

Aus der

Abteilung für Pneumologie der Klinik und Poliklinik für Innere Medizin der

Medizinischen Fakultät der Universität Rostock

Direktor der Abteilung: Prof. Dr. med. habil. J.C. Virchow

**Expression und Regulation zytotoxischer Proteine in
humanen plasmazytoiden dendritischen Zellen.**

INAUGURALDISSERTATION

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Juliane Maria Nielsen, geboren am 19. Januar 1984 in München

aus Oldenburg (Oldenburg)

Rostock, den 25.11.2012

Gutachter:

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. habil. J.Chr. Virchow
Abteilung für Pneumologie, Universität Rostock
2. Gutachter: Prof. Dr. Brigitte Müller-Hilke
Institut für Immunologie
3. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. Dr. rer. Nat. Sven Meuth, Universität Münster
Klinik für Allgemeine Neurologie

Datum der Einreichung: 25.11.2012

Datum der Verteidigung: 02.12.2014

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS.....	I
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	IV
TABELLENVERZEICHNIS	V
ABKÜRZUNGEN	VI
1 EINLEITUNG.....	1
1.1 Das Immunsystem.....	1
1.2 Dendritische Zellen (DCs).....	2
1.2.1 Die myeloide Dendritische Zelle (mDC)	4
1.2.2 Die plasmazytoide Dendritische Zelle (pDC)	4
1.3 Apoptose	7
1.3.1 Die Granula-vermittelte Apoptose	8
1.3.2 Granzym B	9
1.3.3 Die Rolle der Granzyme A, K, H und M bei der Apoptoseinduktion	11
1.3.4 Perforin	11
1.4 Zielsetzung.....	12
2 MATERIAL UND METHODEN.....	14
2.1 Material und Reagenzien	14
2.1.1 Geräte	14
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Chemikalien, Lösungen, Zellen und sonstige Reagenzien	17
2.1.4 Antikörper, Stimulanzen und Inhibitoren	19
2.1.5 Antikörper	21
2.2 Puffer, Kulturmedien und Lösungen	23

Inhaltsverzeichnis

2.2.1	Zellisolation, Zellkultur und Zellyse	23
2.2.2	Magnetische Zellseparation	24
2.2.3	Sandwich-ELISA	25
2.2.4	Zytotoxizitätsassay	27
2.2.5	Agarosegelelektrophorese	27
2.3	Isolierung, Differenzierung und Kultivierung von Zellen	28
2.3.1	Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation	28
2.3.2	Immunmagnetische Separation von plasmazytoiden Dendritischen Zellen	29
2.3.3	Anfärben der Zellen mittels Türk'scher Lösung	30
2.3.4	Kultivierung von MNCs	31
2.3.5	Kultivierung von pDCs	31
2.3.6	Kultivierung der Zelllinie K562	31
2.4	Immunologische Methoden	32
2.4.1	Durchflusszytometrie	32
2.4.2	Enzym-Immunoassays (Sandwich-ELISA)	37
2.4.3	Zytozentrifugation und intrazelluläre Lokalisation von GrB mittels Fluoreszenzmikroskopie	40
2.4.4	Zytotoxizitätsassay	41
2.5	RT-PCR	44
2.6	Aufbau der Versuche	46
2.6.1	Versuchsblock I: Nachweis zytotoxischer Proteine in Dendritischen Zellen des peripheren Blutes	46
2.6.2	Versuchsblock II: Einfluss verschiedener Stimulanzen auf die Granzym B- Synthese in pDCs	46
2.6.3	Versuchsblock 3: Nachweis der pDC-vermittelten Granzym B-abhängigen Zytotoxizität	46
2.7	Statistik	47
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Granzyme und Perforin in mDCs und pDCs des Vollblutes	48
3.1.1	Expression zytotoxischer Proteine in mDCs und pDCs	48
3.1.2	Einfluss von Kulturbedingungen und IL-3 auf die Granzym B-Expression in pDCs	50

Inhaltsverzeichnis

3.1.3	Intrazelluläre Lokalisation von Granzym B in pDCs	51
3.2	Der Effekt von TLR-Agonisten auf die Granzym B-Expression in pDCs	52
3.3	Der Effekt von Zytokinen auf die Granzym B-Expression in pDCs	55
3.4	PDCs initiieren einen Granzym B-, Caspase-abhängigen Zelltod in K562 Zellen	57
4	DISKUSSION	61
4.1	MDCs aus dem peripheren Blut synthetisieren keine zytotoxischen Proteine der Granzym-Familie	61
4.2	Die Synthese zytotoxischer Proteine in pDCs	62
4.2.1	Die Synthese von Granzym B	62
4.2.2	PDCs initiieren Granzym B-abhängig den Zelltod in Zielzellen	63
4.2.3	Die zytotoxische Wirkung der pDCs ist Perforin-unabhängig	65
4.3	Einfluss von TLR-Liganden und Zytokinen auf die Granzym B-Synthese in pDCs	67
4.4	Mögliche Bedeutung der Granzym B-Synthese für die Funktion der pDCs <i>in vivo</i>	70
5	ZUSAMMENFASSUNG	75
6	LITERATURVERZEICHNIS	77
7	ANHANG	89
7.1	Thesen	89
7.2	Curriculum vitae	91
7.3	Publikation	94
7.4	Danksagung	94
7.5	Eidesstattliche Erklärung	96

