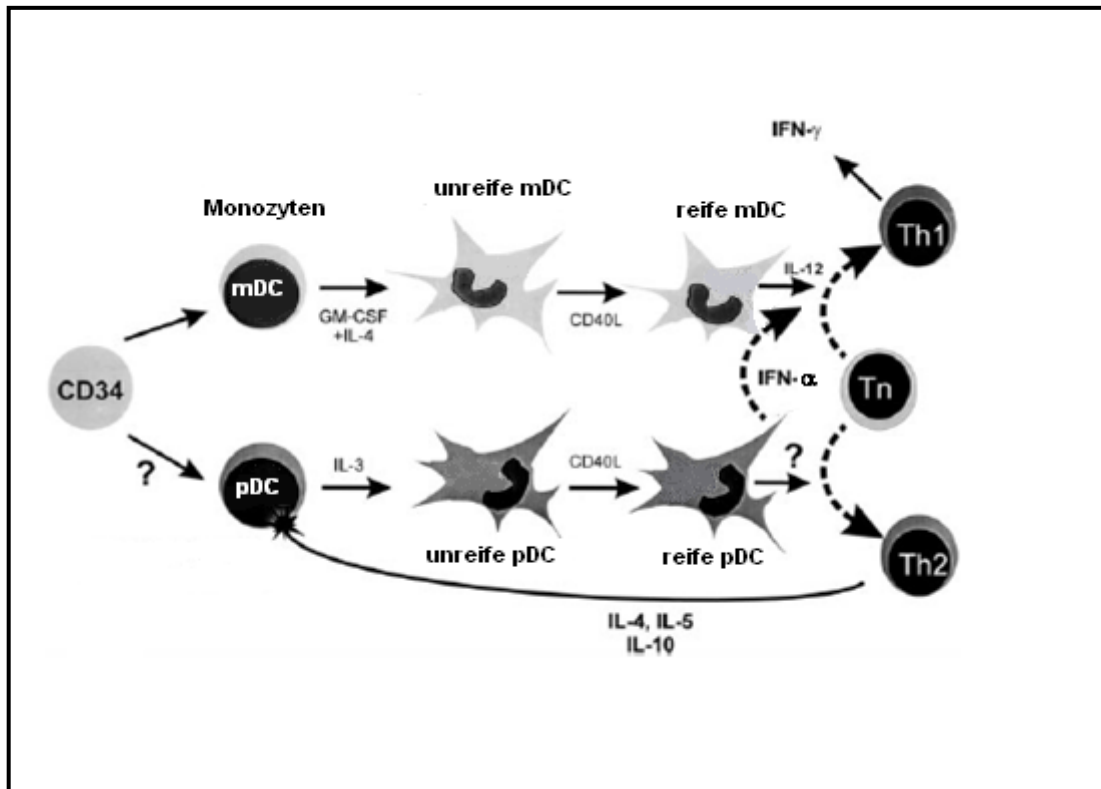
Die atopische Diathese ist charakterisiert durch drei hauptsächliche Leiden: Allergische Rhinokonjunktivitis, allergisches Asthma und atopische Dermatitis. Sie ist üblicher Weise mit einem Anstieg vom Immunglobulin E (IgE) im Serum vergesellschaftet. Die Sekretion von IFN- $\alpha$  und IL-4 sind im Zusammenhang mit den IgE-regulierenden Mechanismen von besonderer Bedeutung. Die meisten Allergene haben keinen direkten Kontakt zu B-Zellen im Blut oder zum lymphatischen Gewebe, so dass die Allergenaufnahme, -prozessierung und -präsentation von APC gewebständig und mit Kontakt zur Umwelt vollzogen werden muss (z.B. in der Lunge oder an der Nasenschleimhaut). Weil gewebständige DC die erste Linie der Verteidigung im peripheren Gewebe darstellen, sind sie am ehesten in der Lage, naive T-Zellen hinsichtlich eines Umweltallergens zu prägen. Es wurde beschrieben, dass Langerhans-Zellen (LC), Monozyten und mDC-1 einen hochaffinen Rezeptor für IgE, Fc $\epsilon$  RI exprimieren. Ob pDC diesen Rezeptor besitzen, ist bislang noch nicht untersucht worden. Der Fc $\epsilon$  RI Rezeptor auf LC und mDC-1 zeigt einige wichtige Unterschiede zur Rezeptorstruktur auf Effektorzellen der Anaphylaxie, wie z.B. Mastzellen oder basophile Granulozyten. Die Rezeptoren scheinen nicht konstitutiv auf den Zellen exprimiert zu werden, sondern werden vom inflammatorischen Mikromilieu, welches die Zellen umgibt, herauf reguliert. Die höchste Fc $\epsilon$  Rezeptor-Konzentration kann auf LC und mDC-1 der Epidermis in Läsionen der atopischen Dermatitis gefunden werden. Die Mechanismen der Regulation des Fc $\epsilon$  Rezeptors scheinen also im Zusammenhang mit allergischen Erkrankungen von besonderer Bedeutung zu sein (Kraft et al., 1998).



Das Vorkommen aktivierter Gedächtnis- $T_H2$  Zellen ist ein weiteres Charakteristikum der entzündlich veränderten Nasenschleimhaut bei Patienten mit allergischer Rhinitis. Eine Reihe an Zytokinen (z.B. IL-4, IL-5 und IL-13) wird von den T-Helferzellen produziert und als Auslöser für einen entzündlichen Prozess angesehen (Durham et al. 1992). Tiermodelle für die Atemwegs-Allergie weisen direkt auf eine DC vermittelte Aktivierung dieser T-Zellen hin. Lamprecht et al. (1998) depletierten die DC in Mäusen; danach konnte eine komplett supprimierte Entzündungsreaktion nachgewiesen werden (Lamprecht et al., 1998). An Ratten konnte von mucosaständigen DC berichtet werden, die Gedächtnis- $T_H2$  Zellen zügig nach aerogener Allergenexposition aktivieren (Huh et al., 2003). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass eine bestimmte Subpopulation von DC die aerogenen Antigene über längere Zeit vor Ort exprimieren und somit eine anhaltende Akkumulation von  $T_H2$  Zellen verursachen (Julia et al., 2002).

Darüber hinaus scheinen auch ortsständige Faktoren eine Rolle zu spielen. Von besonderer Wichtigkeit für die Immunmodulation scheinen die Epithelzellen der Mukosa zu sein. DC können über Adhäsionsmoleküle an der Epithelzelle binden, was ihnen erlaubt die Mukosa zu durchdringen ohne die Integrität der Schleimhaut zu stören. Der exakte Mechanismus der Antigenaufnahme durch die Mukosa hindurch ist noch nicht gänzlich verstanden. Eine aktive Rolle der Epithelzellen wird jedoch vermutet (van Tongeren et al., 2008)

Grundsätzlich können zwei funktionell unterschiedliche Subpopulationen von T-Helferzellen gefunden werden: Die  $T_H1$  und die  $T_H2$  Zellen. Bedingt durch das vorherrschende Zytokinmilieu sowie durch unterschiedliche Wege der Antigenpräsentation wird aus der nicht determinierten  $T_H0$  Zelle modellhaft eine  $T_H1$ - oder eine  $T_H2$ -Zelle. Bei der Präsentation der Antigene sind die DC maßgeblich beteiligt. Vereinfacht dargestellt, sind mDC-1 verantwortlich für eine  $T_H1$  Antwort, pDC hingegen für eine  $T_H2$  T-Zell Stimulation.



**Abb. 7: Darstellung der Generierung einer  $T_H-1$  bzw.  $T_H-2$  Antwort aus DC:** Die hämatopoetische Stammzelle differenziert unter dem jeweiligen Zytokinmilieu zu unreifen dendritischen Zellen. Die mDC-1 differenzieren über monozytäre Zellen unter Stimulation mit GM-CSF und IL-4. pDC werden über einen IL-3 Stimulus gebildet. Zur Ausreifung brauchen beide Subpopulationen CD40L. Vereinfacht führen mDC über IL-12 zu einer TH-1 Antwort, pDC können über ein derzeit noch unbekanntes Signal eine TH-2 Antwort hervorrufen. Sie sind jedoch auch in der Lage über IFN- $\alpha$  eine TH-1 Antwort zu generieren. (Modifiziert nach Bubnoff et al., 2001)

Eine  $T_H-1$  Antwort wird durch eine IL-12 Ausschüttung aus mDC generiert (Kennedy et al., 1994). Man nahm zunächst an, dass die Ausschüttung von IL-4 eine  $T_H-2$  Antwort auslöst. Kalinski et al. gaben Hinweise darauf, dass Prostaglandin  $E_2$  ( $PGE_2$ ) das Signal sein könnte, welches  $T_H-0$  Zellen zu einer  $T_H-2$  Antwort dirigiert (Kalinski et al., 1999). Rissoan et al. konnten zeigen, dass mDC eine  $T_H-1$  Antwort und pDC über einen von einer IL-4 Sekretion unabhängigen Weg eine  $T_H-2$  Antwort auszulösen vermögen (Rissoan et al., 1999).  $T_H-1$  Zellen schütten vor allem IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  sowie GM-CSF aus und führen über Makrophagen-Aktivierung zu ausgeprägten Entzündungsvorgängen, die auch das Abtöten von intrazellulären Erregern ermöglichen. Die  $T_H-2$  Zellen bilden vor allem IL-4, IL-5 und in geringeren Mengen viele weitere Interleukine. In Bezug auf die Allergie ist bei der Regulation der IgE-Produktion die  $T_H-2$  Zelle wesentlich beteiligt. Die Aktivierung der

IgE produzierenden B-Zelle erfolgt dabei vor allem über das CD40/CD40-Liganden System. IL-4 und IL-13 bzw. lösliche Form des IL-4-Rezeptors (IL-4-R) werden freigesetzt, die zusätzlich zur IgE-Produktion beitragen.

Uchida et al. (2001) konnten einen Anstieg der pDC bei Patienten mit Atopie nachweisen. Die absolute Anzahl im peripheren Blut soll mit der Krankheitsaktivität korrelieren (Uchida et al., 2001). In diesem Zusammenhang könnte sich eine quantitative Verschiebung der DC-Subpopulationen auch auf das  $T_H-1/T_H-2$ -Gleichgewicht auswirken. Darüber hinaus konnten Uchida et al. keinen Unterschied in der Expression von Aktivierungsmarkern auf DC von Atopikern versus einer gesunden Kontrollgruppe sehen. IL-4 führte in der gesunden Kontrollgruppe unter Kostimulation mit IL-3 zu einer verminderten Zahl an pDC; diese Effekte waren bei Atopikern deutlicher ausgeprägt. Auch Reider et al. (2002) finden bei Atopikern eine Verschiebung der pDC/mDC-1 Ratio zugunsten der pDC im peripheren Blut (Reider et al., 2002).

Es gibt viele Hinweise darauf, dass die DC wesentlich an der Genese einer allergischen Erkrankung beteiligt sind. Zum einen durch die Präsentation des Antigens, zum anderen durch die Modifikation der  $T_H-1/T_H-2$ -Antwort. Es kann angenommen werden, dass die pDC im besonderem Maße den Ausschlag geben, ob eine IgE-Antwort generiert wird. Jedoch sind die Vorgänge komplex und hängen u.a. von der Lokalisation des Gewebes, von der zeitlichen Kinetik, vom Antigen und von der lokalen Verteilung der dendritischen Subpopulationen ab. Darüber hinaus kann das Verständnis von der Immunologie der DC neue Möglichkeiten der Therapie eröffnen. Induziert man experimentell eine allergische Reaktion, so steigt die Zahl der pDC in der Nasenschleimhaut dramatisch an (Jahnsen et al., 2000). Die pDC präsentieren den  $T_H-2$  Zellen das Antigen (das Allergen). Horner et al. setzten unmethylierte CpG-Oligodesoxynucleotide im Tiermodell ein, die an den TLR 9 der pDC binden. Hierdurch konnten allergische Reaktionen an den Atemwegen verhindert und gebessert werden (Horner et al., 2002).

## 1.6. Fragestellungen

Erst kürzlich konnten die Hauptproduzenten von Interferon- $\alpha$  (IFN- $\alpha$ ) im peripheren Blut des Menschen als plasmazytoide, dendritische Zellen (pDC) identifiziert werden. Bislang ist über die biologische Funktion dieser Zellen und ihrer Interaktion mit anderen Immunzellen wenig bekannt. Vom Botenstoff IFN- $\alpha$  weiß man seit langem, dass dieser im Zentrum viraler Abwehrreaktionen steht, aber auch antitumoröse Wirkungen entfaltet.

Die moderne Medizin bedient sich immer häufiger einer starken und zugleich möglichst steuerbaren Immunsuppression zur Behandlung autoimmunologischer Erkrankungen sowie in der Transplantationsmedizin. Der Einfluss von Immunsuppressiva auf die IFN- $\alpha$  Ausschüttung der pDC wurde bislang nicht untersucht. Diese Experimente könnten gerade im Bereich der Transplantationsimmunologie, insbesondere bei der Frage der Organabstoßung und Virusreaktivierung eine wichtige Bedeutung haben. Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Hauptfragestellung, in wie weit sich die IFN- $\alpha$  Ausschüttung aus pDC mit denen in der Transplantationsmedizin eingesetzten Immunsuppressiva beeinflussen lässt.

Zusätzlich wurde auch nach einer Substanz gesucht, die die IFN- $\alpha$  Ausschüttung stimulieren könnte. In diesem Zusammenhang bot sich Zink an. Dieses wird zur Prophylaxe von Erkältungskrankheiten angeboten und soll einen günstigen Einfluss auf den Verlauf von viralen Infektionen haben und das menschliche Immunsystem stärken. Aus der Arbeitsgruppe von Prof. Kirchner konnte bereits gezeigt werden, dass Zink einen stimulierenden Effekt auf die IFN-Produktion bei älteren Menschen ausübt (Cakman et al., 1997). Die Untersuchungen wurden damals an Leukozyten durchgeführt und nicht gezielt an aufgereinigten DC, die Siegal et al. erst 1999 als Interferon produzierende Zellen (IPC) identifiziert hat. Überraschenderweise wurde in hohen Zinkkonzentrationen in vitro eine hemmende Wirkung auf die IFN- $\alpha$  Ausschüttung beschrieben. Aus dieser Beobachtung ergab sich für die hier vorliegende Arbeit eine neue Fragestellung: Können hohe Zinkkonzentrationen die IFN- $\alpha$  Antwort von pDC supprimieren?

Darüber hinaus ist bekannt, dass pDC eine zentrale Rolle bei der Entstehung von Allergien einnehmen. Das Gleichgewicht zwischen T<sub>H</sub>-1 und T<sub>H</sub>-2 Antwort sowie die Toleranzentwicklung gegenüber an sich harmlosen Umwelt-Antigenen wird durch die DC

und ihre Interaktion mit anderen immunkompetenten Zellen maßgeblich beeinflusst. Die Atopie ist immunologisch gekennzeichnet durch eine IgE vermittelte, histaminerge Entzündungsreaktion u.a. ausgelöst durch Mastzellen und basophile Granulozyten. Über Antigenpräsentation, T-Helferzellkontakt und Generierung einer  $T_H$ -2-Antwort mit nachfolgend erhöhter IgE-Produktion werden die Anaphylaxine freigesetzt, die zur entzündlichen Reaktion führen. Mit der Entdeckung der DC-Subpopulationen, sind wir der zusätzlichen Fragestellung nachgegangen, in wie weit pDC quantitativ oder funktionell in Bezug auf die IFN- $\alpha$ -Antwort bei Patienten mit atopischer Diathese verändert sind.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1. Material**

#### **2.1.1. Geräte**

	<b>Firma</b>
Analysenwaage 2002 MPI	Sartorius, Göttingen
Bakterieninkubator Certomat H	Braun, Melsungen
Dampf-Groß-Sterilisator Hydromat E14	Webeco, Bad Schwartau
Durchflusszytometer EPICS XL-MCL	Coulter, Krefeld
ELISA-Lesegerät	Anthos, Salzburg/Österreich
ELISA-Waschgerät	Biotest, Dreieich
Gefriertruhe, -80°C	Nuaire, Plymouth/USA
Finnpipetten 40-200 µl	Labsystems, Helsinki/Finnland
Multi-Q-Prep	Coulter, Krefeld
Pipettierhilfe Pipetboy acu	Vitaris, Baar/Schweiz
Pipetten Reference 0,5-10 µl, 10-100 µl, 200-1000 µl	Eppendorf, Hamburg
Rüttler Reax 2000	Heidolph, Kelheim
Rüttler Sample Mixer	Dynal, Hamburg
Sterile Werkbank	Nuair, Plymouth/USA
Super MACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Vario MACS	Miltenyi, Bergisch Gladbach
Vollblut-Zellzähler STKS	Coulter, Krefeld
Zentrifuge Kühlzentrifuge 2415	Sigma, Deisenhofen
Zentrifuge Minifuge Centrifuge 5415C	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Omnifuge RS 3.2	Heraeus Christ, Osterode

#### **2.1.2. Laborbedarf**

24 - Loch Kulturplatten	Falcon, Heidelberg
Auslaufpipetten 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Greiner, Nürtingen
D-Säulen	Miltenyi, Bergisch Gladbach
EDTA-Monovetten 3,5ml	Sarstedt, Nürmbrecht
Kanülen Microlance3	Becton Dickinson, Heidelberg

Kunststoffröhrchen 50ml	Falcon, Heidelberg
Kunststoffröhrchen 15ml	Sarstedt, Nürmbrecht
Kunststoffröhrchen 5ml mit Deckel	Greiner, Nürtingen
Kunststoffröhrchen für das Durchfluscytometer	Greiner, Nürtingen
Perfusorspritzen 50ml	Braun, Melsungen
Pipettenspitzen 1-10µl, 10-100µl, 100-1000µl	Greiner, Nürtingen
Reaktionsgefäße 1,5ml	Sarstedt, Nürmbrecht
RS-Säulen	Miltenyi, Bergisch Gladbach

### 2.1.3. Biologische Materialien

PBMC von Blutspendern des Institutes für Immunologie und Transfusionsmedizin des UK S-H Campus Lübeck

Humanes Serum Albumin (Universitätsapotheke, UK S-H Campus Lübeck)

New Castle Disease Virus (PD Dr. R. Zawatzki, DKFZ Heidelberg)

### 2.1.4. Immunologische Reagenzien

#### Firma

anti-BDCA-1-Fitc-konjugiert	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-BDCA-2-PE-konjugiert	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-BDCA-3-PE-konjugiert	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-BDCA-4-PE-konjugiert	Miltenyi, Bergisch Gladbach
anti-CD3-Cy5-konjugiert	Coulter, Krefeld
anti-CD14-Cy5-konjugiert	Coulter, Krefeld
anti-CD16-Cy5-konjugiert	Coulter, Krefeld
anti-CD19-Cy5-konjugiert	Coulter, Krefeld
anti-CD20-Cy5-konjugiert	Coulter, Krefeld
anti-CD56-Cy5-konjugiert	Coulter, Krefeld
anti-CD11c-PE-konjugiert	Pharmingen, Hamburg
anti-CD123-PE-konjugiert	Becton Dickinson, Heidelberg
anti-HLA-DR-Fitc-konjugiert	Coulter, Krefeld
anti-HLA-DR-PE-konjugiert	Coulter, Krefeld
anti-IgG2a-Fitc-konjugiert/IgG1-PE-konjugiert	Coulter, Krefeld
anti-IgG1-Cy5-konjugiert	Coulter, Krefeld
anti-IgG1-Fitc-konj./IgG1-PE-konj./IgG1-Cy5-konj.	Coulter, Krefeld

Dendritic Cell Isolation Kit	Miltenyi, Bergisch Gladbach
ELISA für humanes Interferon- $\alpha$	Bender, Wien/Österreich

### 2.1.5. Chemikalien und Reagenzien

	Firma
Biocoll Separating Solution	Seromed Biochrom, Berlin
Ciclosporin A (Sandimmun)	Novartis, Nürnberg
Prednisolon (Decortin H)	Merck, Darmstadt
Fetales Kälberserum	Gibco, Karlsruhe
Flow-Count-Beads	Coulter, Krefeld
Natriumcitratlösung 4%	Baxter Deutschland, München
L-Glutamin	Seromed Biochrom, Berlin
Penicillin 10000 E/ml Streptomycin 10000 $\mu\text{g}/\text{ml}$	Seromed Biochrom, Berlin
Phosphatpuffer PBS 2,5l	Nexell, Zug/Schweiz
Phosphatpuffer Dulbecco's PBS w/o $\text{Ca}^{2+}$ , $\text{Mg}^{2+}$	Bio Whittaker, Heidelberg
RPMI 1640	Seromed Biochrom, Berlin
FK506 (Prograf)	Astellas Pharma, München
Zn-SO $^{4+}$	Merck, Darmstadt



## 2.2. Methoden

### 2.2.1. Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie beschreibt eine optische Messanordnung, bei der Zellen oder andere Partikel auf Größe, Granularität, Oberflächenmerkmale und intrazelluläre Merkmale untersucht werden können. Eine Zellsuspension wird vom Gerät angesaugt und mit einer isotonischen Hüllstromflüssigkeit versehen. Die Zellen dieses Gemisches werden durch Einengung des Lumens vereinzelt und in einer lichtdurchlässigen Küvette an einem Laser (hier Argon-Laser  $\lambda=488\text{nm}$ ) vorbeigeführt. Größe und Granularität einer Zelle werden durch die Eigenschaften des Vorwärts- (FSC) und Seitwärtsstreulichtes (SSC) bestimmt. Die Streustrahlung wird von Photodetektoren aufgenommen und durch Photoverstärker gemessen, die in ihrer Anordnung im Gerät die beiden Streulichtqualitäten erfassen.

Spezifische Oberflächenmerkmale einer Zelle können mit Hilfe von selektiv an diese bindende, monoklonale AK detektiert werden. Hierzu müssen fluoreszierende Farbstoffe (Fluorochrome) direkt an den AK oder indirekt über einen sekundären AK gekoppelt werden. Fluorochrome sind häufig Ringstrukturen. Sie werden beispielsweise aus Pflanzen oder Algen gewonnen und haben die Eigenschaft durch die Anregung mit einem Laser ein bestimmten Frequenzbereich von Licht (z.B. grün, orange oder rot) zu emittieren. Dieses kann spezifisch von Photodetektoren nach Filterung (hier 525, 575 und 650 nm) und Verstärkung in seiner Intensität bestimmt werden. Andere Wellenlängenbereiche werden somit nur wenig erfasst. Grundsätzlich bietet das Durchflusszytometer die Möglichkeit mehrere Fluorochrome auf einer einzelnen Zelle gleichzeitig zu bestimmen. In den hier beschriebenen Versuchsanordnungen findet eine Dreifarbfloreszenzmessung Anwendung. Die verstärkten elektronischen Ereignisse werden mittels elektronischer Datenverarbeitung graphisch aufgearbeitet und z.B. in Histogrammen dargestellt. Proben aus dem peripheren Venenblut werden nach 15 Minuten Inkubation mit den entsprechenden AK vollautomatisch im „Multi-Q-Prep“-Gerät zur Messung vorbereitet, so dass die Zielzellen (hier Leukozyten) fixiert und Erythrozyten effektiv lysiert werden. Die hierfür notwendigen Chemikalien sind gebrauchsfertig für das Gerät zu erwerben. Aufgereinigte Zellen werden nicht in dem "Multi-Q-Prep" Gerät aufgearbeitet, sondern lediglich in Phosphatpuffer (PBS) suspendiert. Eine direkte

Quantifizierung ermöglichen "Flow-Count-Beads"; eine Suspension von ca. 10µm großen, fluoreszierenden Partikeln in definierter Konzentration. Werden bestimmte Volumina der Zellsuspension zu bestimmten Volumina der "Beads" gegeben, kann über Ihre Relation zueinander die Zellkonzentration bestimmt werden.

Protokoll:

- peripheres Venenblut in Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) Monovette (3,5 ml)
- Zugabe von 10 µl AK laut folgendem Pipettierschema:

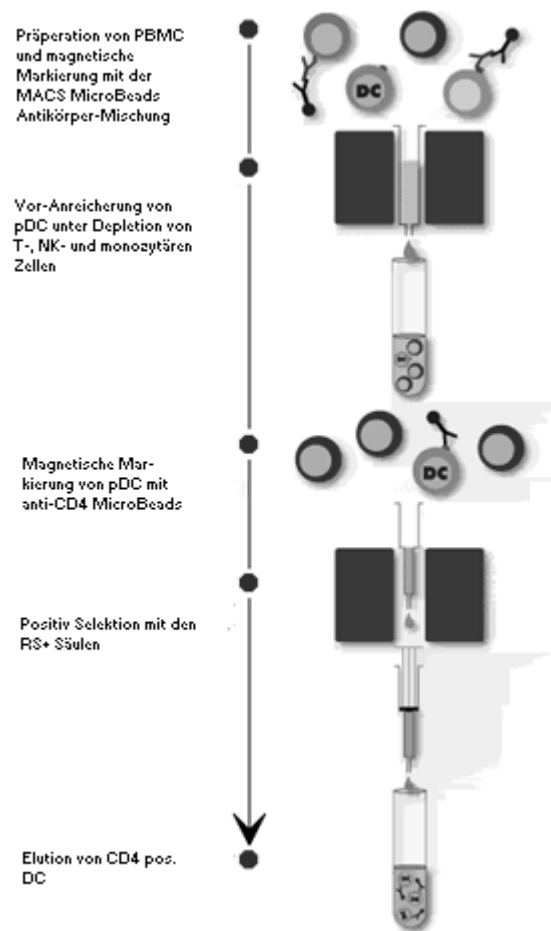
	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Fitc</b>	IgG1	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR	HLA-DR	IgG2a	BDCA-1
<b>PE</b>	IgG1	CD123	CD11c	BDCA-2	BDCA-3	BDCA-4	IgG1	HLA-DR
<b>Cy5</b>	IgG1	CD3	CD3	CD3	CD3	CD3	IgG1	CD3
		CD14	CD14	CD14	CD14	CD14		CD14
		CD16	CD16	CD16	CD16	CD16		CD16
		CD19	CD19	CD19	CD19	CD19		CD19
		CD20	CD20	CD20	CD20	CD20		CD20
		CD56	CD56	CD56	CD56	CD56		CD56

Tab. 1 Pipettierschema der verschiedenen AK

- Zugabe von 100 µl EDTA-Blut, mischen, 20 min im Dunkeln inkubieren
- Erythrozytenlyse und Fixierung der Leukozyten im "Multi-Q-Prep"-Gerät
- 100 µl gut gemischte, auf 20 °C temperierte "Flow-Count-Beads" hinzufügen
- Proben werden im Durchflusscytometer gemessen

### 2.2.2. Aufreinigung dendritischer Zellen

Die Aufreinigung mit dem "Dendritic Cell Isolation Kit" funktioniert über magnetische Zellseparationen (MACS) in zwei Schritten. Die PBMC eines Buffy Coats werden nach einer Ficoll-Depletion mit einem Antikörpermischung, das sich gegen T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten richtet, beladen. Die Suspension wird über eine Säule, die mit Eisenwolle gefüllt ist und einem starken Magnetfeld ausgesetzt wird, geschickt. Im Eluat finden sich die DC und weitere Zellen wie zum Beispiel B-Zellen, die nicht von dem Antikörpermischung erfasst wurden. Die T-Zellen, NK-Zellen und Monozyten verbleiben auf der Säule. Es folgt eine Positivselektion des Eluates mittels eines anti-CD4-Antikörpers, welcher nun spezifisch die DC bindet. Nach dem o.g. Prinzip wird das Gemisch über eine neue Säule gegeben. An dieser gebunden befinden sich die DC, welche nach Entfernung des Magnetfeldes mit Puffer eluiert werden können. Die Suspension enthält jetzt CD4 positive DC, also die drei bisher bekannten Subpopulationen von DC und sollte zügig weiterverarbeitet werden.



**Abb. 8: Aufreinigung pDC**  
(In Anlehnung an Miltenyi Biotec)

Protokoll:

- 25 ml "Buffy Coat" 1:2 mit PBS verdünnen und in 50 ml Kunststoffröhrchen füllen
- auf 20 ml Ficollösung schichten und zentrifugieren (20 min, 600xg)

- Interphase mit steriler Pipette (2 ml) in 50 ml Kunststoffröhrchen überführen und mit
- MACS-Puffer 2xwaschen (10 min, 300xg)
- Bestimmung der Zellzahl am Vollblutzellzähler und einstellen auf  $5 \times 10^8$  PBMC
- Entnahme eines Aliquots für eine Zellzahlbestimmung am Durchflusszytometer
- Einengung des Volumens durch Zentrifugation (10 min, 300xg)
- Pro  $1 \times 10^8$  PBMC werden 300  $\mu$ l MACS-Puffer, 100  $\mu$ l Fc-Blocking Reagent und 100  $\mu$ l Hapten Antibody Cocktail pipettiert, gut mischen
- 10 min bei 2-8 °C inkubieren
- 2 x waschen mit 10 ml MACS-Puffer pro  $1 \times 10^8$  Zellen (300xg, 10 min)
- Zellen in 900  $\mu$ l MACS-Puffer und 100  $\mu$ l Anti-Hapten Microbeads pro  $1 \times 10^8$  PBMC aufnehmen
- 15 min bei 2-8 °C inkubieren
- D-Säule in Super-MACS positionieren und mit MACS-Puffer spülen
- Zellen auf die Säule geben und mit insgesamt 200 ml MACS-Puffer spülen, während dessen Eluat in 50 ml Kunststoffröhrchen auffangen und zentrifugieren (10 min, 300xg)
- Pellets in 100  $\mu$ l zusammenführen und mit 100  $\mu$ l anti-CD4 Microbeads versetzen
- 30 min bei 2-8 °C inkubieren
- Zellen im 4 ml MACS-Puffer aufnehmen und waschen (10 min, 300xg)
- RS-Säule in Vario-MACS positionieren und mit 500  $\mu$ l MACS-Puffer spülen
- Resuspension der Zellen in 500  $\mu$ l MACS-Puffer und überführen auf die RS-Säule, mit anschließendem dreimaligen Spülen mit 500  $\mu$ l MACS-Puffer
- Entnahme der Säule und Elution der Zellen mit 1 ml MACS-Puffer unter Forcierung mit dem Säulenkolben
- Procedere der letzten 3 Schritte wiederholen
- Zellen zügig weiterverarbeiten

### **2.2.3. Virus-Stimulation dendritischer Zellen**

Die im magnetischen Verfahren aufgereinigten DC werden einer standardisierten Virusstimulation ausgesetzt. Es hat sich als geeignet erwiesen  $2 \times 10^5$  pDC /ml für vier Stunden mit den Immunsuppressiva bzw. Zink vorzuinkubieren. In dieser Zeit sollen die erwünschten Reaktionen an den pDC erfolgt sein. Nachfolgend wurde 20 Stunden eine Virus-Stimulation zur Provokation einer IFN- $\alpha$  Ausschüttung mit dem New Castle Disease Virus (NDV) durchgeführt. Das Virus ist verantwortlich für die Newcastle Erkrankung bei

Geflügel und kann eine Konjunktivitis beim Menschen hervorrufen. Es handelt sich um ein Einzel-Strang-RNA-Virus der Familie Paramyxoviridae. Es wird der 2001 für das NDV neugeschaffenen Gattung Avulavirus zugeordnet.