Abbildungsverzeichnis

ABB. 1-1 DCs ALS PROFESSIONELLE ANTIGENPRÄSENTIERENDE ZELLEN DES IMMUNSYSTEMS (BANCHEREAU ET AL. 1998).	3
ABB. 1-2 MORPHOLOGIE DER PDCs (COLONNA ET AL. 2004)..	5
ABB. 1-3 DIE IMMUNSTIMULATORISCHEN FUNKTIONEN VON AKTIVIERTEN PDCs (COLONNA ET AL. 2004). 6	
ABB. 1-4 WEGE DES GRANZYM B-VERMITTELTEN ZELLTODES (CULLEN ET AL. 2008).	10
ABB. 2-1 ISOLIERUNG MONONUKLEÄRER ZELLEN MITTELS DICHTEGRADIENTENZENTRIFUGATION.	29
ABB. 2-2 AUTOMATISCHE MAGNETISCHE SEPARATION VON ZELLEN (AUTOMACS).	30
ABB. 2-3 MESSSTRATEGIE IM BEISPIEL FÜR GRANZYM B IN PDCs.	37
ABB. 2-4 FUNKTIONSPRINZIP ELISA.	38
ABB. 3-1 IDENTIFIZIERUNG VON MDCs UND PDCs MITTELS DURCHFLUSSZYTOMETRIE.	49
ABB. 3-2 NACHWEIS ZYTOTOXISCHER PROTEINE IN PDCs AUF mRNA-EBENE MITTELS RT-PCR.	50
ABB. 3-3 EINFLUSS VON IL-3 AUF DIE GRANZYM B-EXPRESSION IN PDCs.	51
ABB. 3-4 INTRAZELLULÄRE LOKALISATION VON GRANZYM B IN PDCs.	52
ABB. 3-5 DER EFFEKT VON TLR-AGONISTEN AUF DIE GRANZYM B-SYNTHESE IN PDCs EINER MNC-KULTUR.	53
ABB. 3-6 TLR-AGONISTEN SUPPRIMIEREN DIE GRANZYM B-SYNTHESE IN PDCs.	54
ABB. 3-7 DER EFFEKT VON ZYTOKINEN AUF DIE GRANZYM B-EXPRESSION IN PDCs EINER MNC-KULTUR.	55
ABB. 3-8 IL-4 SUPPRIMIERT DIE GRANZYM B-EXPRESSION IN PDCs.	56
ABB. 3-9 MESSSTRATEGIE DES ZYTOTOXIZITÄTSASSAYS.	57
ABB. 3-10 PDC-VERMITTELTEN ZELLTOD VON TARGETZELLEN IN ABHÄNGIGKEIT DES EFFEKTOR-/TARGET-VERHÄLTNISSES.	58
ABB. 3-11 EGTA SUPPRIMIERT DEN PDC-VERMITTELTEN ZELLTOD.	59
ABB. 3-12 DAS ZYTOTOXISCHE POTENTIAL VON PDCs WIRD DURCH DEN GRANZYM B-INHIBITOR Z-AAD-CMK SUPPRIMIERT.	60
ABB. 3-13 DER PDC-VERMITTELTE ZELLTOD IST CASPASEABHÄNGIG.	60
ABB. 4-1 ZYTOTOXISCHE MECHANISMEN VON PDCs NACH UNTERSCHIEDLICHER STIMULATION.	68
ABB. 4-2 DER EINFLUSS VON IL-4 AUF DIE GRANZYM B-SYNTHESE IN VERSCHIEDENEN ZELLPOPULATIONEN.	69
ABB. 4-3 MÖGLICHE GRANZYM B-VERMITTELTE FUNKTIONEN VON PDCs	74

Tabellenverzeichnis

TABELLE 2-1 ANTIKÖRPER GEGEN OBERFLÄCHENANTIGENE UND INTRAZELLULÄRE ANTIGENE SOWIE ELISA- ANTIKÖRPER	21
TABELLE 2-2 ANTIKÖRPER GEGEN OBERFLÄCHENANTIGENE UND INTRAZELLULÄRE ANTIGENE SOWIE ELISA- ANTIKÖRPER.	22
TABELLE 2-3 FLUOROCHROME	33
TABELLE 2-4 CHARAKTERISIERUNG DER MDCs UND PDCs ANHAND IHRER OBERFLÄCHENANTIGENEXPRESSION.	34
TABELLE 2-5 ANSÄTZE FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRISCHE MESSUNG	35
TABELLE 2-6 VERSUCHSPARAMETER DES GRANZYM B- ELISA.	39
TABELLE 2-7 ANSÄTZE FÜR DAS ZYTOTOXIZITÄTSASSAY	43
TABELLE 2-8 BASESEQUENZEN DER IN DER PCR VERWENDETEN PRIMER.....	45

Abkürzungen

Abb.	Abbildung
7-AAD	7-Aminoactinomycin D
APAF	Apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor
APC	Allophycocyanin, auch Antigenpräsentierende Zelle
ATP	Adenosintriphosphat
autoMACS	automatische immunmagnetische Separation
bcl-2	B-cell lymphoma 2
BDCA	Blood dendritic cell antigen
BID	BH3-interacting domain death agonist
BSA	Bovine Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
Ca ²⁺	Calcium
CAD	Caspase-aktivierte DNase
CD	Cluster of Differentiation
CFSE	Carboxyfluorescein succinimidyl ester
cSMAC	Central supramolecular activation complex
CTL	Zytotoxische T lymphocytes
Cr ⁵¹	Chrom 51
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
E/T-Ratio	Effektor/Target-Ratio
EGTA	Ethylenglykoltetraacetat
ELISA	enzyme-linked immunosorbent assay

Abkürzungen

ENDOG	Endonuklease G
FACS	fluorescence activated cell scan
FCS	fetal calf serum
FI	Frisch isoliert
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FSC	forward scatter
g	Gravitationsbeschleunigung
GM-CSF	Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor
GrA	Granzym A
GrB	Granzym B
GrK	Granzym K
GrH	Granzym H
GrM	Granzym M
HLA	human leukocyte antigens
HPE-Puffer	high performance ELISA-Puffer
HRP	horseradish peroxidase
ICAD	Inhibitor der Caspasen-aktivierten DNase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
Kap.	Kapitel
mDC	myeloide dendritische Zelle
MDDC	monocyte-derived dendritic cell
MFI	mediane Fluoreszenzintensität
MHC	Major histocompatibility complex
MNC	Zellen des mononucleären Systems
MTOC	Microtubule organizing center
N	Negativkontrolle

Abkürzungen

NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
ODN	Oligodeoxynucleotides
p	Wahrscheinlichkeit
PARP	Poly(ADP-Ribose)polymerase
PB	Positivkontrolle
PBS	phosphate buffered saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
pDC	plasmazytoide dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Peridin Chlorophyll Protein
PG	Prostaglandin
RNA	Ribonucleic acid
ROS	reaktive Sauerstoff-Spezies
r_p	Korrelationskoeffizient
RT	Reverse Transkription
SSC	side scatter
s.u.	siehe unten
Tab.	Tabelle
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF	transforming growth factor
TH1 bzw. TH2	T-Helferzelle Typ 1 bzw. Typ 2
TLR	Toll-like-Rezeptor
TNF	Tumornekrosefaktor
TMB	Tetramethylbenzidin
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
Treg	regulatorische T-Zelle
TSLP	Thymic stromal lymphopietin
U	Units

Abkürzungen

u.a.	unter anderem
UV	ultraviolett
Vol.	Volumen
vgl.	vergleiche
v/v	Volumen/Volumen-Prozent
w/v	Gewicht/Volumen-Prozent
z.B.	zum Beispiel
z-AAD-cmk	Z-Ala-Ala-Asp-Chlormethylketon
z-VAD-fmk	Z-carbobenzoxy-valyl-alanyl-aspartyl-[O-methyl]- fluoromethylketone

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Das menschliche Immunsystem unterscheidet zwischen körpereigenen und körperfremden Antigenen und hat die Abwehr schädlicher Einflüsse auf den Körper zur Hauptaufgabe. Es bekämpft zum Beispiel infektiöse Organismen wie Bakterien, Pilze, Parasiten und Viren und schützt vor eindringenden Giftstoffen sowie vor entarteten, körpereigenen Zellen. Das Immunsystem besteht aus zwei Komponenten, dem unspezifischen (angeborenen) sowie dem adaptiven (erworbenen) Immunsystem.