Protokoll:

- Aufgereinigte dendritische Zellen werden nach o.g. Protokoll über anti-CD123-PE angefärbt und mit Hilfe von "Flow-Count-Beads" im Durchflusszytometer quantifiziert
- $2 \times 10^5$  / ml pDC werden pro Vertiefung einer 24-Loch Platte eingesetzt, Wirksubstanzen pipettiert und mit RPMI-Kulturmedium auf ein Zielvolumen von 1ml aufgefüllt
- 4 Stunden Vorinkubation mit Wirksubstanz (CsA, FK506, Decortin H und Zink) bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>
- Viraler Stimulus mit 10 U NDV für weitere 20 Stunden bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>
- Überstand wird abgenommen, danach zentrifugiert (10000 rpm), der Überstand in ein Reaktionsgefäß überführt und bei -80 °C eingefroren

#### **2.2.4. Interferon- $\alpha$ Quantifizierung**

Die Interferon- $\alpha$  Konzentrationen wurden mit einem "Enzyme Linked Sorbent Assay" (ELISA) bestimmt. Ein anti-IFN- $\alpha$ -Antikörper adsorbiert an einer Microtiterplatte, so dass IFN- $\alpha$  an ihn binden kann. Ein zweiter Peroxidase-konjugierter anti-IFN- $\alpha$ -Antikörper wird hinzugefügt und bindet ebenfalls an das Interferon- $\alpha$ . Nach Inkubation wird in einem Waschschrift überzähliges Konjugat entfernt und eine Substratlösung aufgebracht. Das Substrat wird durch die Peroxidase in einen Farbkomplex umgewandelt. Je mehr Peroxidase vorhanden ist desto stärker fällt die Farbreaktion aus. Die Konzentration von IFN- $\alpha$  kann somit indirekt über die Konzentration der Peroxidase und somit über die Stärke der Farbreaktion ermittelt werden. Diese wird nach 15 Minuten durch Zugabe von Säure unterbrochen, um dann die Absorption von Licht in einem speziellen Photometer (ELISA-Reader) bei einer Wellenlänge von 450 nm zu bestimmen. Für eine genaue Quantifizierung der IFN- $\alpha$  Konzentration wird eine Standardkurve erstellt, hier in sieben definierten Konzentrationen von 8 pg/ml bis 500 pg/ml. Zur Erhöhung der Validität der Methode werden die Proben sowie die Standardreihe doppelt bestimmt und gemittelt.

Protokoll:

- Alle Reagenzien sollten vor Gebrauch gut gemischt und auf Raumtemperatur (RT)

gebracht werden

- Microwells werden mit 300  $\mu$ l Wasch-Puffer 2 $\times$  gewaschen
- Eine Standardreihe wird mit Hilfe des bereits gelösten Interferon- $\alpha$  unter Halbierung der Konzentration absteigend erstellt , ebenso ein Nullwert.
- Zur Messung der Proben werden 80  $\mu$ l "Assay-Puffer" und 20  $\mu$ l der Probe in ein Microwell gegeben
- 50  $\mu$ l des verdünnten HRP-Konjugates werden in alle Vertiefungen der Platte gegeben
- Die Platte wird mit Folie versiegelt und 2 Stunden auf einen Microtiterplattenschüttler bei 100 rpm bei RT inkubiert
- die Microtiterplatte wird 3 $\times$  mit 300 $\mu$ l Waschpuffer gewaschen
- 100 $\mu$ l einer Substratlösung werden in jede Vertiefung pipettiert
- nach 15 min wird die Farbreaktion mit 100  $\mu$ l der Stopplösung unterbrochen, dann wird bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Reader gemessen

### 2.2.5. Auswertung der Ergebnisse

Die Ergebnisse basieren auf der Auswertung einer Reihe von einzelnen Experimenten. Die Ergebnisse sind dabei als Mittelwerte samt Standardabweichung dargestellt (Anzahl der Einzelexperimente  $n = x$ ). Zur statistischen Auswertung wurde die Anwendung "SPSS für Windows" benutzt. Eine statistische Bewertung erfolgte mit dem verteilungsunabhängigen Vergleich zweier verbundener Stichproben anhand des Vorzeichen-Rang-Tests von Wilcoxon (Wilcoxon matched-pairs signed-rank test). Signifikanzen wurden wie folgt dargestellt:  $* = p < 0,05$ . Die Erstellung der Diagramme erfolgte mit der Anwendung "Sigma Plot 7.0".

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Phänotypisierung und Quantifizierung dendritischer Zellen

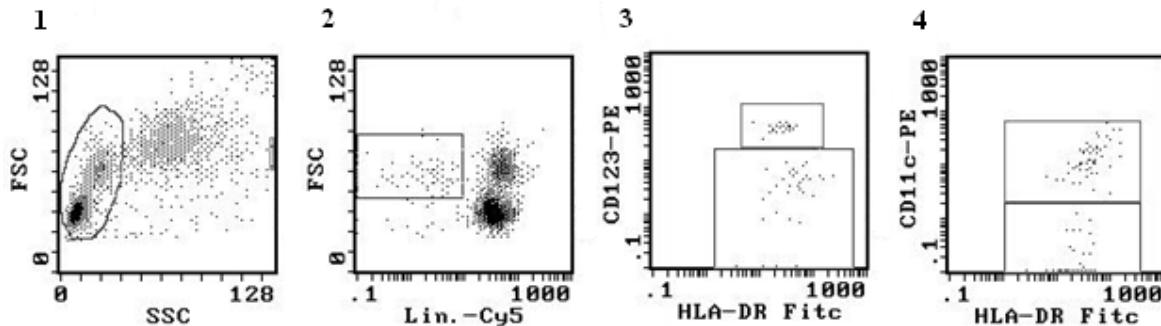
DC sind wichtige APC und gehören zu den immunkompetenten Zellen des spezifischen sowie unspezifischen Abwehrsystems. Die Unterscheidung von DC im peripheren Blut ist über die Markierung mit spezifischen fluoreszenzmarkierten Immunglobulinen möglich. Hier weisen die unterschiedlichen Subtypen eine ihnen typische Verteilung von Epitopen auf. Aktuell unterscheidet man zwischen drei dendritischen Zelltypen im peripheren Blut. Diese können mittels der aufgeführten Oberflächenmerkmale charakterisiert werden.

mDC-1	pDC	mDC-2
CD1c+	CD1c-	CD1c-
CD4+/-	CD4+	CD4+/-
CD11c+	CD11c-	CD11c+/-
CD33+	CD33-	CD33+/-
CD45RA-	CD45RA+	CD45RA-
CD123-	CD123+	CD123-
BDCA-2-	BDCA-2+	BDCA-2-
BDCA-3-	BDCA3-	BDCA-3+
BDCA-4-	BDCA-4+	BDCA-4-
HLA-DR+	HLA-DR+	HLA-DR +

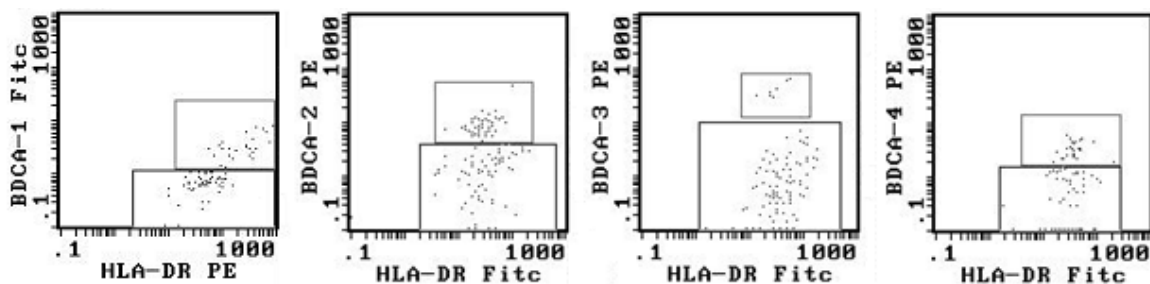
Tab. 2: Ausgewählte Epitope zur Differenzierung von Subtypen dendritischer Zellen

Es ergeben sich mehrere Möglichkeiten zur Immunphänotypisierung. Zum einen kann eine Kombination von AK gegen spezifische Oberflächenmerkmale der bekannten Zellreihen im peripheren Blut (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56) zum Einsatz kommen. Im Anschluss werden die Zellen, die keine der genannten Merkmale auf ihrer Oberfläche exprimieren, für das Merkmal HLA-DR und einen spezifischen Marker für die jeweilige dendritische Subpopulation angefärbt (s. Abb. 7). Zum anderen ergibt sich neuerdings die Möglichkeit die DC über spezifische Antikörper anfärben zu können (s. Abb. 8). Dabei entspricht eine Anfärbung mit BDCA-2 und BDCA-4 einer pDC. Die sehr gering vorkommende mDC-2 wird mittels BDCA-3 phänotypisiert. Der in dieser

Nomenklatur vorkommende BDCA-1 AK entspricht dem bereits bekanntem CD11c und färbt die mDC-1 an (Dzionic et al., 2000).



**Abb. 9: Durchflusszytometrische Messung von mDC-1 und pDC.** Im Histogramm 1 kommen die Leukozyten nach Größe (FSC) und Granularität (SSC) zur Darstellung. Der Bereich der Lymphozyten und Monozyten wird untersucht. Histogramm 2 zeigt die „Lineage“ negativen Zellen im Fenster, diese werden wiederum auf das Merkmal HLA-DR untersucht und für die weitere Analyse ausgewählt. Im Histogramm 3 zeigen sich die pDC, positiv für CD123 sowie in Histogramm 4 die CD11c positiven mDC-1.



**Abb. 10: Durchflusszytometrische Messung von DC mittels der BDCA Antikörper.** Die Histogramme zeigen die Färbung mit den neuentwickelten Antikörper gegen spezifische Epitope auf dendritischen Zellen. In den Histogrammen zeigen sich von links mDC-1, pDC, mDC-2 und pDC im jeweils oberen Fenster.

Die durchflusszytometrische Phänotypisierung von dendritischen Zellen aus dem peripheren Blut wurde im Labor etabliert. Hierfür wurde bei 12 gesunden, zufällig ausgewählten Blutspendern (nicht Allergiker) EDTA-Blut abgenommen. Hieraus wurden neben einem Routine-Blutbild die dendritischen Subpopulationen am Durchflusszytometer bestimmt. Es wurde auf ein ausgewogenes Alters- und Geschlechtsverhältnis geachtet.



	Leukozyten [/ $\mu$ l]	DC gesamt [/ $\mu$ l]	DC gesamt %	mDC-1 [/ $\mu$ l]	pDC [/ $\mu$ l]	mDC-2 [/ $\mu$ l]
1	5700	19	0,33	12	5	2
2	4000	26	0,65	11	9	1
3	7200	50	0,69	22	12	1
4	4500	23	0,51	17	6	1
5	6200	43	0,69	16	11	2
6	4600	19	0,41	6	10	1
7	4300	23	0,53	14	7	1
8	5000	16	0,32	7	7	1
9	5100	22	0,43	14	9	1
10	5000	25	0,50	14	9	1
11	4800	29	0,60	12	12	1
12	4200	30	0,71	21	12	2
<b>MW</b>	<b>5050</b>	<b>27</b>	<b>0,53</b>	<b>14</b>	<b>9</b>	<b>1</b>
<b><math>\pm</math>SD</b>	<b>920</b>	<b>10</b>	<b>0,13</b>	<b>4,8</b>	<b>2,4</b>	<b>0,5</b>

**Tab. 3: Zellzahlbestimmung von dendritischen Vorläuferzellen** im peripheren Venenblut von 12 gesunden Blutspendern (nicht Allergiker)

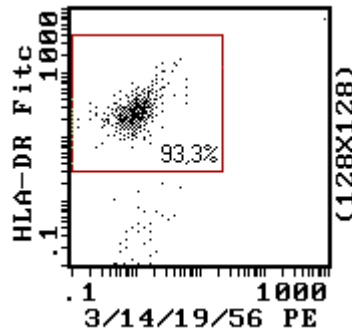
Die Diskriminierung der dendritischen Zellpopulationen wies je nach gewähltem AK sowie Epitop Unterschiede auf. Schließlich wurde für die mDC-1 die Färbung mit CD11c durchgeführt. Unter Verwendung des BDCA-1 AK zeigte sich in der hier gewählten Untersuchungsanordnung eine schlechte Abgrenzung zwischen der positiven und negativen Population (s. Abb.8). Die pDC wurden bei guter Diskriminierung mit CD123 gefärbt. Die mDC-2 mit BDCA-3 gefärbt. Die untersuchte Gruppe der Blutspender wies die aus der Literatur zu erwartenden Werte für mDC-1 und pDC auf, jeweils etwa 0,3 % der Leukozyten. ( O'Doherty et al., 1994).

### 3.2. IFN- $\alpha$ Produktion aus plasmazytoiden dendritischen Zellen

Mit einer Konzentration von deutlich weniger als 1% der Leukozyten stellen die pDC eine seltene Zellsubpopulation dar. Aus diesem Grund wurden Buffy-Coats zur Isolation von pDC verwendet. Sie entstehen bei der Komponentenauffrennung einer Vollblutspende und weisen eine hohe Gesamtzahl von ca.  $1 \times 10^9$  Leukozyten auf. Hierüber kann eine

ausreichende Zahl an pDC aufgereinigt werden, um messbare Mengen an IFN- $\alpha$  zu generieren.

In einem ersten Schritt wurden die Blutzellen einem Dichtegradienten (Ficoll) zugeführt, um PBMC aufzureinigen. Ein kleines Aliquot wurde zur durchflusszytometrischen Quantifizierung und Errechnung der Wiederfindungsrate von DC entnommen. Es konnten mit dem geschilderten Versuchsaufbau Wiederfindungsraten im Mittel (n=6) von  $47,4 \pm 15,6\%$  gefunden werden. Ein sehr wichtiges zusätzliches Qualitätskriterium einer Aufreinigung ist die Reinheit der Zielzellen; hier konnten im Schnitt (n=6)  $89,2 \pm 12,2\%$  DC gemessen werden.

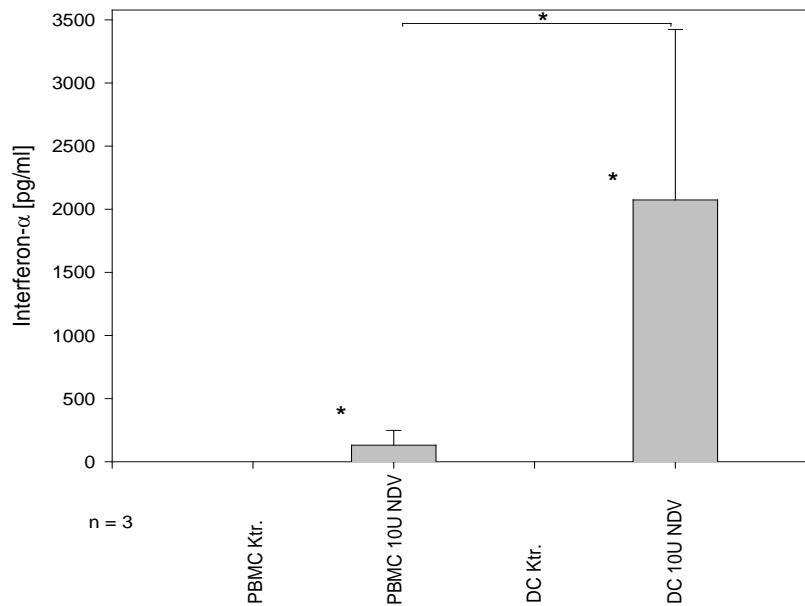


**Abb. 11: Dendritische Zellen nach Aufreinigung im MACS.** Nach Aufreinigung über die magnetischen Säulen liegt ein Gemisch von mDC-1, pDC und mDC-2 vor. Diese können durchflusszytometrisch über ein positives Signal für HLA-DR sowie Negativität gegenüber den Markern der bekannten Zelllinien der PBMC identifiziert werden. In diesem Beispiel liegt eine Reinheit von 93,3% vor; d.h. nur 6,7% der Zellen sind keine DC.

Siegal et al. publizierte in Science, dass die IFN-Produzenten des peripheren Blutes den pDC entsprechen (Siegal et al., 1999). Dieses konnte im wesentlichen über eine durchflusszytometrische Charakterisierung und Aufreinigung an einem *Cellsorter* erreicht werden.

In dem hier beschriebenen Versuchsaufbau wurden die gesamt DC aufgereinigt. Für Experimente zum Nachweis einer IFN- $\alpha$ -Antwort nach viraler Stimulation wurden stets die „in vitro“ Kulturen auf  $2 \times 10^5$  pDC justiert, um gleiche Grundvoraussetzungen für die IFN- $\alpha$  Produktion zu schaffen.

Die Versuche, pDC mit BDCA-2 Antikörper zu markieren und über eine indirekte Markierung mit einem für die magnetische Isolation geeigneten sekundär Antikörper aufzureinigen, wurden aufgrund der geringen Reinheit der gewonnenen Zellen (ca. 60%) aufgegeben. Es sei darauf hingewiesen, dass das „BDCA-2 Isolation-Kit“ noch nicht zur Verfügung stand.



**Abb. 12: pDC als Interferon- $\alpha$  produzierende Zellen** generieren unter Virusstimulation mit 10 U NDV eine 16-fach höhere Konzentration an Interferon- $\alpha$  als PBMC, die aber auch pDC in sehr viel geringerer Konzentration enthalten. Die Kontrollen ohne Virusstimulation bleiben unter der Nachweisgrenze für IFN- $\alpha$  (n=3; \*= Wilcoxon p = 0,05).

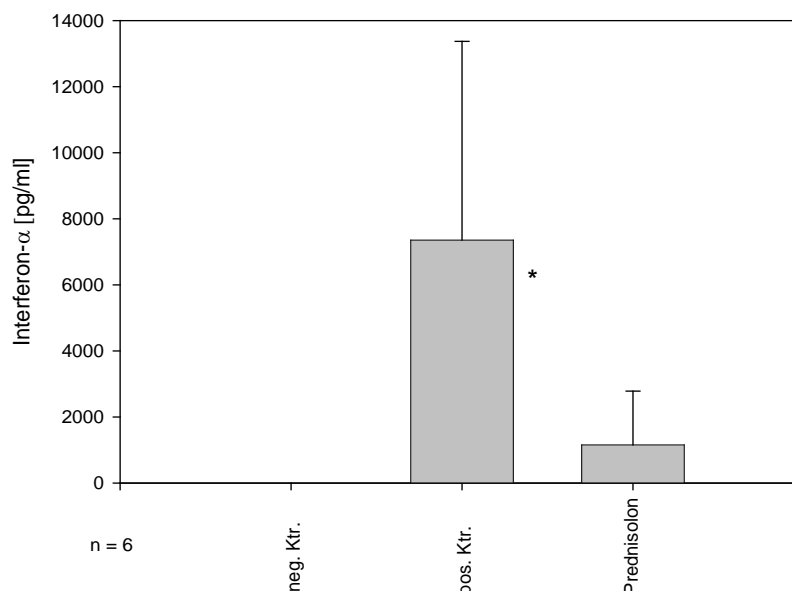
Um eine IFN-Antwort zu provozieren, wurden die DC mit unterschiedlichen Konzentrationen von NDV in Kontakt gebracht und zeigen ausgeprägte IFN-Antworten bei 5 U mit  $2656 \pm 1682$  pg/ml und bei 10 U mit  $2073$  pg/ml  $\pm 1350$  pg/ml. Bei 100 U NDV kommt es zu keiner Steigerung der Antwort, sondern tendenziell zu einer Abschwächung mit  $1713$  pg/ml  $\pm 1097$  pg/ml. In den folgenden Versuchen wurde mit 10 U NDV stimuliert. Stellt man PBMC den gesamt DC bei Stimulation mit 10 U NDV in o.g. Versuchsanordnung gegenüber, zeigt sich eine 16-fache Steigerung der Interferon- $\alpha$  Antwort mit  $130 \pm 117$  pg/ml bei den PBMC versus  $2073$  pg/ml  $\pm 1350$  pg/ml bei pDC (s.

Abb.10). Die Konzentration von IFN- $\alpha$  ohne Virusstimulation blieb jeweils unter der Nachweisgrenze.

### 3.3. Einfluss von Immunsuppressiva auf die IFN- $\alpha$ Produktion durch pDC

IFN- $\alpha$  ist eine potente Substanz zur Abwehr viraler Infektionen. Bis vor kurzem war unklar welche Zellen die Hauptproduzenten von IFN- $\alpha$  sind. Die meisten Körperzellen sind in der Lage geringe Mengen an IFN- $\alpha$  zu bilden. Es konnte gezeigt werden, dass pDC hohe Mengen an Interferon produzieren können. Damit stehen diese Zellen im Zentrum einer viralen Abwehrreaktion.

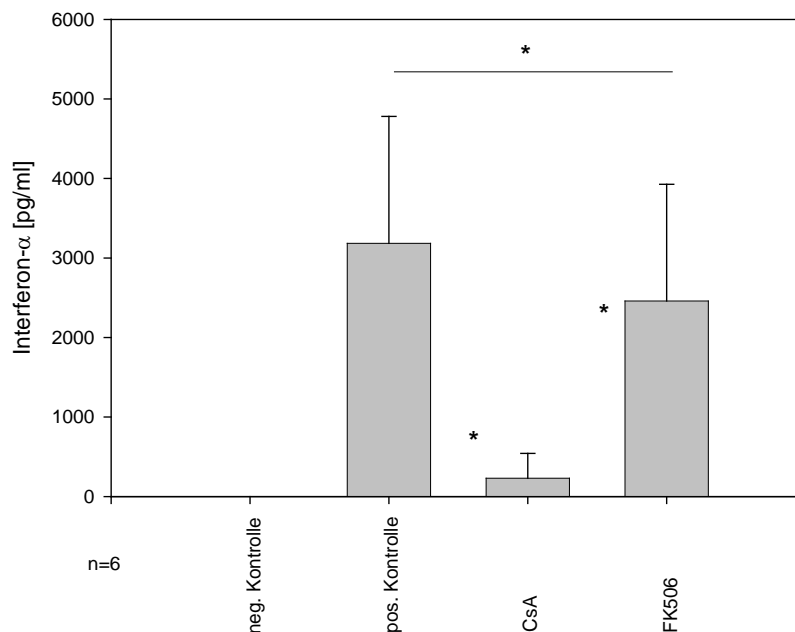
Die in der modernen Medizin verwendeten Immunsuppressiva, wie z.B. Corticoide oder CsA können durch ihr Wirkungsprofil nicht nur, wie gewünscht, eine Immunantwort bei Autoimmunerkrankungen oder in der Transplantationsmedizin unterdrücken, sondern auch Infektionen und Malignome begünstigen. Es stellte sich die Frage, ob die Immunsuppressiva auch die IFN- $\alpha$  Antwort der pDC beeinflussen können und hierüber die virale Abwehrreaktion schwächen können. In der Transplantationsmedizin häufig verwendete Substanzen sind u.a. Corticoide, CsA sowie FK506.



**Abb 13: Ausschüttung von IFN- $\alpha$  nach Stimulation mit Prednisolon.** Es zeigt sich eine deutliche Minderung der IFN- $\alpha$  Antwort nach Zugabe von Prednisolon mit resultierendem Wirkspiegel von 120 ng / ml. ( n=6 ) (\*= Wilcoxon  $p < 0,05$ )

Aufgereinigte DC wurden mit Prednisolon, CsA und FK506 äquivalent zum Wirkspiegel der Medikamente „in vivo“ kostimuliert. Die „in vitro“ Konzentration von Prednisolon wurde entsprechend der Plasmakonzentration einer oralen Dosis von 5 mg Wirkstoff mit 120  $\mu\text{g/l}$  eingestellt (Fachinformation Decortin H). Die Plasmakonzentrationen von CsA (1000 $\mu\text{g/l}$ ) und FK-506 (25 $\mu\text{g/l}$ ) spiegeln klinisch gemessene Wirkkonzentrationen bei Nierentransplantierten Patienten wider (Härtel et al., 2004).

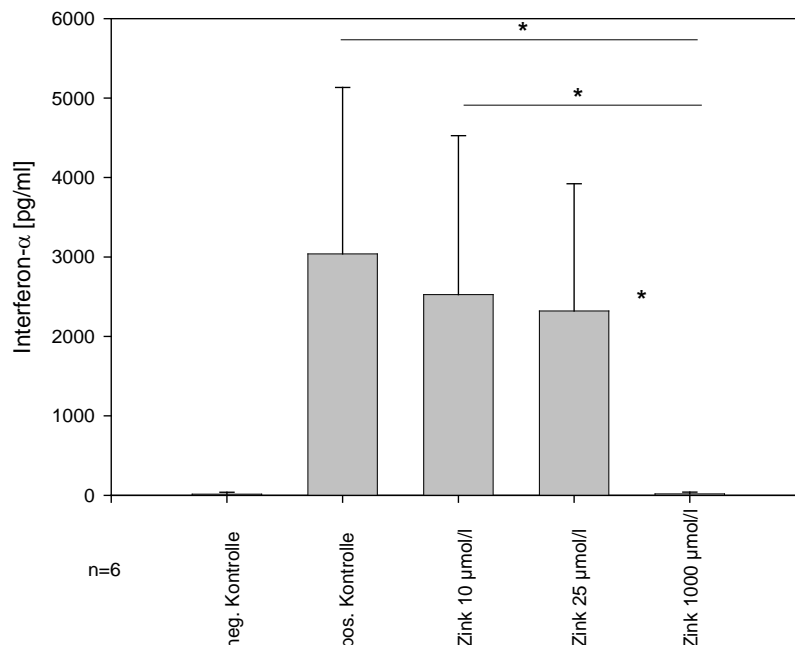
Die folgenden Versuche konnten aufgrund der zu geringen Ausbeute an pDC nicht in einer Versuchsreihe durchgeführt werden. In der Abbildung 13 ist die Wirkung von Prednisolon gezeigt. Im Gegensatz zur nicht kostimulierten Kontrolle mit einer IFN- $\alpha$  Ausschüttung von  $7354 \pm 6018$  pg/ml fiel diese unter Kostimulation mit Prednisolon signifikant auf  $1154 \pm 1626$  pg/ml ab. Im folgenden Versuch sind die nicht kostimierte Kontrolle, CsA und FK506 gegenübergestellt. Die Kontrolle erreicht eine IFN- $\alpha$  Konzentration von  $3185 \pm 1596$  pg/ml, CsA eine von  $231 \pm 311$  pg/ml und FK506 eine von  $2459 \pm 1467$  pg/ml. Alle Ansätze unterscheiden sich signifikant voneinander. Bemerkenswert ist die geringere Hemmung der IFN- $\alpha$  Produktion unter FK506 im Gegensatz zu CsA.



**Abb.14: Ausschüttung von IFN- $\alpha$  aus DC nach Stimulation mit CsA und Tacrolimus.** CsA führt beinahe zum Sistieren der Zytokinausschüttung, hingegen kommt es nach Stimulation mit Tacrolimus zu einem moderaten Abfall der Interferon-Ausschüttung. (n=6) (\*= Wilcoxon  $p < 0,05$ )

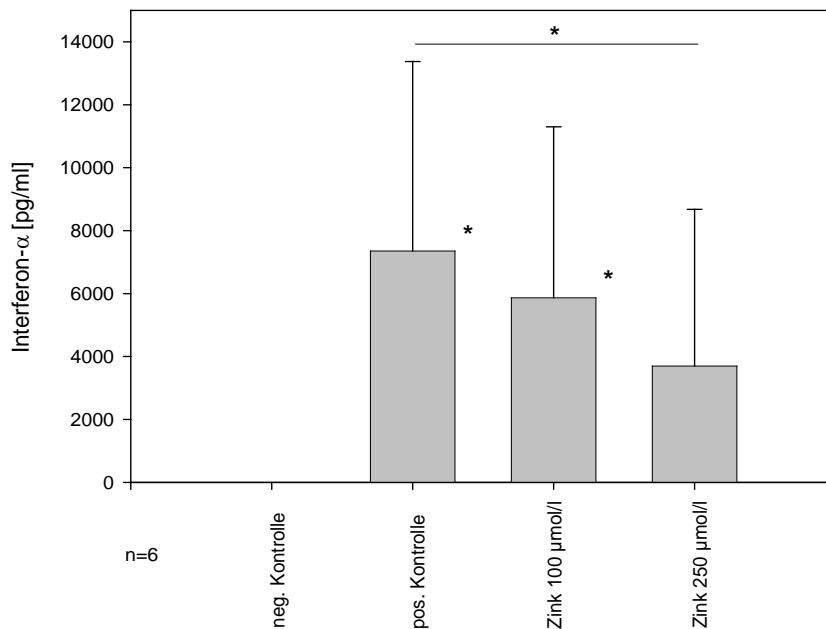
### 3.4. Einfluss von Zink auf die IFN- $\alpha$ Produktion durch pDC

Die Wechselwirkungen zwischen Zink und dem Immunsystem sind sehr vielfältig. Es gibt viele Hinweise, dass Zink ein wesentliches Spurenelement für die Immunfunktion darstellt. Zinkpräparate zur Nahrungsergänzung sind im Gebrauch, um Erkältungskrankheiten günstig zu beeinflussen. Bei älteren Menschen kann ein absinkender Zinkspiegel beobachtet werden, der mit einer allgemein gesteigerten Infektneigung im Alter zusammenhängen könnte (Cakman et al., 1997). Im Gegensatz hierzu häufen sich Hinweise, dass sehr hohe Zinkkonzentrationen eine immunsupprimierende Wirkung entfalten. Dies könnte durch eine Modulation der IFN- $\alpha$  Ausschüttung verursacht sein. Es wurden unterschiedliche Zinkkonzentrationen eingesetzt, zum einen physiologische Konzentrationen mit 10  $\mu\text{mol/l}$  und 25  $\mu\text{mol/l}$  (Referenzbereich im Plasma für Erwachsene 7-23  $\mu\text{mol/l}$ ) sowie stark erhöhte Zinkkonzentrationen mit 100  $\mu\text{mol/l}$ , 250  $\mu\text{mol/l}$  und 1000  $\mu\text{mol/l}$ .



**Abb. 15: Ausschüttung von IFN- $\alpha$  nach Stimulation mit Zink.** In physiologischen Konzentrationen von Zink kann eine leichte jedoch nicht signifikante Abnahme der IFN- $\alpha$  Produktion gesehen werden. In der Konzentration von 1000  $\mu\text{mol/l}$  kommt die IFN- $\alpha$  Ausschüttung zum Erliegen. (n=6) (\*= Wilcoxon  $p < 0,05$ )

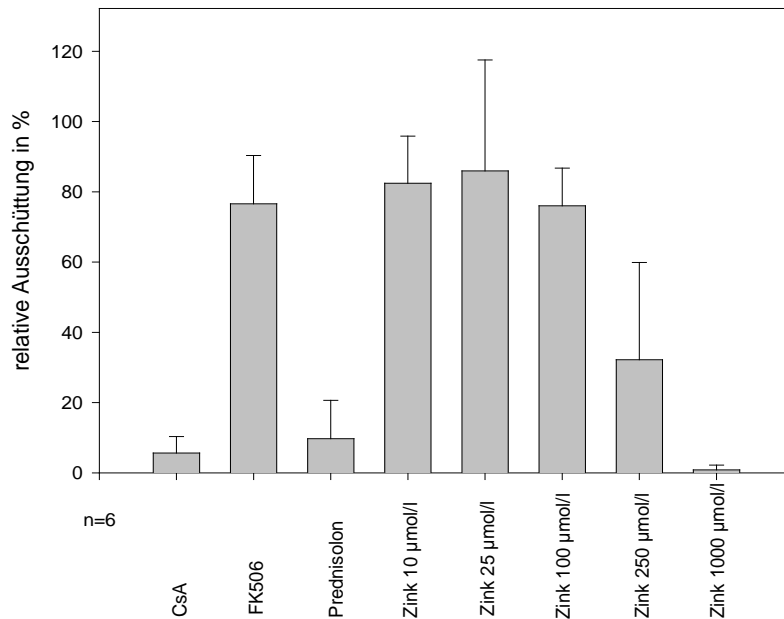
In dem nur mit Virus stimulierten Kulturansatz konnte eine IFN- $\alpha$  Konzentration von  $2851 \pm 1756$  pg/ml bestimmt werden. In der niedrigphysiologischen Zinkkonzentration eine IFN-Ausschüttung von  $2066 \pm 1124$  pg/ml und in der hochphysiologischen Zinkkonzentration eine von  $1903 \pm 1057$  pg/ml. Die verminderte Produktion ist jedoch nicht signifikant zur Virus stimulierten Kontrolle. Der stärkste Abfall in der IFN- $\alpha$  Produktion zeigt sich bei der Zinkkonzentration von  $1000 \mu\text{mol/l}$  mit  $11 \pm 22$  pg/ml und ist somit signifikant unterschiedlich zur Virus stimulierten Kontrolle sowie zu den physiologischen Zinkkonzentrationen. Eine direkte toxische Wirkung des Zinks an den pDC ist denkbar.