Die angeborene Immunität kommt durch eine Vielzahl unspezifischer Schutzmechanismen zustande und verfügt über keinerlei immunologische Gedächtnisfunktionen. Es besteht z.B. aus dem Granulozyten-, Monozyten-, Makrophagensystem, dem Komplementsystem sowie verschiedenen Zytokinen, Akute-Phase-Proteinen und biologischen Barrieren (Ganten & Ruckpaul 1999). Das adaptive Immunsystem höherer Wirbeltiere zeichnet sich durch ein komplexes Zusammenspiel verschiedener Leukozytentypen, v.a. B- und T-Lymphozyten, aus. Diese spezifische Immunität ist, durch ihre Antigenspezifität, klonale Expansion und Bildung von Gedächtniszellen, anpassungsfähig gegenüber neuen sowie dem Körper schon bekannten Krankheitserregern. Grundsätzlich werden humorale und zelluläre Abwehrmechanismen des adaptiven Immunsystems unterschieden. B-Lymphozyten bilden nach Aktivierung antigenspezifische Antikörper (humorale Immunantwort). Die Antikörper werden entweder an der B-Zelloberfläche exprimiert oder von B-Effektorzellen (Plasmazellen) sezerniert. Sezernierte Antikörper markieren Krankheitserreger in Körperflüssigkeiten und aktivieren das Phagozytose- und Komplementsystem (Davies & Cohen 1996). Die zelluläre Abwehr wird durch T-Zellen vermittelt. T-Zellen erkennen v.a. intrazelluläre Erreger, proliferieren klonal und differenzieren zu Gedächtnis- und Effektorzellen. Letztere eliminieren spezifisch die infizierten Zellen (zytotoxische T-Zellen), stimulieren (T-Helferzellen) und modulieren (regulatorische T-Zellen) die Immunantwort.

Antigen präsentierende Zellen (APC), wie z.B. die Dendritischen Zellen (DCs), als Teil der angeborenen Immunität, erkennen und phagozytieren bei einer Erstinfektion eingedrungene Fremdpartikel und sorgen durch Kommunikation mit B- und T-Lymphozyten für deren Aktivierung.

1.2 Dendritische Zellen (DCs)

Dendritische Zellen (DCs) sind Leukozyten, die sich durch eine hohe Konzentration von MHC-II-Molekülen auf der Zelloberfläche auszeichnen. Als Teil der angeborenen Immunität bilden sie die Schnittstelle zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem. DCs erkennen Pathogene und Antigene, phagozytieren, aktivieren das angeborene sowie erworbene Immunsystem und vermitteln Immuntoleranz gegenüber Selbst-Antigenen. Als professionelle, antigenpräsentierende Zellen sind DCs für die Einleitung primärer Immunantworten verantwortlich (Matzinger 1994). Sie erhielten ihren Namen aufgrund der einzigartigen Zellmorphologie, die sich durch sternenförmige Plasmaausläufer (Dendriten) auszeichnet (Banchereau et al. 1997, Steinmann et al. 1973, Steinmann et al. 1974a, Steinmann et al. 1974b, Steinmann et al. 1975). Die Dendriten ermöglichen es den DCs, über Zell-Zellkontakte, anderen Lymphozyten Antigene zu präsentieren und eine Immunantwort zu initiieren (Banchereau et al. 1997).

DCs entstehen im Knochenmark aus pluripotenten Stammzellen des hämatopoetischen Systems (Reid et al. 1992). Unter Einfluss von verschiedenen Stimuli differenzieren sie sich in Richtung myeloider oder lymphoider dendritischer Zellen aus (Grabbe et al., 2000; Fazekas de St. Groth 2002). Für die Differenzierung von DCs spielen ua. FMS-like-tyrosin Kinase 3 Ligand (Flt3L), GM-CSF und Typ 1 Interferone eine entscheidende Rolle (Watowich et al. 2010). Vorläuferzellen der DCs verlassen das Knochenmark und verteilen sich über das Blut va. in nicht-lymphatisches Gewebe (Austyn 1987, O'Doherty et al 1994). Sie sind zahlreich in der Haut sowie in Schleimhäuten des Gastrointestinaltraktes, des Bronchialsystems, vaginal und cervical vorhanden (Niess et al. 2005, Randolph et al. 2005). Im peripheren Blut ist ein Pool von zirkulierenden DC-Vorläuferzellen sowie ausdifferenzierten DCs vorhanden. Die ausdifferenzierten DCs im Blut werden anhand der unterschiedlichen Expression von Oberflächenmolekülen in $CD123^+CD11c^-$ plasmazytoide (pDCs) und $CD123^-CD11c^+$ myeloide Dendritische Zellen (mDCs) unterschieden (O'Doherty et al. 1994, Bratke et al. 2006, Matsuda et al. 2002).

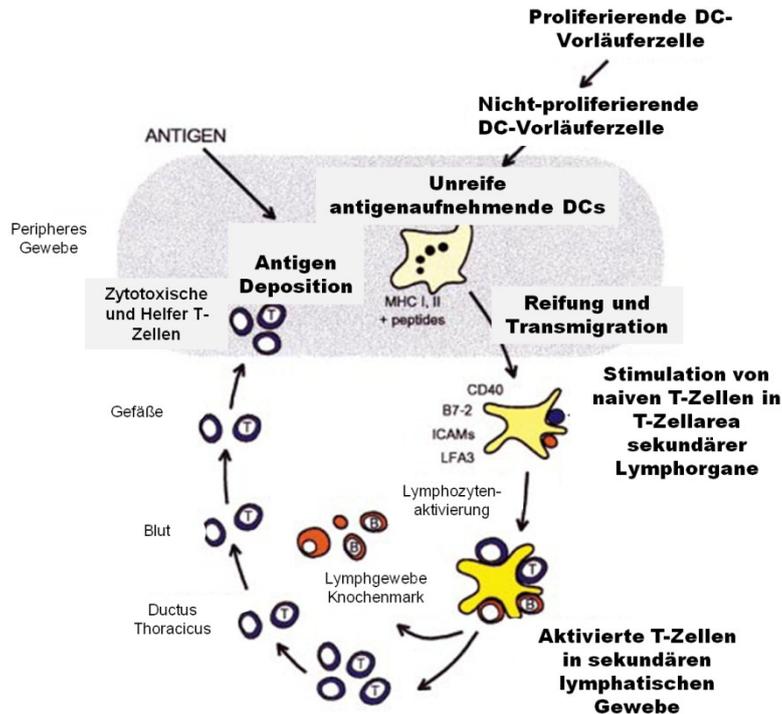


Abb. 1-1 DCs als professionelle Antigenpräsentierende Zellen des Immunsystems (Banchereau et al. 1998). In peripheren Geweben nehmen unreife DCs Antigene auf und prozessieren diese zu MHC-Antigen-Komplexen. DCs reifen aus, transmigrieren in T-Zellareale sekundärer lymphatischer Organe und stimulieren T-Zellen. Neben T-Zellen (blau) können auch B-Zellen (orange) mit den DCs interagieren. Nach Aktivierung verlassen die B- und T-Zellen das T-Zellareal. B-Zellen wandern ins Lymphgewebe, Knochenmark, einige differenzieren zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen. Aktivierte T-Zellen wandern über das Blut zum Ausgangsort des Antigenauftretens und induzieren eine Immunantwort.