**Abb. 16: Ausschüttung von IFN- $\alpha$  nach Stimulation mit 100  $\mu\text{mol/l}$  und 250  $\mu\text{mol/l}$  Zink.** Im Kontext mit der vorangegangenen Abbildung zeigen erhöhte Zink Konzentrationen einen weitere Verminderung der IFN- $\alpha$  Antwort. (n=6) (\*=Wilcoxon<0,05)

Die vorangegangene Abbildung zeigt die IFN- $\alpha$  Ausschüttung bei Zinkkonzentrationen von  $100 \mu\text{mol/l}$  und  $250 \mu\text{mol/l}$  mit  $5867 \pm 5432$  pg/ml für ersteres und  $3694 \pm 4980$  pg/ml für letzteres. Sie weisen einen signifikanten Unterschied untereinander sowie beide zur nicht kostimulierten Kontrolle auf. Diese erreicht im Mittel eine IFN- $\alpha$  Konzentration von  $7354 \pm 6018$  pg/ml. Die hier untersuchten Konzentrationen an Zink haben eine deutliche Reduktion der IFN- $\alpha$  Ausschüttung erreicht und könnten an dieser Stelle mit den gebräuchlichen Immunsuppressiva in den Vergleich treten.

Zur besseren Anschaulichkeit wurden die einzelnen Versuchsreihen in einer Abbildung dargestellt. Es wurden hierfür die IFN- $\alpha$  Ausschüttungen der Wirkstoffe in Relation zu der nur viral stimulierten Kontrolle der jeweiligen Versuchsreihe gesetzt.



**Abb. 17: Vergleich relativer IFN- $\alpha$  Ausschüttung in Abhängigkeit zur ausschließlich viral stimulierten Kontrolle der jeweiligen Versuchsreihe.** CsA, Prednisolon und 1000  $\mu\text{mol/l}$  Zink zeigen eine deutliche Reduktion der IFN- $\alpha$  Antwort. FK506 zeigt hingegen eine weitaus geringere Reduktion. Die physiologischen Zink Konzentrationen führen zu einer nicht signifikanten Absenkung der Antwort. Die höheren Dosierungen zeigen einen signifikanten Abfall der IFN- $\alpha$  Produktion.

### 3.5. Quantifizierung von pDC sowie der IFN- $\alpha$ Produktion bei Atopikern

Eine atopische Diathese ist charakterisiert durch die drei Krankheitsbilder der allergischen Rhinokonjunktivitis, dem allergischen Asthma und der atopischen Dermatitis. Sie sind üblicherweise mit einem erhöhten IgE-Spiegel im Serum verbunden.

mDC-1 sollen naive T-Zellen in Richtung einer T<sub>H</sub>-1 Antwort prägen, pDC sollen eine T<sub>H</sub>-2 Antwort provozieren. Allergene kommen normalerweise nicht mit B- oder T-Zellen in Kontakt, sondern werden über die Haut oder Schleimhäute aufgenommen und treffen dort auf die APC. Diese nehmen dann wahrscheinlich eine Schlüsselrolle in der Entstehung einer allergischen Reaktion ein. Es konnte gezeigt werden, dass sich in der Nasenschleimhaut von Patienten mit allergischer Rhinitis insbesondere pDC anreichern.



Auch im peripheren Blut sollen die pDC bei Atopikern in ihrer Anzahl erhöht sein (Uchida et al., 2001).

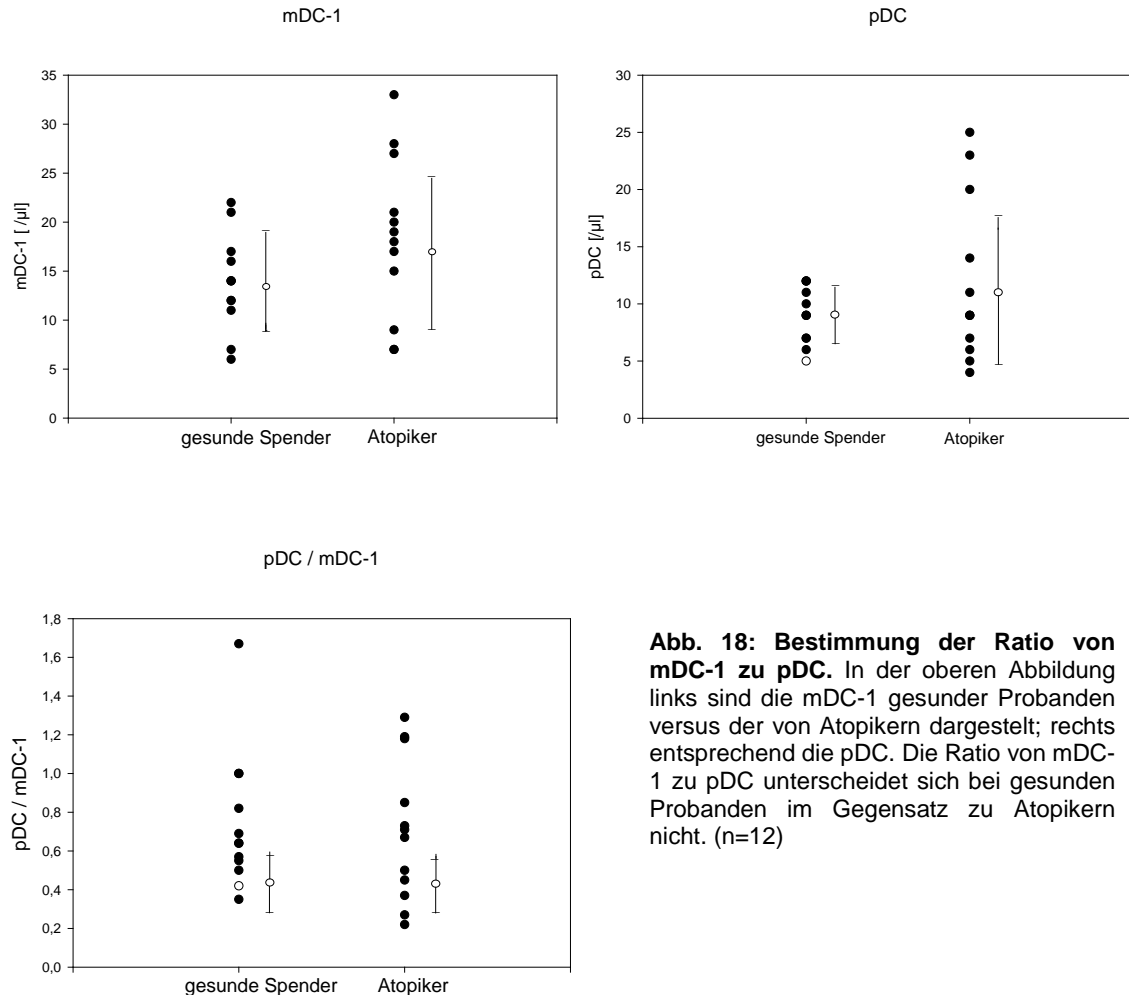
Mit freundlicher Unterstützung der Klinik für Dermatologie und Venerologie konnten 12 Routine-Blutproben von Patienten mit ausgeprägter atopischer Dermatitis sowie deutlich erhöhtem IgE-Spiegel untersucht werden. Wir führten eine Phänotypisierung der dendritischen Subtypen am Durchflusszytometer durch. Dendritische Zellen wurden anhand fehlender Epitope für die bekannten Zellreihen der PBMC und Positivität für HLA-DR identifiziert und je nach Oberflächenmarkierung CD11c, CD123 und BDCA-3 ihrer Subpopulation zugeordnet.

	Serum-IgE	Leukozyten	DC	DC	mDC-1	pDC	mDC-2
		[/µl]	[/µl]	%	[/µl]	[/µl]	[/µl]
1	4002	7430	40	0,54	20	9	1
2	17664	9240	36	0,39	15	11	1
3	165	9900	49	0,49	28	14	2
4	1311	9850	59	0,60	21	25	1
5	1049	4250	14	0,33	7	5	0
6	586	9640	75	0,78	17	20	1
7	301	7960	30	0,38	18	4	1
8	56400	12750	57	0,45	27	23	3
9	1862	10770	25	0,23	7	9	0
10	5806	9320	16	0,17	9	6	1
11	743	7740	31	0,40	19	7	1
12	5000	18750	47	0,25	33	9	2
<b>MW</b>	<b>7908</b>	<b>9800</b>	<b>40</b>	<b>0,42</b>	<b>18</b>	<b>12</b>	<b>1</b>
<b>±SD</b>	<b>16025</b>	<b>3495</b>	<b>18</b>	<b>0,17</b>	<b>8,3</b>	<b>7,1</b>	<b>0,8</b>

**Tab. 4: Dendritische Subpopulationen bei Patienten mit atopischer Dermatitis.** Im Vergleich zu gesunden Blutspendern siehe auch Tab.3.

Bei den Patienten mit atopischer Dermatitis zeigten sich erwartungsgemäß deutlich erhöhte Werte für das IgE im Serum mit  $7908 \pm 16025$  U/l sowie der Gesamtzahl der Leukozyten mit  $9800 \pm 3495$  /µl im Gegensatz zum Kollektiv der gesunden Blutspender mit einem IgE  $<100$  U/l und Leukozyten von  $5050 \pm 920$  /µl. In Bezug auf die dendritischen Zellen kommt es zu einer Steigerung von  $27 \pm 10$  /µl auf  $40 \pm 18$  /µl in der Gesamtzahl der

Zellen. Relativ kommt es jedoch zum Absinken der gesamten DC. Gleichsinnig verhalten sich die Subpopulationen der dendritischen Zellen.

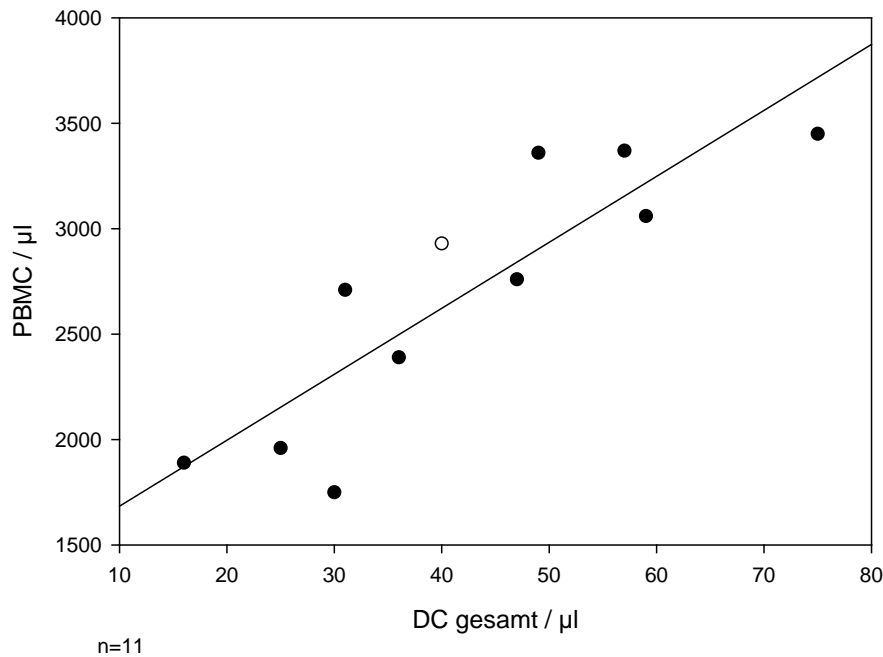


**Abb. 18: Bestimmung der Ratio von mDC-1 zu pDC.** In der oberen Abbildung links sind die mDC-1 gesunder Probanden versus der von Atopikern dargestellt; rechts entsprechend die pDC. Die Ratio von mDC-1 zu pDC unterscheidet sich bei gesunden Probanden im Gegensatz zu Atopikern nicht. (n=12)

Eine Erhöhung der pDC kann bei Atopikern gesehen werden. Die Ratio von pDC/mDC-1 beträgt bei den gesunden Spendern 0,74 und bei den Atopikern 0,70. Somit kommt es in unserer Analyse zu keiner signifikanten Änderung der Ratio von pDC zu mDC-1. Dieses steht im Gegensatz zu Beobachtungen, dass die pDC bei Atopikern vermehrt im peripheren Blut zu finden sind (Uchida et al., 2001; Reider et al., 2002).

Es wurde der Anstieg der DC in Korrelation mit den Zellreihen im Differentialblutbild untersucht. Hier zeigt sich ein Zusammenhang zwischen den lympho-monozytären Zellen und den DC mit einem Korrelationskoeffizienten nach Pearson von 0,867 (siehe Abbildung 17). Legt man die Gesamtzahl der Leukozyten zu Grunde, findet man keine ausgeprägte Korrelation. Da die DC aus der monozytären bzw. aus der lymphatischen

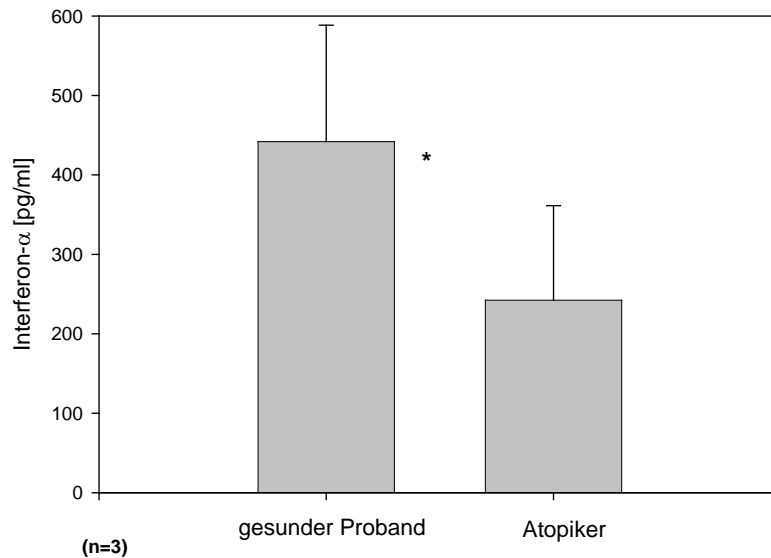
Zellreihe hervorgehen, wundert es nicht, dass sich diese gleichsinnig zu den Monozyten und Lymphozyten verhalten. Es kann angenommen werden, dass die allergische Erkrankung einen allgemeinen Proliferationsreiz auf das Knochenmark ausübt. Dieser ist nach den hier vorliegenden Untersuchungen jedoch nicht spezifisch für pDC.



**Abb. 19: Abhängigkeit zwischen der Anzahl der gesamten DC zur Anzahl der PBMC.** Es kann eine sichere Korrelation zwischen der Anzahl der PBMC und der Anzahl der gesamten DC nachgewiesen werden. (Korrelationskoeffizient nach Pearson 0,867,  $r^2=0,752$ ) Die Untersuchung zeigt ein Signifikanzniveau von  $p = 0,01$ .

Kommt es bei den Patienten mit atopischer Dermatitis nicht durch die vermehrte Anzahl der IFN- $\alpha$  produzierenden DC zu einer Veränderung der  $T_H$ -1- bzw.  $T_H$ -2-Antwort, könnten sich diese möglicherweise funktionell von denen gesunder Personen unterscheiden. Die sich anschließende Frage ist, ob sich die IFN- $\alpha$  Ausschüttung in den beiden Kollektiven unterscheidet. Weil den Patienten mit der schweren atopischen Dermatitis keine Vollblutspende zugemutet werden konnte, wurden Blutspender mit Vorliegen einer allergischen Erkrankung ermittelt. Die Spender brauchten keine allergische Krankheitsaktivität aufweisen. Es sollte untersucht werden, ob es konstitutionelle Unterschiede in der IFN- $\alpha$  Produktion bei Allergikern gibt. Eine enge Beziehung zwischen pDC und der Entstehung von Allergien wird angenommen. pDC sind die IFN-Produzenten im Blut. IFN- $\alpha$  kann u.a. mitverantwortlich für eine  $T_H$ -1 Antwort sein.

Eine zu geringe Ausschüttung an IFN- $\alpha$  könnte somit wiederum eine T<sub>H</sub>-2 Antwort bedingen.



**Abb.20: Virusstimulation von pDC-2 bei gesunden Probanden versus Blutspendern mit bekannter Allergie.** Es zeigt sich eine signifikante Verminderung in der IFN- $\alpha$  Produktion bei Spendern mit bekannter Allergie. (n=3) (\*= Wilcoxon p=0,05)

Die kleine Stichprobe zeigt einen signifikanten Unterschied zwischen gesunden Probanden mit einer IFN- $\alpha$  Produktion von  $441 \pm 146$  pg/ml und bei Atopikern von  $242 \pm 119$  pg/ml. Bei sehr kleiner Anzahl von Probanden und einer großen interindividuellen Schwankungsbreite der IFN- $\alpha$  Produktion, muss die Frage künftig in größerer Fallzahl bearbeitet werden.

## 4. Diskussion

Plasmazytoide dendritische Zellen wurden erst kürzlich als die wichtigsten IFN Produzenten im peripheren Blut identifiziert. Eine der wesentlichen Veröffentlichungen hierzu publizierte Siegal et al. 1999 in Science. Hierbei wurden pDC über mehrere Schritte in hoher Reinheit (u.a. unter Verwendung eines *Cellsorters*) isoliert. Nach viraler Stimulation mit HSV konnten 200-1000fach höhere IFN- $\alpha$  Spiegel gefunden werden als bei gleichartig stimulierten anderen Blutzellen. Schon lange war die Existenz einer solchen Zellpopulation vermutet worden; diese Zellen werden als natürlich Interferon produzierende Zellen genannt. pDC stehen im Zentrum des angeborenen Abwehrsystems und sind an Immunreaktionen gegen Virusinfektionen beteiligt. Sie haben jedoch auch das Potential adaptive Immunreaktionen entscheidend zu beeinflussen.

### **4.1. Beeinflussung der IFN- $\alpha$ Ausschüttung durch Immunsuppressiva**

Immunsuppressiva werden zunehmend bei autoimmunologischen Krankheiten oder im Rahmen der Transplantationsmedizin eingesetzt. In diesem Zusammenhang ist bislang wenig über die direkte Interaktion zwischen den Immunsuppressiva und den pDC bekannt. Ebenso fehlen funktionelle Untersuchungen zur IFN- $\alpha$  Ausschüttung unter immunsuppressiver Therapie.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass Immunsuppressiva wie Cortison und die Calcineurininhibitoren CsA und FK506, die besonders häufig nach Organtransplantation eingesetzt werden, eine Reduktion der IFN- $\alpha$  Antwort hervorrufen. Bei mDC-1 kannte man bereits die immunsupprimierenden Eigenschaften von Corticoiden, welche u.a. die Ausreifung der mDC-1 sowie die Interaktion mit T-Zellen beeinflussen können (Matyszak et al., 2000). Für die Substanzklasse der Calcineurininhibitoren ist die IFN- $\alpha$  Suppression direkt an pDC bislang wenig untersucht worden. Wir konnten erstmals zeigen, dass sich unter FK506 eine viel geringere Suppression der IFN- $\alpha$  Antwort als unter CsA findet. Hierbei wurden die jeweiligen therapeutischen Wirkspiegel der Medikamente, wie sie bei Patienten bestimmt wurden, berücksichtigt. Klinische Studien belegen die Gleichwertigkeit der beiden Immunsuppressiva in der Prävention vor Abstoßungsreaktionen (Jonas et al., 2005;

Bunnapradist et al., 2003). Eine lang anhaltende Immunsuppression mit Calcineurininhibitoren führt nachfolgend zur erhöhten Inzidenz von viralen Infekten und de-novo-Malignomen. Ein Faktor hierfür könnte eine tatsächlich verminderte IFN- $\alpha$  Ausschüttung nach Gabe von CsA und FK506 sein. Weil wie oben angeführt FK506 wesentlich schwächer die IFN- $\alpha$  Antwort supprimiert als CsA, müssten die nachteiligen Folgen einer Immunsuppression unter FK506 geringer ausfallen. Diese Arbeitshypothese wird durch die Ergebnisse zahlreicher klinischer Studien bestätigt. So zeigten Neuhaus et al., dass es unter CsA (25%) zu einer deutlich höheren Inzidenz für CMV Infektionen als unter FK506 (6,6%) ( $p < 0,05$ ) kam, währenddessen blieb die Inzidenz für bakterielle Infekte (Pneumonie, Cholangitis und Harnwegsinfekte) für beide Behandlungsgruppen gleich (Neuhaus et al., 1995). Die Beobachtung, dass es unter Immunsuppression mit CsA im Vergleich zu FK506 häufiger zu viralen Infektionen kommt, konnten mehrere Untersuchungen bestätigen (Campino et al., 2005, Mentzer et al., 1998). Ebenso finden sich Hinweise, dass es unter CsA zu einer erhöhten Inzidenz von de-novo-Malignomen im Vergleich zu FK506 kommt (Jonas et al., 2005).

Die zellulären Wirkmechanismen von Calcineurininhibitoren sind bislang am besten in T-Zellen mit Suppression der IL-2 Antwort verstanden. Es konnten jedoch auch bei vielen weiteren Zellen des Immunsystems Wirkungen der Calcineurininhibitoren nachgewiesen werden. An mDC-1, die aus Monozyten unter Kultur mit Interleukin-4 (IL-4) und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-Stimulierender-Faktor (GM-CSF) differenziert wurden, fand nach Inkubation mit CsA und FK506 keine morphologische Änderung statt. Ebenso wenig führte es zu einer Ausreifung bzw. verminderten Ausreifung der Zellen mit Änderung der Oberflächenmoleküle CD80, CD86 oder HLA-DR im Durchflusszytometer. Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass die Ausreifung von mDC primär über NF- $\kappa$ B kontrolliert wird, welcher eine Vielzahl von immunomodulatorischen Genen reguliert. Die Inhibition der NF- $\kappa$ B Aktivität hemmt nicht nur die Expression von kostimulatorischen Molekülen und sich ausbildendem MHC, sondern ist ebenso in die Hyporeaktivität von T-Zellen involviert (Säemann et al., 2004). Des Weiteren konnte eine Verminderung der IL-12 und TNF- $\alpha$  Produktion der mDC-1 unter Einfluss von Calcineurininhibitoren nachgewiesen werden. Die IL-10 Ausschüttung wurde hingegen nicht beeinflusst. Eine verminderte allostimulatorischen Kapazität der mDC-1, die unter Immunsuppression gesehen wird, kann somit erklärt werden (Szabo et al., 2001). Darüber hinaus konnte an beiden Subpopulationen, mDC-1 und pDC, eine Wirkung von CsA auf das kostimulatorische Molekül CD40L gesehen werden, welches in der Expression inhibiert

wurde. CD40L ist ein Protein, welches primär auf aktivierten T-Zellen exprimiert wird und ist ein Mitglied der TNF Familie. Es bindet an CD40 auf APC und vermag diese hierüber zu aktivieren. Weiterhin wurde die endozytotische Potenz der pDC gemindert. Es konnte erstmals eine Verminderung der IFN- $\alpha$  Ausschüttung direkt an pDC nachgewiesen werden (Tajima et al., 2003). Die Mechanismen, die in pDC zu einer verminderten IFN- $\alpha$  Freisetzung führen, lassen sich möglicherweise durch eine Verminderung der NF- $\kappa$ B Aktivität erklären. pDC exprimieren IRF-7. Die Genexpression für dieses an der Transkription beteiligten Moleküls werden möglicherweise durch NF- $\kappa$ B kontrolliert (Osawa et al., 2006), welches wiederum von den Calcineurininhibitoren in seiner Aktivität gehemmt wird und somit zu einer verminderten IFN Ausschüttung führen könnte.

#### **4.2. Beeinflussung der IFN- $\alpha$ Ausschüttung durch Zink**

Eine weitere interessante Substanz im Hinblick auf die Modulation der IFN- $\alpha$  Ausschüttung ist Zink. Es soll immunstimulatorische Effekte in niedrigen Dosierungen sowie eine immunsupprimierende Effekte in hohen Dosierungen hervorrufen. Zink ist als Präparat zur Nahrungsergänzung bei Erkältungskrankheiten bekannt und soll einen günstigen Einfluss auf den Verlauf viraler Infektionen haben. Wie bereits in einer früheren Doktorarbeit aus dem Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin gezeigt, kann Zink in physiologischen Konzentrationen die IFN- $\alpha$  Antwort erhöhen (Cakman et al., 1997). Der häufigste Grund für Erkältungskrankheiten sind Rhinoviren, seltener etwa 200 weitere bekannte Viren. In einer klein angelegten, randomisierten Doppelblind-Studie von Prasad et al. (2000) mit insgesamt 48 Probanden konnte gezeigt werden, dass die Supplementation mit 12,8 mg Zinkacetat 24 Stunden nach Beginn der ersten Symptome einer Erkältungskrankheit die Gesamtdauer der Symptomatik von 8,5 Tage auf 4,5 Tage verkürzen konnte. Husten konnte von 6,3 Tagen auf durchschnittlich 3,1 Tage, Schnupfen um 1,7 Tage reduziert werden. Darüber hinaus konnten verminderte proinflammatorische Zytokinspiegel im Blutplasma gemessen werden. Unter Supplementation von Zink konnte der Zinkspiegel während der Erkrankung um durchschnittlich 2,9  $\mu$ mol/l gesteigert werden. In der Placebo-Gruppe fiel er um 0,8  $\mu$ mol/l ab, so dass es zu einem signifikanten Unterschied im Plasmaspiegel für Zink kam (Prasad et al., 2000).

Mehrere Studien konnten positive Effekte einer Zink Supplementation bestätigen. Unseren Untersuchungen zur Folge mildern Zinkspiegel im physiologischen Bereich die

IFN- $\alpha$  Ausschüttung tendenziell ab. Dieses steht nicht im Einklang zu den Ergebnissen von Cakman et al.. In dieser Untersuchung konnte eine Zinksupplementation die IFN- $\alpha$  Antwort in älteren Menschen rekonstituieren. Der Unterschied lässt sich am ehesten durch die unterschiedlichen Zielzellen erklären. In der hier vorliegenden Untersuchung wurden die Versuche an aufgereinigten DC vorgenommen. In der Arbeit von Cakman et al. wurden, zwei Jahre bevor man die pDC als IFN- $\alpha$  Produzenten entdeckte, die PBMC ohne nachfolgende Selektion stimuliert (Cakman et al., 1997). Somit könnten sich in der PBMC-Fraktion weitere IFN Produzenten befinden oder sich Interaktionen zu anderen Immunzellen ausbilden, welche die IFN- $\alpha$  Produktion sekundär erhöhen. Berg et al. wiesen bei Einsatz von geringen Zinkkonzentrationen eine Potenzierung der antiviralen Wirkung von IFN- $\alpha$  an virusinfizierten Kulturzellen um das Zehnfache nach. Zink allein, ohne die Kostimulation mit IFN- $\alpha$ , konnte keine günstigen Effekte hervorrufen (Berg et al., 2001). Dies unterstützt die Überlegung, dass Zink nicht die IFN- $\alpha$  Produktion in pDC steigern muss, um eine gesteigerte antivirale Wirkung zu erreichen, sondern vielmehr an der virusinfizierten Zelle unter Einfluss von IFN- $\alpha$  wirkt.

An T-Zellen konnte belegt werden, dass unter einer moderaten Zinksupplementation weniger unspezifisch voraktivierte T-Zellen nachzuweisen sind und es zu einer Reduktion von spontaner Zytokinfreisetzung kam. Jedoch konnte ein gesteigertes Ansprechen von T-Zellen nach Stimulation mit Mitogen gesehen werden (Kahmann et al., 2008).

Im Alter fällt gleichsinnig zum Absinken der IFN- $\alpha$  Produktion auch der Zinkspiegel, so dass ein Zusammenhang vermutet werden konnte. Für ein Nachlassen der IFN- $\alpha$  Produktion könnte der signifikante Abfall der pDC Zellzahl mit verantwortlich sein. Von Shodell et al. konnte in durchflusszytometrischen Untersuchungen eine etwa 50%ige Reduktion von ca. 8 pDC / $\mu$ l (18-39 Jahre) in der jüngsten Gruppe auf etwa 4 pDC / $\mu$ l in der Gruppe der ältesten (60-91 Jahre) gemessen werden. Somit würde bei Abfall der IPC auch eine geringere IFN- $\alpha$ -Antwort zu erwarten sein. Andererseits konnte aber auch ein leichter Abfall der IFN-Produktion im Alter bezogen auf die einzelne pDC nachgewiesen werden (Shodell et al., 2000). Diese Beobachtung muss keinen kausalen Zusammenhang zum Zinkspiegel haben. Eine Zinksubstitution im Alter kann wegen der immunstimulatorischen Eigenschaften und der Wirkungsverstärkung von IFN- $\alpha$  an der infizierten Zelle sinnvoll sein.

Die in unseren Untersuchungen bereits tendenziell abgeschwächten IFN- $\alpha$  Spiegel bei physiologischen Zinkkonzentrationen werden durch höhere Konzentrationen (100  $\mu$ mol/l)



nochmals signifikant reduziert. Die entsprechende orale Dosis an Zink, um so hohe Plasmakonzentrationen zu erreichen, wird ohne wesentliche Nebenwirkungen toleriert. Erhöht man die Dosis nochmals, kann eine Verminderung der IFN- $\alpha$  Ausschüttung ähnlich derer bei Einsatz von herkömmlichen Immunsuppressiva gemessen werden. Wurde in unseren Versuchen mit 1000  $\mu\text{mol/l}$  Zink kostimuliert, konnte IFN- $\alpha$  nur noch an der Nachweisgrenze bestimmt werden. Veröffentlichungen die sich mit einer hochdosierten Zinkeinnahme befassen sind selten. Chandra et al. untersuchten elf gesunde männliche Probanden, die täglich 300mg elementares Zink über sechs Wochen einnahmen. Dieses führte u.a. zu einer Reduktion der lymphozytären Antwort nach Phytohämagglutinin Stimulation sowie zu einer verminderten Fähigkeit zur Chemotaxis und Phagozytose bei Granulozyten (Chandra et al., 1985). Somit ist eine in vitro Immunsuppression durch Zink in hoher Dosis plausibel. Ob in vivo eine hochdosierte Zinkgabe im Sinne einer therapeutischen Immunsuppression durchgeführt werden kann, ist fraglich. Auch wenn kurzfristig keine bedrohlichen Nebenwirkungen auftreten, können bei der Langzeiteinnahme von erhöhten Zinkdosierungen unerwünschte Wirkungen auftreten, wie z.B. eine urologische Symptomatik mit einer erhöhten Inzidenz von Nephrolithiasis, eine nachlassende Aufnahme anderer Spurenelemente oder durch Interferenzen mit der Kalzium-Homöostase bedingter Knochenabbau (Johnson et al., 2007; Yamaguchi M et al., 1982).

Wie eine hohe Dosis Zink die IFN- $\alpha$  Produktion hemmt, ist bislang unklar. Eine Möglichkeit könnte sein, dass ähnlich der Genese der verminderten IFN- $\alpha$  Produktion bei Calcineurininhibitoren, dieser Vorgang auch über NF $\kappa$ B vermittelt wird. Hierzu gibt es mehrere Hinweise aus verschiedenen Publikationen. Shimada et al. untersuchten den Einfluss von Zink auf epitheliale Zellen im Magen. Hier hat die Zinkgabe einen günstigen Einfluss auf die Abheilung von Magengeschwüren. Zink regulierte die NF $\kappa$ B Aktivität herunter. Diese war für die proinflammatorische Zytokin-Ausschüttung bedeutend (Shimada et al., 1999). In Zellkulturen konnte Zink über den TRAF-Signaltransduktionsweg die NF $\kappa$ B Aktivität vermindern (Prasad, 2008). Die Transkription von IFN- $\alpha$  ist in den Untersuchungen der Signaltransduktion von Osawa et al. NF $\kappa$ B abhängig (Osawa et al., 2006). Ob ein Zusammenhang zu dieser Beobachtung besteht und somit Zink über eine Reduktion der NF $\kappa$ B Aktivität eine Verminderung der IFN- $\alpha$  Antwort hervorruft, muss künftig geprüft werden.