In der Körperperipherie, wie z.B. Haut und Mukosa, liegen DCs in einem unreifen Stadium vor. Unreife DCs exprimieren wenige MHC-II-Moleküle und sind besonders gut zur Antigenerkennung und Antigenprozessierung in der Lage (Banchereau et al. 1998). Nach Aufnahme von Pathogenen sowie körpereigenen Selbst-Antigenen in der Peripherie, migrieren DCs in sekundär drainierende lymphatische Organe ein. Die Migration der DCs und der Eintritt in lymphatisches Gewebe (Homing) werden durch regulative Chemokine veranlasst (Randolph et al. 2005, Cyster et al. 1999, Sozzani et al. 1995, Roake et al. 1995, Matsuno et al. 1996, Sozzani et al. 1999). Die zunehmende Reifung der DCs während der Antigenaufnahme und Migration zeichnet sich durch eine erhöhte Expression von MHC-II-Molekülen und kostimulatorischen Faktoren an der Zelloberfläche aus (Mellman & Steinmann 2001).

In parakortikalen T-Zellarealen präsentieren DCs die Antigene und initiieren durch Zytokinausschüttung eine Immunantwort oder vermitteln Immuntoleranz (Banchereau 1998, Mellman und Steinman 2001, Bonifaz et al. 2002). DCs beeinflussen durch Antigenpräsentation und Ausschüttung von Stimuli hauptsächlich T-Zellen, aber auch NK- und B-Zellen (Lukas et al. 2007).

1.2.1 Die myeloide Dendritische Zelle (mDC)

Ein Subtyp der humanen DCs sind die myeloiden Dendritischen Zellen (mDCs), die im Blut als HLA-DR⁺ Lineage⁻ CD11c⁺ CD123⁻ identifiziert werden können (Rissoan et al. 1999, Cella et al. 1999, Kohrgruber et al. 1999, Robinson et al. 1999, Steinbrink et al. 2009). Die Differenzierung von mDCs aus unreifen Vorstufen des Knochenmarks wird von gewebsspezifischen Faktoren sowie Stimulierung der TLR durch Pathogene sowie Antigenaufnahme und Prozessierung induziert (Jonuleit et al. 1997, Heufler et al. 1988, van Vliet et al. 2007). MDCs werden als die „Sentinels“ des Immunsystems beschrieben (Steinbrink et al. 2009). Sie sind professionelle, Antigen-präsentierende Zellen, die in einem unreifen Zustand in der Peripherie vorliegen und durch Antigenkontakt zu reifen APC differenzieren. Die mDCs wandern in T-Zellareale der sekundär lymphatischen Organe ein und induzieren die Proliferation Antigen-spezifischer T-Zellen (Steinbrink et al. 2009, Steinmann et al. 1999, Farkas et al. 2004). Frühere Studien diskutieren die Rolle der mDCs als die für die Initiierung von Immunantworten verantwortlichen Zellen, während den pDCs regulierende und Immuntoleranz-vermittelnde Funktionen zugeschrieben wurde (Colonna et al. 2004, Steinman et al. 1999). In vitro Studien zeigen jedoch, dass pDC eine T-Zellproliferation und TH2-Zytokinsynthese ebenso effizient induzieren wie mDCs (Farkas et al. 2004). Ebenso wird eine Immuntoleranz-vermittelnde Funktion von mDCs in Abhängigkeit von deren Voraktivierung, diskutiert (Steinbrink et al. 2009). Derzeit findet viel Forschung auf dem Gebiet der Anti-Tumor-Immunität statt. Hierbei soll mit Hilfe von mDCs eine Antigen-spezifische T-Zellantwort gegen Tumorantigene induziert und therapeutisch genutzt werden (Steinbrink et al. 2009, Figdor et al. 2004, Nestle et al. 1998).

1.2.2 Die plasmazytoide Dendritische Zelle (pDC)

Bereits 1958 entdeckten Lennert und Remmele eine Zellart ähnlich der Plasmazellen, die jedoch keine B-oder Plasmazellmarker aufwiesen und zahlreich in den T-Zellarealen des humanen Lymphgewebes vorhanden waren. Siegal et al. und Cella et al. identifizierten 1999 die plasmazytoide Dendritische Zelle als diejenige Interferon-produzierende Zelle, welche für die IFN-Typ 1-Produktion im peripheren Blut nach Viruskontakt verantwortlich ist.

pDCs sind CD4⁺CD45⁺IL-3R α (CD123)⁺ILT3⁺ILT1⁻CD11c⁻Lineage⁻ Zellen und können im Blut durch das Fehlen sogenannter „Lineage-Marker“ (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56) und die starke Expression von HLA-DR und des IL-3-Rezeptors (CD123) identifiziert werden (Bratke et al 2006, Matsuda et al. 2002). Die zwei Oberflächenmoleküle BDCA-2 und

BDCA-4 werden im humanen peripheren Blut und Knochenmark spezifisch von pDCs exprimiert und können ebenfalls zu deren Identifizierung herangezogen werden (Colonna et al. 2004, Dzionek et al. 2001, Dzionek et al. 2002). Ein malignes Gegenstück der pDCs wurde bei einer seltenen hämatologischen Neoplasie entdeckt. Diese Tumorzellen weisen eine den pDCs ähnliche Morphologie auf. Sie exprimieren die gleichen Oberflächenmarker und produzieren ebenfalls große Mengen Typ 1 Interferone nach Viruskontakt (Chaperot et al. 2004, Chaperot et al. 2001). Die Herkunft und molekulare Regulation der pDCs ist noch nicht vollkommen verstanden. Es wird einerseits eine lymphoide Abstammung der pDCs diskutiert (Rissoan et al. 2002, Corcoran et al. 2003, Spits et al. 2000). Del Hoyo et al. (2002) gehen von einer gemeinsamen CD11c⁺ DC-Vorläuferzelle im Blut für pDCs und mDCs aus. Außerdem wurde beobachtet, dass bei Virusinfektionen Knochenmarks-pDCs zu mDCs differenzieren können (Zuniga et al. 2004). Die Entwicklung und Differenzierung von pDCs wird hauptsächlich durch Flt3L induziert (Chen et al. 2004, Blom et al. 2000, Pulendran et al. 2000). GM-CSF veranlasst die Mobilisierung der pDCs aus dem Knochenmark (Pulendran et al. 2000, Arpinati et al. 2000).