### **4.3. pDC als zellulärer Bestandteil der allergischen Reaktion**

Die Exposition gegenüber einem Fremdstoff kann eine Veränderung der Reaktivität eines Individuums gegenüber der Umwelt induzieren. Kommt es zu einer gesteigerten Sensitivität gegen den Fremdstoff (oft eine harmlose Substanz), kann bei entsprechender Immunreaktion eine Allergie vorliegen. Die allergischen Immunreaktionen werden in vier unterschiedliche Typen unterteilt. Bei der häufigsten, der Typ-I-Reaktion (Allergie vom Soforttyp) ist die Bildung einer  $T_H-2$  Antwort von entscheidender Bedeutung. Allgemein beschreibt ein  $T_H-1$  Muster vor allem eine nachfolgende Aktivierung von Monozyten und zytotoxischen Zellen; eine  $T_H-2$  Antwort bedeutet eine Interaktion zu den B-Zellen und Generierung einer AK-Produktion sowie Aktivierung von eosinophilen Granulozyten. Eine reine  $T_H-1$  oder  $T_H-2$  Antwort stellt ein Modell dar. In der Realität reagiert das Immunsystem je nach Erreger bzw. Fremdstoff mit einer Immunantwort eher in Richtung  $T_H-1$  bzw. eher in Richtung  $T_H-2$ .

Es gibt immer mehr Hinweise darauf, dass es von den dendritischen Zellen abhängt, ob eine  $T_H-1$  oder  $T_H-2$  Antwort generiert wird. Die Bildung einer  $T_H-2$  Antwort steht im engen Zusammenhang mit den pDC, die im Fokus dieser Doktorarbeit stehen. pDC rücken somit in das Interesse zur Klärung der Genese von allergischen Erkrankungen. Es muss hierbei Erwähnung finden, dass pDC aber auch in der Lage sind, z.B. bei Kontakt mit Virusantigenen, auch eine  $T_H-1$  Antwort auszulösen. Zwei Arbeitsgruppen weisen im Zusammenhang mit atopischen Erkrankungen in Untersuchungen mit kleinen Fallzahlen darauf hin, dass es zu einer Verschiebung der Ratio zwischen pDC und mDC-1 zugunsten der pDC im peripheren Blut bei atopischer Dermatitis kommt (Uchida et al., 2001, Reider et al., 2002). Dieses führe auch lokal zu einem grundsätzlichen Ungleichgewicht in der  $T_H-1/T_H-2$  Antwort zugunsten der  $T_H-2$  Antwort. Die in dieser Arbeit durchgeführte Messung der Ratio von pDC zu mDC-1 bei Patienten mit florider atopischer Dermatitis (und begleitend deutlich erhöhten IgE-Spiegeln) versus einer gesunden Kontrollgruppe zeigte keinen Unterschied. Vielmehr kann eine allgemeine Erhöhung der Leukozytenzahl und der Gesamt-DC bei Patienten mit klinisch relevanter atopischer Dermatitis nachgewiesen werden. Es konnte darüber hinaus von uns gezeigt werden, dass die mononukleären Zellen des peripheren Blutes signifikant mit den Zellzahlen der DC korrelieren. Ein Zusammenhang von der Anzahl der DC pro Mikroliter Blut konnte weder zu den erhöhten IgE-Spiegeln noch zu der Anzahl der eosinophilen Granulozyten nachgewiesen werden. In Bezug auf die Erhöhung der Zellzahl von DC im peripheren Blut konnte die Untersuchung von Ho et al. ebenso einen DC-Anstieg nach

operativen und physischen Stress nachweisen. Jedoch kam es weder zu einer Aktivierung der DC, noch zu einer Verschiebung der Ratio zwischen pDC und mDC-1. Die Zellzahlen für pDC zeigten sich in der Untersuchung als sehr variabel (Ho et al., 2001). Im Hinblick auf diese Ergebnisse könnte eine schwere Entzündungsreaktion die Proliferation und Ausschüttung der DC im Knochenmark beeinflussen, so dass diese, wie auch andere Immunzellen, vermehrt ausgeschüttet werden. Ob es wirklich zu einer Verschiebung der pDC/mDC-1 Ratio bei atopischen Erkrankungen kommt, bleibt für uns derzeit ungeklärt. Eine mögliche Fehlerquelle könnten die kleinen Fallzahlen der genannten Arbeiten, aber auch unserer Untersuchung, darstellen.

Die pDC, die die IFN Produzenten des peripheren Blutes sind, stehen im Mittelpunkt zur Bildung einer  $T_H-2$  Antwort. Im Gegensatz zu murinen T-Zellen entwickeln humane T-Zellen durch Typ I IFN eine  $T_H-1$  Antwort (Parronchi et al. 1992). Welche Mechanismen die Bildung einer  $T_H-2$  Antwort über pDC auslösen, ist derzeit unklar. Eine Möglichkeit besteht darin, dass pDC nicht IL-12 produzieren können und hierüber keine  $T_H-1$  Antwort auslösen können, was bleibt ist eine  $T_H-2$  Antwort. Ein bestimmtes Zytokin, welches direkt eine  $T_H-2$  Antwort verursacht, wird nicht vermutet. Ein alternatives Modell legt die Existenz eines Moleküls auf der Oberfläche von pDC nahe, welches mit den T-Zellen interagiert und eine  $T_H-2$  Differenzierung provoziert (Moser und Murphy, 2000).

Typ I Interferone inhibieren die T-Zell-Proliferation einer  $T_H-2$  Antwort. Dieses konnte von Farkas et al. gezeigt werden, indem in einer experimentell induzierten Allergenreaktion mit einem CpG Oligodesoxynucleotid, welches zusätzlich eine IFN- $\alpha$  Ausschüttung bewirkt, kostimuliert wurde. Hiermit konnte die  $T_H-2$  Antwort deutlich unterdrückt werden (Farkas et al., 2004). Im Umkehrschluss könnte eine verminderte Fähigkeit zur Typ I IFN Synthese ein Faktor zur Entstehung einer atopischen Neigung des Patienten sein; zum einen hinsichtlich der verminderten Induktion einer  $T_H-1$  Antwort, zum anderen kann eine  $T_H-2$  Antwort mit verminderter antiproliferativer Wirkung bei erniedrigte IFN-Spiegel ungehinderter ablaufen. Bei einer sehr kleinen Fallzahl wurde in der vorliegenden Arbeit die Interferon-Ausschüttung bei stets gleicher Versuchsanordnung untersucht. Bei Patienten mit einer bekannten Allergie in der Anamnese zeigte sich eine signifikante Verminderung in der resultierenden Interferon- $\alpha$  Konzentration. Aufgrund der sehr kleinen Fallzahl sowie der großen interindividuellen Schwankungen bedarf es noch künftiger Untersuchungen, um dieses zu verifizieren. Letztlich könnte eine verminderte Fähigkeit Typ I IFN zu bilden, möglicherweise eine Prädisposition für allergische Erkrankungen hervorrufen.

## 5. Zusammenfassung

Plasmazytoide dendritische Zellen (pDC) konnten als die natürlichen Interferon produzierenden Zellen identifiziert werden (Siegal et al, 1999). Interferone (IFN) sind eine Familie von Proteinen, die in Abhängigkeit von Immunreaktionen gebildet werden. IFN- $\alpha$  und - $\beta$  induzieren eine Virusresistenz, inhibieren die Zellproliferation und regulieren die Expression von MHC-Klasse-I-Molekülen. Heute stehen IFN- $\alpha$  produzierende pDC im Zentrum einer angeborenen sowie erworbenen Immunreaktion - insbesondere gegen virale Infektionen.

In der Transplantationsmedizin wird zur Vermeidung von Abstoßungsreaktionen eine Immunsuppression durchgeführt. Hierunter kommt es gehäuft zu Infekten, wie zum Beispiel Primärinfektionen mit CMV bzw. zu CMV Reaktivierungen. Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die in der Transplantationsmedizin eingesetzten Immunsuppressiva wie Prednisolon, Ciclosporin A (CsA) und Tacrolimus (FK506) die IFN- $\alpha$  Ausschüttung aus pDC vermindern. Die Calcineurininhibitoren werden bislang mit einer immunsuppressiven Wirkung an den T-Lymphozyten bzw. einer verminderten IL-2 Ausschüttung assoziiert. In den vergangenen Jahren konnten weitere Zellgruppen identifiziert werden, an denen es zu Effekten nach Stimulation mit diesen Immunsuppressiva kommt. Ihre Wirkung auf die pDC wurde bislang wenig untersucht. Besonders wichtig ist unsere Beobachtung, dass in Plasmakonzentrationen wie sie bei Nierentransplantierten Patienten vorkommen, CsA die IFN- $\alpha$  Antwort wesentlich deutlicher vermindert als FK506.

Des Weiteren wurden die Effekte von physiologischen sowie unphysiologisch hohen Zinkdosierungen auf die IFN- $\alpha$  Ausschüttung untersucht. Es ist wohl bekannt, dass Zink günstige Effekte auf die virale Abwehr hat, insbesondere bei Erkältungskrankheiten. Dieses geschieht möglicherweise über eine Wirkungsverstärkung des IFN- $\alpha$  an der virusinfizierten Zelle, jedoch nicht, wie in dieser Arbeit untersucht, über eine Steigerung der IFN- $\alpha$  Antwort aus pDC. Bei höheren Dosierungen von Zink konnte eine ausgeprägte Hemmung der IFN- $\alpha$  Ausschüttung gesehen werden die mit der von Immunsuppressiva vergleichbar war. In wie weit sich Zink als neues und steuerbares Immunsuppressivum erweisen könnte, ist sehr spekulativ und bleibt hier unbeantwortet.

Im Rahmen von Allergien soll eine erhöhte Ratio von pDC zu myeloischen DC Typ 1 im peripheren Blut vorliegen (Uchida et al., 2001; Reider et al., 2002). Dieses konnte an den hier vorliegenden Ergebnissen nicht bestätigt werden. Vielmehr korreliert die Erhöhung der pDC und der Gesamt-DC mit der Zahl der PBMC. Eine kleine Versuchsreihe zeigt einen quantitativen Unterschied in der Produktion von IFN- $\alpha$  bei Allergikern im Vergleich zu gesunden Blutspendern. Die Ergebnisse weisen auf eine verminderte IFN- $\alpha$  Produktion bei Allergikern hin.

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Bell D, Young JW, Banchereau J:** Dendritic cells. *Adv Immunol* 72:255-324 (1999)
2. **Bentley PJ:** Influx of zinc by channel catfish (*Ictalurus punctatus*): uptake from external environmental solutions. *Comp Biochem Physiol C* 101(2):215-217 (1992)
3. **Berg K, Bolt G, Andersen H, Owen TC:** Zinc potentiates the antiviral action of human IFN- $\alpha$  tenfold. *J Interferon Cytokine Res* 21:471-474 (2001)
4. **Blom B, Ho S, Antonenko S, Liu YJ:** Generation of interferon  $\alpha$ -producing predendritic cell (pre-DC)2 from human CD34<sup>+</sup> hematopoietic stem cells. *J Exp Med* 192:1785-1795 (2000)
5. **Bubnoff von D, Geiger E, Bieber T:** Antigen-presenting cells in allergy. *J Allergy Clin Immunol* 108(3):329-339 (2001)
6. **Bülow von V, Rink L, Haase H:** Zinc-mediated inhibition of cyclic nucleotide phosphodiesterase activity and expression suppresses TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  production in monocytes by elevation of guanosine 3', 5'-cyclic monophosphate. *J Immunol* 175:4697-4705 (2005)
7. **Bunnapradist S, Daswani A, Takemoto SK:** Graft survival following living-donor renal transplantation: a comparison of tacrolimus and cyclosporine microemulsion with mycophenolat mofetil and steroids. *Transplantation* 76(1):10-15 (2003)
8. **Buttgereit F, Straub RH, Wehling M, Burmester GR:** Glucocorticoids in the treatment of rheumatic diseases. *Arthritis Rheum* 50(11):3408-3417 (2004)
9. **Cakman I, Kirchner H, Rink L:** Zinc supplementation reconstitutes the production of interferon- $\alpha$  by leukocytes from elderly persons. *J Interferon Cytokine Res* 17:469-472 (1997)

10. **Campino A:** Gancyclovir prophylaxis in high risk patients. *Transplant Proc* 37(10):4311-4312 (2005)
11. **Chandra RK:** Excessive intake of zinc impairs immune responses. *JAMA* 252(11):1443-1446 (1984)
12. **Caux C, Vanbervliet B, Massacrier C, Dubois B, de Saint Vis B, Fayette J, Rissoan MC, Brière F, Lebecque S, Rousset F, Dezutter-Dambuyant C, Banchereau J:** In vitro regulation and function of dendritic cells, *Hematol Cell Ther* 38:463 (1996)
13. **Coccia EM, Severa M, Giacomini E, Monneron D, Remoli ME, Julkunen I, Cella M, Lande R, Uzü G:** Viral infection and toll-like receptor agonists induce a differential expression of type I and  $\lambda$  interferons in human plasmacytoid and monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Immunol* 34:796-805 (2004)
14. **Coleman JE:** Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins. *Annu Rev Biochem* 61:897-946 (1992)
15. **Djeu JY, Stocks N, Zoon K, Stanton GJ, Timonen T, Herberman RB:** Positive self regulation of cytotoxicity in human natural killer cells by production of interferon upon exposure to influenza and herpes viruses. *J Exp Med* 156:1222-1234 (1982)
16. **Dzionic A, Fuchs A, Schmidt P, Cremer S, Zysk M, Miltenyi S, Buck DW, Schmitz J:** BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *J Immunol* 165:6037-6046 (2000)
17. **Eurotransplant International Foundation:** Annual report 2006
18. **Farkas L, Beiske K, Lund-Johansen F, Brandtzaeg P, Jahnsen FL:** Plasmacytoid dendritic cells (natural Interferon- $\alpha/\beta$ -producing cells) accumulate in cutaneous lupus erythematosus lesions. *Am J Path* 159(1):237-243 (2001)

19. **Farkas L, Kvale EO, Johansen FE, Jahnsen FL, Lund-Johansen F:** Plasmacytoid dendritic cells activate allergenspecific T<sub>H</sub>2 memory cells: Modulation by CpG oligodeoxynucleotides. *J Allergy Clin Immunol* 114:436-443 (2004)
20. **Grabbe S, Kämpgen E, Schuler G:** Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunology Today* 21:431-433 (2000)
21. **Härtel C, Schumacher N, Fricke L, Ebel B, Kirchner H, Müller-Steinhardt M:** Sensitivity of whole-blood T lymphocytes in individual patients to Tacrolimus (FK506): Impact of interleukin-2 mRNA expression as surrogate measure of immunosuppressive effect. *Clin Chem* 50:141-151 (2004)
22. **Ho CSK, Lopez JA, Vuckovic S, Pyke CM, Hockey RL, Hart DNJ:** Surgical and physical stress increases circulating blood dendritic cell counts independently of monocyte counts. *Blood* 98(1):140-145 (2001)
23. **Hogstrand C, Verbost PM, Bonga SE, Wood CM:** Mechanisms of zinc uptake in gills of freshwater rainbow trout: interplay with calcium transport. *Am J Physiol* 270(5.2):1141-1147 (1996)
24. **Honda K, Takaoka A, Taniguchi T:** Type I interferon gene induction by the interferon regulatory factor family of transcription factors. *Immunity* 25:349-360 (2006)
25. **Horner AA, Raz E:** Immunostimulatory sequence oligodesoxynucleotide-based vaccination and immunomodulation: two unique but complementary strategies for the treatment of allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 110:706-712 (2002)
26. **Huh JC, Strickland DH, Jahnsen FL, Turner DJ, Thomas JA, Napoli S, Tobagus I, Strumbles PA, Sly PD, Holt PG:** Bidirectional interactions between antigen-bearing respiratory tract dendritic cells (DCs) and T cells precede the late phase reaction in experimental asthma: DC activation occurs in the airway mucosa but not in the lung parenchyma. *J Exp Med* 198:19-30 (2003)
27. **Isaacs A, Lindenmann J:** Virus Interference: I. The Interferon. *Biol Sci* 147:258-267 (1957)