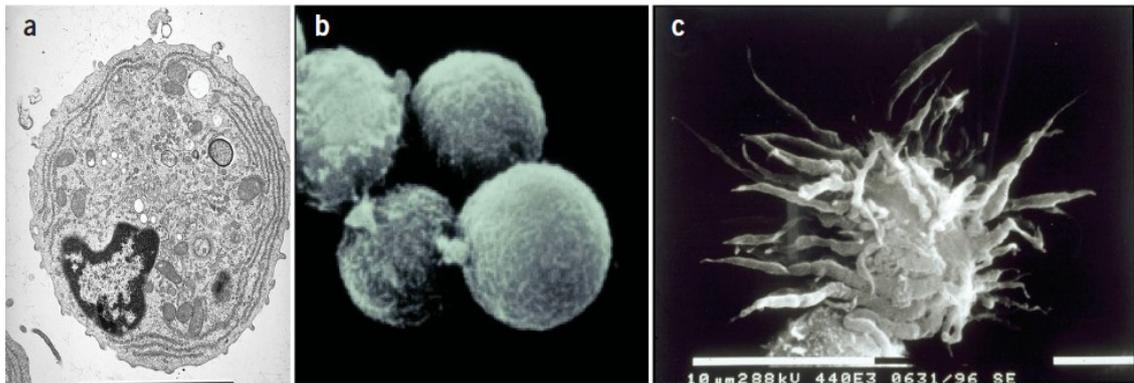


Abb. 1-2 Morphologie der pDCs (Colonna et al. 2004). (a) Elektronenmikroskopische Aufnahme, pDCs weisen eine Plasmazell-ähnliche Morphologie auf. Exzentrischer runder oder ovaler Zellkern, ausgeprägtes Endoplasmatisches Retikulum, leichte granulierte, perinukleäre Anteile. (b) inaktive pDCs haben eine sphärische Zellform. (c) CD40L-aktivierte pDCs nehmen eine DC-typische Zellform an.

pDCs spielen eine entscheidende Rolle in der Modulation der adaptiven T-Zellantwort im Rahmen von neoplastischen, viralen und autoimmunen Erkrankungen (Jahrsdörfer et al. 2010). pDCs kommen in einer erhöhten Anzahl im peripheren Blut von Atopikern (Uchida et al. 2001, Matsuda et al. 2002, Hashizume et al. 2005) und am akuten allergischen Entzündungsort (Jahnsen et al. 2000, Bangert et al. 2003, Bratke et al. 2006) vor. Außerdem sind pDCs in der Lage, TH1-Immunantworten und die Proliferation naiver CD4 T-Zellen zu induzieren (Cella et al. 2000). Die TH1-Polarisierung wird durch die Erkennung viraler und bakterieller Bestandteile durch die Toll-like-Rezeptoren 7 und 9 an der pDC-Oberfläche vermittelt und ist IFN- α/β -abhängig (Iwasaki und Medzhitov 2004, Lund et al. 2003, Lund et al. 2004, Cella et al. 2000).

Frisch aus dem Blut isolierte pDCs induzieren lediglich schwach die Proliferation naiver CD4 T-Zellen (Colonna et al. 2004). Im Gegensatz dazu, sind IL-3 stimulierte pDCs in der Lage eine TH2-Differenzierung in naiven CD4 T-Zellen zu induzieren (Ito et al. 2004). Schroeder et al. zeigten 2005, dass eine Vernetzung des IgE-Rezeptors FcεRI auf pDCs zu einer verminderten TLR-9-Expression und IFN-α-Sekretion führte. Eine Stimulation mit CpG-A Oligonukleotiden resultierte dagegen in einer reduzierten Expression von FcεRI (Schroeder et al. 2005).

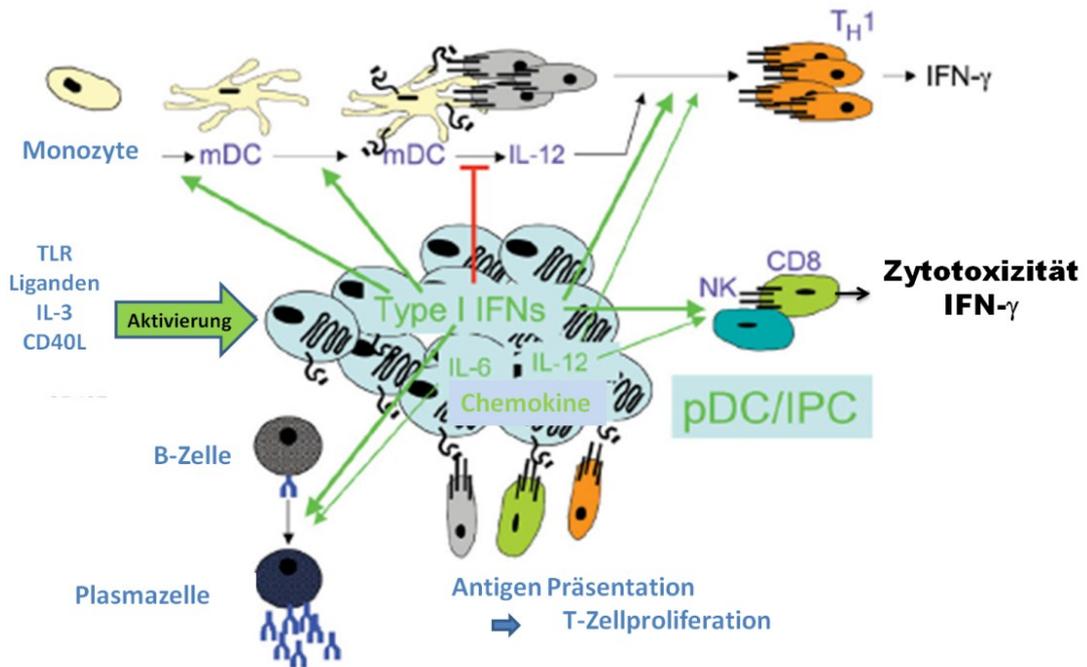


Abb. 1-3 Die immunstimulatorischen Funktionen von aktivierten pDCs (Colonna et al. 2004). pDCs werden durch Stimulation mit TLRs, CD40L und IL-3 zu potenten Typ-1-IFN Produzenten. pDCs induzieren zytotoxische Funktionen in NK- und CD8⁺ T-Zellen und eine IFN-γ Produktion, Differenzierung und Reifung von mDCs, TH1-Polarisierung naiver CD4⁺ T-Zellen und B-Zell-Differenzierung zu Plasmazellen. pDCs sezernieren IL-12, was zu einer TH1-Polarisation führt. Durch Sekretion von IL-6 wird die Differenzierung von Plasmazellen induziert. pDCs präsentieren Antigene und induzieren eine Proliferation von Gedächtnis-und/oder naiven T-Zellen. IPC (Interferon-produzierende Zelle).

Ebenfalls wurde gezeigt, dass Virus-stimulierte pDC TRAIL-abhängig Virus-infizierte TRAIL-sensitive A549-Zellen direkt töten können (Chaperot et al. 2006). Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass pDC die allergische Atemwegsentzündung sowie die Produktion von TH2-Zytokinen inhibieren (de Heer et al. 2004). So sind pDCs neben der Initiierung von TH1- und TH2- Immunantworten auch zur Vermittlung von Immuntoleranz in der Lage (Mc Kenna et al. 2005). Die Granzym B-Expression in pDCs wird durch Stimulation mit IL-3 stark erhöht (Rissoan et al. 2002). Welche Rolle die pDCs bei der Pathogenese und dem Verlauf neoplastischer, viraler oder autoimmuner Erkrankungen einnehmen, ist weiterhin nicht genau bekannt.

1.3 Apoptose

Die Apoptose, der sogenannte programmierte Zelltod, dient der Aufrechterhaltung der Zellhomöostase von eukaryonten Organismen. Die Apoptose findet unter normalen physiologischen Bedingungen statt und ist u.a. Bestandteil im Zellumsatz vieler Strukturen, in der Embryogenese und in der Immunantwort (Jacobson et al. 1997). Die Differenzierung neuer Zellen und die Eliminierung alter, infizierter oder entarteter Zellen durch Apoptose stehen normalerweise im Gleichgewicht. Zellen steuern aktiv die genetisch programmierte Apoptose und führen diese aus. Der programmierte Zelltod wird durch eine Vielzahl von physiologischen sowie pathologischen Stimuli eingeleitet oder inhibiert (Kerr et al. 1972). Die Entstehung von Krankheiten durch eine fehlgesteuerte Apoptose wird diskutiert bei z.B. neurodegenerativen Erkrankungen wie Alzheimer, Autoimmunerkrankungen und der Entstehung von Krebs. So exprimieren z.B. viele Tumore CD95-Ligand, mit dessen Hilfe sie Tumor-infiltrierende Lymphozyten aktiv töten und so die anti-Tumor Immunantwort unterdrücken (Debatin et al. 2006). Ein Ziel der aktuellen Forschung ist es, kontrollierte Apoptose in entarteten oder autoreaktiven Zellen auslösen zu können.

Verschiedene Auslöser können den genetisch programmierten Zelltod aktivieren. Dazu zählen zytotoxische Lymphozyten, Umwelteinflüsse wie Strahlung und Hitze, Mangel an Wachstumsfaktoren oder Hormonen sowie die Unterbrechung von Zell-Zellkontakten (Luttmann et al. 2004, Ueda et al. 1994). Durch Einsatz von chemischen Faktoren wie Steroide oder Zytostatika, kann die Initiierung von Apoptose therapeutisch genutzt werden (Thompson et al. 1994).

Der Vorgang der Apoptose beginnt mit der Herauslösung der Zelle aus dem Gewebsverband. Es kommt zu einer Zell- und Kernpyknose sowie einer Chromatinkondensation. Anschließend kommt es zu Einstülpungen und Bläschenbildungen an der Zellmembran. In der Spätphase der Apoptose schnüren sich sogenannte Apoptosekörperchen von der Zellmembran ab. Diese Körperchen, welche die intrazellulären Bestandteile der Zelle enthalten, werden von Phagozyten aufgenommen und verdaut (Böcker et al. 2008). Somit wird ein Kontakt des Zellinhaltes mit dem umliegenden Gewebe verhindert, und eine lokale, inflammatorische Reaktion wird vermieden. Im Gegensatz dazu wird bei der Nekrose die Zellmembran geschädigt. Durch verschiedene chemische und physikalische Einflüsse ausgelöst, gelangt der Zellinhalt durch die perforierte Membran in das umliegende Gewebe. Dort führt der gelöste Zellinhalt zu weiterer Zellschädigung und einer inflammatorischen Reaktion mit Schädigung des Gewebes (Luttmann et al. 2004, Krysko et al. 2008).

Zytotoxische Lymphozyten können über verschiedene Mechanismen das Apoptoseprogramm in Zielzellen initiieren: Granula-vermittelt, über die Sekretion von Zytokinen (z.B. TNF- α) oder die Oberflächenexpression von bestimmten Liganden (z.B. Fas Ligand). Durch die Bindung von Zytokinen am TNF-Rezeptor bzw. Fas-Ligand am Fas-Rezeptor wird die Kreuzvernetzung von „death-Rezeptoren“ (z.B. TNFR, Fas) auf der Zielzelle induziert. Dies führt intrazellulär zu einer Aktivierung verschiedener Caspasen, deren Aktivität zur Auflösung zellulärer Bestandteile und zum Zelltod führt (Lüthi et al. 2001, Adams et al. 2003, Barry&Bleackley 2002). Die Granula-vermittelte Apoptose ist Bestandteil dieser Arbeit und wird im Folgenden näher erläutert.

1.3.1 Die Granula-vermittelte Apoptose

Die Apoptoseeinleitung über den Granula-Exozytose-Weg wird vor allem von zytotoxischen Lymphozyten und natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) für die Elimination virusinfizierter Zellen und Tumorzellen genutzt (Kagi et al. 1994, Balkow et al. 2001). Erstere synthetisieren verschiedene zytotoxische Serinproteasen, Perforin und weitere zytotoxische Proteine, die in „Granula“ bzw. Lysosomen gespeichert werden. Die Serinproteasen werden nach ihrem intrazellulären Speicherort „Granzyme“ genannt (Waterhouse et al. 2007). Die zytotoxischen Zellen werden durch Antigenpräsentation von der Zielzelle aktiviert. Es kommt daraufhin zur raschen Polarisation des Zentrums der Mikrotubuli, auch „microtubule organizing center“ (MTOC) oder Zentrosom genannt, im Bereich des Zellkontaktes. (Kupfer et al. 1984, Kupfer et al. 1985, Stinchcombe et al. 2001) Die zytotoxischen Granula werden entlang von Mikrotubuli in Richtung der „immunologischen Synapse“ transportiert. Die „immunologische Synapse“ stellt den Zell-Zellkontakt zwischen Zielzelle und zytotoxischer Zelle dar und ist Ort der Degranulation (Shresta et al. 1998, Griffiths et al. 2003, Stinchcombe et al. 2001) In ihrem Zentrum liegt der „central supramolecular activation complex“ (cSMAC), den die Granula vor Verschmelzung mit der Zellmembran durchwandern (Stinchcombe et al. 2001). Die zytotoxischen Granula gelangen von der sekretorischen Domäne der „immunologischen Synapse“ in den interzellulären Spalt und induzieren durch Freisetzung ihrer Bestandteile innerhalb von 20 Minuten den Tod der Zielzelle (Rothstein 1978). Durch Aufnahme der zytotoxischen Proteine in die Zielzelle kann der Zelltod sowohl Caspase-abhängig als auch Caspase-unabhängig eingeleitet werden (Trapani et al. 2002, Sarin et al. 1997). Diese Mechanismen wirken nur in einem begrenzten Raum ohne weitere Zellen zu schädigen. Nach Ablauf der Apoptoseinitiierung können die zytotoxischen Zellen innerhalb kürzester Zeit in weiteren Zielzellen Apoptose induzieren.