28. **Izaguirre A, Barnes BJ, Amrute S, Yeow WS, Megjugorac N, Dai J, Feng D, Chung E, Pitha P, Fitzgerald-Bocarsly P:** Comparative analysis of IRF and IFN- $\alpha$  expression in human plasmacytoid and monocyte derived dendritic cells. *J Leuko Biol* 74:1125-1138 (2003)
  
29. **Jahnsen FL, Lund-Johansen F, Dunne JF, Farkas L, Haye R, Brandtzaeg P:** Experimentally induced recruitment of plasmacytoid (CD123<sup>high</sup>) dendritic cells in human nasal allergy. *J Immunol* 165:4062-4068 (2000)
  
30. **Johnson AR, Munoz A, Gottlieb JL, Jarrard DF:** High dose zinc increases hospital admissions due to genitourinary complications. *J Urol* 177(2):639-643 (2007)
  
31. **Jonas S, Neuhaus R, Junge G, Klupp J, Theruvat T, Langrehr JM, Stettmacher U, Neuhaus P:** Primary immunosuppression with tacrolimus after liver transplantation: 12-years follow-up. *Int Immunopharmacol* 5(1):125-128 (2005)
  
32. **Julia V, Hessel EM, Malherbe L, Glaichenhaus N, O'Garra A, Coffman RL:** A restricted subset of dendritic cells captures airborne antigens and remains able to activate specific T cells long after antigen exposure. *Immunity* 16:271-283 (2002)
  
33. **Kabu K, Yamasaki S, Kamimura D, Ito Y, Hasegawa A, Sato E, Kitamura H, Nishida K, Hirano T:** Zinc is required for Fc $\epsilon$ RI-mediated mast cell activation. *J Immunol* 177:1296-1305 (2006)
  
34. **Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ:** Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med* 192(2):219-226 (2000)
  
35. **Kahmann L, Uciechowski P, Warmuth S, Plümäkers B, Gressner AM, Malavolta M, Mocchegiani E, Rink L:** Zinc supplementation in the elderly reduces spontaneous inflammatory cytokine release and restores T-cell functions. *Rejuvenation Res* 11(1):227-237 (2008)

36. **Kalinski P, Hilkens CMU, Wierenga EA, Kapsenberg ML:** T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 20(12):561-567 (1999)
37. **Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, Towarowski A, Wagner M, Sarris A, Giese T, Endres S, Hartmann G:** Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 170:4465-4474 (2003)
38. **Kim R, Manabu E, Tababe K, Arihiro K:** Potential functional role of plasmacytoid dendritic cells in cancer immunity. *Immunity* 121:149-157 (2007)
39. **Kino T, Hatanaka H, Hashimoto M, Nishiyama M, Goto T, Okuhara M, Kohsaka M, Aoki H, Imanaka H:** FK-506, a novel immunosuppressant isolated from a streptomycetes. *J Antibiot (Tokyo)* 40:1249-1255 (1987)
40. **Kirchner H:** The interferon system as an integral part of the defense system against infections. *Antiviral Res* 6(1):1-17 (1986)
41. **Kitamura H, Morikawa H, Kamon H, Iguchi M, Hojyo S, Fukada T, Yamashita S, Kaisho T, Akira S, Murakami M, Hirano T:** Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function. *Nat Immunol* 7(9):971-977 (2006)
42. **Kraft S, Weßendorf JHM, Hanau D, Bieber T:** Regulation of the high affinity receptor for IgE on human epidermal Langerhans cells. *J Immunol* 161:1000-1006 (1998)
43. **Lamprecht BN, Salomon B, Klatzmann D, Pauwels RA:** Dendritic cells are required for the development of chronic eosinophilic airway inflammation in response to inhaled antigen in sensitized mice. *J Immunol* 160:4090-4097 (1998)
44. **Liu J, Farmer JD Jr., Lane WS, Friedman J, Weissman I, Schreiber SL:** Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporin A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66(4):807-815 (1991)

45. **Liuzzi JP, Cousins RJ:** Mammalian zinc transporters. *Annu Rev Nutr* 24:151-172 (2004)
46. **Matyszak MK, Citterio S, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P:** Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 30:1233-1242 (2000)
47. **Mentzer RM Jr, Jahania MS, Lasley RD:** Tacrolimus as a rescue immunosuppressant after heart and lung transplantation. The U.S. Multicenter FK506 Study Group. *Transplantation*. 65(1):109-113 (1998)
48. **Moser M, Murphy KM:** Dendritic cell regulation of T<sub>H</sub>1-T<sub>H</sub>2 development. *Nat Immunol* 1(3):199-205 (2000)
49. **Munn DH, Sharma MD, Hou D, Baban B, Lee JR, Antonia SJ, Messina JL, Chandler P, Koni PA, Mellor AL:** Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase by plasmacytoid dendritic cells in tumor-draining lymph nodes. *J Clin Invest* 114(4):280-290 (2004)
50. **Neuhaus P, Blumhardt G, Bechstein WO, Platz KP, Jonas S, Mueller AR, Langrehr JM, Lohmann R, Schattenfroh N, Knoop M, et al.:** Comparison of FK506- and cyclosporine-based immunosuppression in primary orthotopic liver transplantation. A single center experience. *Transplantation* 59(1):31-40 (1995)
51. **O'Doherty U, Peng M, Gezelter S, Swiggard WJ, Betjes M, Bhardwaj N, Steinman RM:** Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 82:487-493 (1994)
52. **Ochando JC, Homma C, Yang Y, Hidalgo A, Garin A, Tacke F, Angeli V, Li Y, Boros P, Ding Y, Jessberger R, Trinchieri G, Lira SA, Randolph GJ, Bromberg JS:** Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nat Immunol* 7(6):652-662 (2006)

53. **Olweus J, BitMansour A, Warnke R, Thompson PA, Carballido J, Picker LJ, Lund-Johansen F:** Dendritic cell ontogeny: a human dendritic cell lineage of myeloid origin. *Proc Natl Acad Sci* 94:12551-12556 (1997)
54. **Opelz G, Döhler B:** Effect of human leukocyte antigen compatibility on kidney graft survival; comparative analysis of two decades. *Transplantation* 84(2):137-143
55. **Osawa Y, Iho S, Takauji R, Takatsuka H, Yamamoto S, Takabashi T, Horiguchi S, Urasaki Y, Matsuki T, Fujieda S:** Collaborative action of NF-kappaB and p38 MAPK is involved in CPG DNA-induced IFN-alpha and chemokine production in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol* 177(7):4841-4852 (2006)
56. **Overbeck S, Uciechowski P, Ackland ML, Ford D, Rink L:** Intracellular zinc homeostasis in leukocyte subsets is regulated by different expression of zinc exproters ZnT-1 to ZnT-9. *J Leuko Biol* 83:1-13 (2008)
57. **Parronchi P, Carli M, Manetti R, Simonelli C, Sampognaro S, Piccinni MP, Macchia D, Maggi E, Prete G, Romagnani S:** IL-4 and IFN ( $\alpha$  and  $\beta$ ) exert oposite regulatory effects on the development of cytolytic potential by TH-1 or TH-2 human T cell clones. *J Immunol* 149 (9):2977-2983 (1992)
58. **Pestka S, Krause CD, Walter MR:** Interferons, interferon-like cytokines, and their receptors. *Immunol Rev* 202:8-32 (2004)
59. **Prasad AS:** Zinc in human health: Effect of zinc on immune cells. *Mol Med* 14(5-6):353-357 (2008)
60. **Prasad AS, Fitzgerald JT, Bao B, Beck FWJ, Chandrasekar PH:** Duration of symptoms and plasma cytokine levels in patients with the comon cold treated with zinc acetate. *Ann Intern Med* 133:245-252 (2000)
61. **Racusen LC, Haas M:** Antibody rejection in renal allografts: lessons from pathology. *Clin J Am Soc Nephrol* 1:415-420 (2006)

- 62. Reider N, Reider D, Ebner S, Holzmann S, Herold M, Fritsch P, Romani N:** Dendritic cells contribute to the development of atopy by an insufficiency in IL-12 production. *J Allerg Clin Immunol* 109:89-95 (2002)
- 63. Rink L, Gabriel P:** Zinc and immune system. *Proc Nutr Soc* 59:541-552 (2000)
- 64. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, Grouard G, Briere F, de Waal Malefyt R, Liu YJ:** Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283(5405):1124-1125 (1999)
- 65. Säemann MD, Kelemen P, Böhmig GA, Hörl WH, Zlabinger GJ:** Hyporesponsiveness in alloreactive T-cells by NF-kappaB inhibitor-treated dendritic cells: resistance to calcineurin inhibition. *Am J Transplant* 4(11):1928-1929 (2004)
- 66. Schnurr M, Galambos P, Scholz C, Dauer M, Krug A, Hartmann G, Eigler A, Endres S:** Dendritische Zellen – Träger tumorgerichteter Immuntherapie. *Dtsch Arztebl* 99(37):2408-2416 (2002)
- 67. Shimada T, Watanabe N, Ohtsuka Y, Endoh M, Kojima K, Hiraishi H, Terano A:** Polaprezinc down-regulates proinflammatory cytokine-induced nuclear factor- $\kappa$ B activation and interleukin-8 expression in gastric epithelial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 291(1):345-52 (1999)
- 68. Shodell M, Siegal FP:** Circulating, interferon-producing plasmacytoid dendritic cells decline during human aging. *Scand J Immunol* 56:518-521 (2002)
- 69. Shodell M, Siegal FP:** Corticosteroids depress IFN- $\alpha$  producing plasmacytoid dendritic cells in human blood. *J Allergy Clin Immunol* 108:446-448 (2001)
- 70. Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M, Fitzgerald-Bocarsly PA, Shah K, Ho S, Antonenko S, Liu YJ:** The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 284:1835-1837 (1999)

- 71. Soumelis V, Scott I, Gheyas F, Bouhour D, Cozon G, Cotte L, Huang L, Levy JA, Liu YJ:** Depletion of circulating natural type I interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood* 98(4):906-912 (2001)
- 72. Steinman RM, Cohn ZA:** Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice, *J Exp Med* 137:1142-1162 (1973)
- 73. Svensson H, Johannison A, Nikkil T, Alm GV, Cederblad B:** The cell surface phenotype of human natural interferon-alpha producing cells as determined by flow cytometry, *Scand J Immunol* 44 (2):164-172, (1996)
- 74. Szabo G, Gavala C, Mandrekar P:** Tacrolimus and Cyclosporine A inhibit allostimulatory capacity and cytokine production of human myeloid dendritic cells. *J. Investing Med* 49:442-449 (2001)
- 75. Tajima K, Amakawa R, Ito T, Miyaji M, Takebayashi M, Fukuhara S:** Immunomodulatory effects of Cyclosporine A on human peripheral blood dendritic cell subsets. *Immunology* 108:321-328 (2003)
- 76. Taniguchi T, Takaoka A:** The interferon-alpha/beta system in antiviral responses: a multimodal machinery of gene regulation by the IRF family of transcription factors. *Curr Opin Immunol* 14:111-116 (2002)
- 77. Taylor GA, Blackshear PJ:** Zinc inhibits turnover of labile mRNAs in intact cells. *J Cell Physiol.* 162(3):378-87 (1995)
- 78. van Tongeren J, Reinartz SM, Fokkens WJ, de Jong EC, van Drunen CM:** Interactions between epithelial cells and dendritic cells in airway immune responses: lessons from allergic airway disease. *Allergy* 63:1124-1135 (2008)
- 79. Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N, Ray-Coquard I, Bachelot T, Guastalla JP, Bremond A, Goddard S, Pin JJ, Barthelemy-Dubois C, Lebecque S:** Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clin Cancer Res* 10(22):7466-74 (2004)

80. **Uchida Y, Kurasawa K Nakajima, Nakagawa N, Tanabe E, Sueishi M, Saito Y, Iwamoto I:** Increase of dendritic cells of type 2 (DC2) by altered response to IL-4 in atopic patients. *J Allergy Clin Immunol* 108:1005-1011 (2001)
81. **Vallee BL, Falchuk KH:** The biochemical basis of zinc physiology. *Physiol Rev* 73:79-118 (1993)
82. **Volmer WM, Wahl PW, Blagg CR:** Survival with dialysis and transplantation in patients with end-stage renal disease. *N Engl J Med* 308(26):1553-1558 (1983)
83. **Wang K, Zhou B, Kuo YM, Zemansky J, Gitschier J:** A novel member of a zinc transporter family is defective in acrodermatitis enteropathica. *Am J Hum Genet* 71:66-73 (2002)
84. **Wellinghausen N, Driessen C, Rink L:** Stimulation of human peripheral blood mononuclear cells by zinc and related cations, *Cytokine* 8(10):767-771 (1996)
85. **Yamaguchi M, Mochizuki A, Okada S:** Stimulation of bone resorption by comparatively high dose of zinc in rats. *J Pharmacobiodyn* 5(7):501-504 (1982)

## **7. Danksagung**

Für seine langjährige Unterstützung und die Möglichkeit über Jahre auch neben der Promotionsarbeit an seinem Institut arbeiten zu dürfen, möchte ich Prof. Dr. med. H. Kirchner herzlich danken.

Meinem Doktorvater, Herrn PD Dr. med. Schlenke, möchte ich für seine uneingeschränkte Unterstützung, konstruktive Kritik und für ein stets freundschaftliches Arbeitsverhältnis besonders danken.

Mein Dank gilt weiterhin allen Mitarbeitern des Institutes für Immunologie und Transfusionsmedizin, die mir hilfreich bei meiner experimentellen Arbeit zur Seite standen.

Herrn PD Dr. med. M. Müller-Steinhardt der Medizinischen Fakultät in Mannheim danke ich für die Beratung in Bezug auf die Calcineurininhibitoren und deren Bereitstellung.

Gedankt sei auch Herrn Prof. Dr. med. Grabbe und den Mitarbeitern der Klinik für Dermatologie des Uniklinikum Schleswig-Holstein Campus Lübeck für die Bereitstellung von Blutproben bei Patienten mit atopischem Ekzem.



## 8. Lebenslauf

Name:	Michael Paulsen
Geburtstag:	15. Juli 1972
Geburtsort:	Niebüll
Familie:	Ehefrau: Catharina Havel Sohn: Juli Christian Paulsen
1979 - 1983	Grundschule Bad Schwartau
1983 - 1986	Gymnasium am Mühlenberg, Bad Schwartau
1986 - 1988	Realschule Bad Schwartau
1988 - 1990	Realschule Schacht-Audorf
1990 - 1994	Ausbildung zum Biologielaboranten, Forschungszentrum Borstel
1994 - 2000	Biologielaborant am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, UKSH Campus Lübeck (Prof. Dr. med. H. Kirchner)
1994 - 1997	Allgemeine Hochschulreife, Dorothea- Schlözer-Schule, Lübeck
1997 - 2004	Studium der Humanmedizin, Universität zu Lübeck
2000	Physikum
Seit April 2000	Doktorand am Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin, UKSH Campus Lübeck
2001	1. Staatsexamen
2003	2. Staatsexamen
2004	3. Staatsexamen
Seit Juni 2004	Assistenzarzt in der Medizinischen Klinik I (Direktor: Prof. Dr. med. H. Lehnert) UKSH Campus Lübeck

## 9. *Publikationen*

### Originalarbeiten:

1. **Machner B, Neppert B, Paulsen M, Hofmann C, Sander T, Helmchen C:** Pseudotumor cerebri as a reversible side effect of all-trans retinoic acid (ATRA) treatment in acute promyelocytic leukaemia. *Eur J Neurol* 15(7):68-69 (2008)
2. **Jabs WJ, Paulsen M, Wagner HJ, Kirchner H, Kluter H:** Analysis of Epstein-Barr virus (EBV) receptor CD21 on peripheral B lymphocytes of long-term EBV-adults. *Clin Exp Immunol* 116(3):468-473 (1999)
3. **Kluter H, Schlenke P, Muller-Steinhardt M, Paulsen M, Kirchner H:** Impact of buffy coat storage on the generation of inflammatory cytokines and platelet activation. *Transfusion* 37(4):362-367 (1997)