1.3.2 Granzym B

Granzym B ist eine lymphozytäre Serinprotease aus der Familie der Granzyme. Beim Menschen wurden bisher fünf Granzyme erfasst (A, B, H, K, M). Granzym B ist Hauptbestandteil der Granula von zytotoxischen Zellen und besitzt eine hohe Substratspezifität (Masson et al. 1987). Wie alle humanen Granzyme wird Granzym B als inaktives Pro-Enzym synthetisiert und in den Granula durch Cathepsin C (Dipeptidyl Peptidase I) aktiviert. Granzym B spaltet Substrate nach der Aminosäure Aspartat und gehört somit zu den Aspartasen. Über den Granula-Exozytose-Weg kann Granzym B sowohl Caspase-abhängig als auch Caspase-unabhängig den Zelltod initiieren.

Zum einen spaltet und aktiviert Granzym B inaktive Vorstufen der Caspasen 3, 6, 7, 8, 9, 10 und löst somit eine Caspasenkaskade aus (Darmon et al. 1995, Lord et al. 2003). Das Schlüsselenzym Caspase 3 aktiviert durch Spaltung wiederum weitere Caspasen sowie das DNA-Reparaturenzym Poly(ADP-Ribose)polymerase (PARP) und den Inhibitor der Caspasen-aktivierten DNase (ICAD) (Thomas et al. 2000, Enari et al. 1998). Diese Vorgänge resultieren in einer DNA-Fragmentierung und Apoptose der Zielzelle. Auch eine direkte Spaltung von PARP, ICAD und anderen Caspase-Substraten durch Granzym B ist möglich (Liebermann 2003, Sharif-Askari et al. 2001).

Caspase-unabhängig kann Granzym B den Zelltod durch Spaltung und Aktivierung von BID (BH3-interacting domain death agonist) einleiten, wodurch die Integrität der äußeren Mitochondrienmembran zerstört wird (Kuwana et al. 2002). Die Granzym B-abhängige Prozessierung von BID führt über die Oligomerisierung der Membranbestandteile BAX und BAK (Bcl-2-Proteine) zu einer Permeabilitätszunahme der Mitochondrienmembran (Heibein et al 2000, Wang et al. 2001). Daraus resultiert die Freisetzung von Zytochrom C, Endonuklease G (ENDOG) und anderen Proteinen aus dem intermembranösen Raum ins Zytosol (Liebermann 2003). Im Zytosol kommt es zu Komplexbildung von Zytochrom C, dem zytosolischen Protein APAF-1 (apoptotischer Protease-Aktivierungsfaktor-1) und Procaspase-9 zum Apoptosom (Jiang et al. 2000). In Gegenwart von ATP/dATP wird die Caspase-9 aktiviert, die dann wiederum die Procaspase-3 spaltet und somit aktiviert (Lord et al.2003). In vivo scheinen der Caspase-abhängige und der mitochondriale Weg zu interagieren, um die Apoptoseinleitung zu maximieren (Metkar et al. 2003).

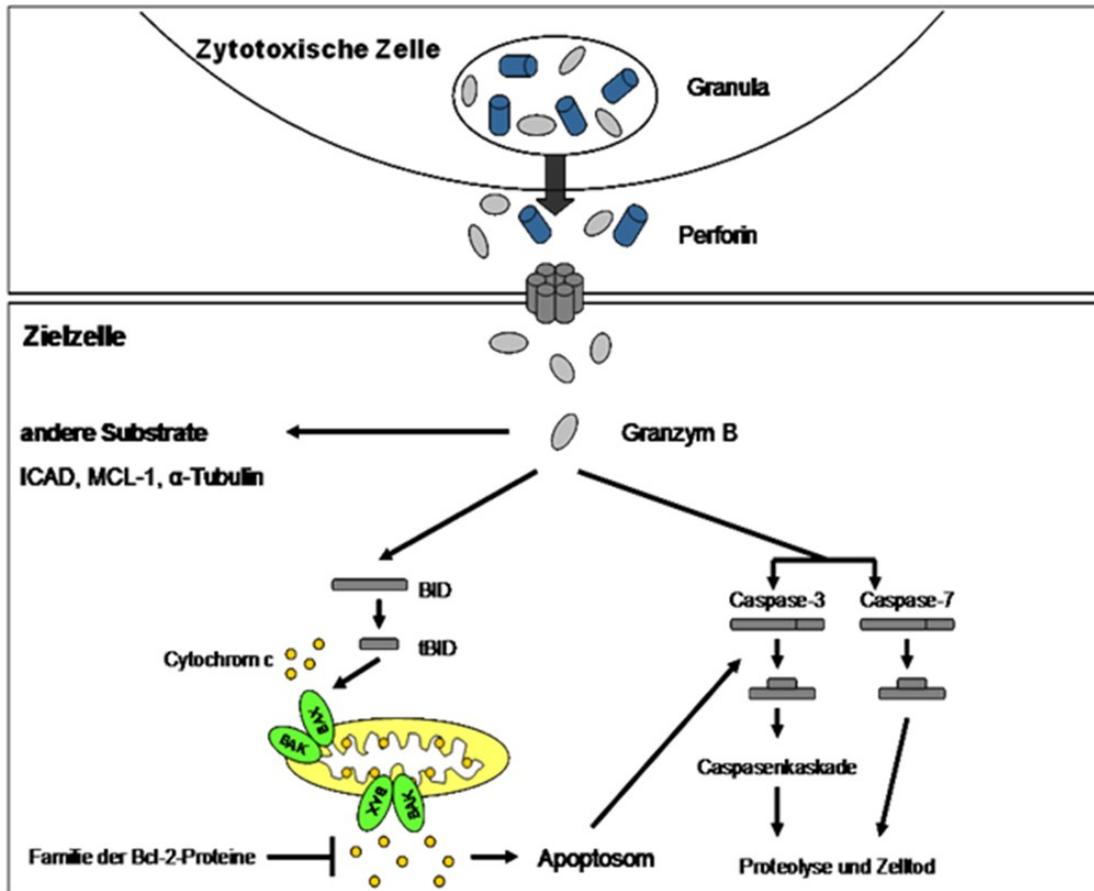


Abb. 1-4 Wege des Granzym B-vermittelten Zelltodes (Cullen et al. 2008). Granzym B gelangt aus den Granula der zytotoxischen Zelle in die Zielzelle. Über zwei Hauptwege löst Granzym B in der Zielzelle den Zelltod aus: Einerseits führt es über die Oligomerisierung von BAX und/oder BAK in der äußeren Mitochondrienmembran zur Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien. Cytochrom C komplexiert mit zytosolischen Proteinen zum Apoptosom und aktiviert somit die Caspase-3. Weiterhin kann Granzym B die Caspase-3 und 7 direkt durch Spaltung aktivieren. Eine Caspasenkaskade schließt sich an, welche zu Proteolyse und Zelltod führt.

Ebenso ist eine Caspase- sowie BID-unabhängige direkte Zerstörung des mitochondrialen Transmembranpotentials durch Granzym B-Einwirkung möglich (Alimonti et al. 2001, MacDonald et al. 1999, Thomas et al. 2001). Die GrB-vermittelte DNA-Schädigung kann ebenfalls Caspase-unabhängig durch die Freisetzung der Caspase-aktivierten DNase (CAD), nach Spaltung ihres Inhibitors ICAD, erfolgen (Sharif-Askari et al. 2001, Thomas et al. 2002). Außerdem induziert das durch den Granzym B-abhängigen BID-Weg freigesetzte endomitochondriale Protein ENDOG eine DNA-Zerstörung (Li et al. 2001). Granzym B führt demnach über verschiedene Wege zur DNA-Fragmentierung und zum daraus resultierendem Zelltod, auch wenn der Weg über die Caspasenkaskade blockiert ist. Es bleibt umstritten, welcher Mechanismus der bevorzugte ist (Waterhouse et al. 2005, Metkar et al. 2003).

1.3.3 Die Rolle der Granzyme A, K, H und M bei der Apoptoseinduktion

Granzym A induziert einen Caspase-unabhängigen Zelltod durch Zerstörung des mitochondrialen Transmembranpotentials sowie durch Generierung reaktiver Sauerstoff-Spezies (ROS) (Martinhalet et al. 2005). Die ROS induzieren die Transmigration der Proteine des SET-Komplexes in den Zellkern. Granzym A wandert nach Zelleintritt einerseits in den Nukleus ein und aktiviert dort die DNase NM23-H1 direkt, andererseits inhibiert Granzym A den DNase-Inhibitor SET durch Spaltung der Komplex-Proteine HMG2, SET und Ape1. Aus beiden Mechanismen resultiert der Zelltod durch Fragmentierung der DNA (Fan et al. 2003 a, Liebermann 2003).

Die Funktion der Granzyme K, H und M ist nicht vollständig verstanden. Granzym K bewirkt in ähnlicher Art und Weise wie Granzym A Einzelstrangbrüche durch Aktivierung der DNase NM23-H1 über die Generierung von ROS und anschließender Transmigration und Spaltung von SET (MacDonald et al. 1999, Zhao et al 2007a). Granzym M ist eine Met-ase, die in Gegenwart sublytischer Perforinmengen die Apoptose einleiten kann, die mit Chromatinkondensation und Bildung zytoplasmatischer Vakuolen einher geht (Kelly et al. 2004). Auch für das in NK-Zellen gehäuft vorkommende Granzym H konnte inzwischen eine Induktion der Apoptose in Zielzellen nachgewiesen werden. Ob die zytotoxische Funktion von Granzym H jedoch Caspase-abhängig oder Caspase-unabhängig ist, wird widersprüchlich diskutiert (Fellows et al. 2007, Hou et al. 2008, Waterhouse et al. 2007)

1.3.4 Perforin

Perforin ist ein zytolytisches Mediatorprotein, das von zytotoxischen Lymphozyten synthetisiert und in deren zytotoxischen Granula gespeichert wird. Perforin bildet Ca^{2+} -abhängig lytische Membranporen über Multimerisation aus (Sauer et al. 1991, Pipkin et al. 2007). Ähnlich der Granzyme wird Perforin als inaktives Proenzym synthetisiert und erlangt durch Spaltung seine volle Aktivität (Uellner et al. 1997). Die genauen Mechanismen der Perforinwirkung sind bisher nicht bekannt und werden diskutiert. Ursprünglich wurde angenommen, dass Perforin entweder Zellmembrankanäle ausbildet, durch welche die Granzyme direkt ins Zytosol gelangen oder durch Bildung von Poly-Perforin-Poren direkt zur Lyse der Zelle führt (Tschopp et al. 1986, Sauer et al. 1991, Shiver et al. 1991, Nakajima et al. 1995, Cullen et al. 2008). Andere Studien diskutieren, ob Perforin für die intrazelluläre Freisetzung der Granzyme aus Endosomen, in denen sie nach Zelleintritt zunächst gespeichert werden, verantwortlich ist (Froelich et al 1996, Browne et al. 1999). Beide Theorien werden widersprüchlich diskutiert und der genaue

Mechanismus bleibt weiterhin unbekannt. Diverse Studien belegen die Aufnahme von Granzymen in Targetzellen in Abwesenheit von Perforin (Froelich et al 1996, Trapani et al. 1996, Pinkoski et al. 1998), was gegen die Theorie der direkten zytosolischen Aufnahme von Granzymen über Perforin-abhängige Poren spricht. Die These, dass GrB Perforin-unabhängig über einen Mannose-6-Phosphat-Rezeptor aufgenommen wird (Motyka et al. 2000), wurde mehrfach durch andere Studien bestritten (Trapani et al. 2003, Dressel et al. 2004). Viele Studien belegen eine Perforin-Abhängigkeit der Granula-vermittelten Apoptoseinduktion (Kagi et al. 1994, Lowin et al. 1994). Neuere Erkenntnisse lassen vermuten, dass es auch eine Perforin-unabhängige Initiierung des Zelltodes über den Granula-Exozytoseweg gibt (Zou et al. 2006, Pardo et al. 2007). Die meisten Studien untersuchten die Funktion von Perforin in vitro und nutzten eine sublytische Perforinkonzentration. Die Perforinkonzentration von Effektorzellen in vivo ist weitestgehend unbekannt und die Konzentration von Perforin in der immunologischen Synapse ist möglicherweise viel höher, als die in den meisten Studien verwendete Konzentration. In vivo mag daher der Perforinspiegel für die Bildung von Poren in der Zellmembran von Zielzellen ausreichend sein (Cullen et al. 2008, Russel et al. 2002).

1.4 Zielsetzung

Plasmazytoide Dendritische Zellen bilden eine Subpopulation Dendritischer Zellen und können verschiedene Funktionen ausüben. So induzieren CpG-A Oligonukleotide eine INF- α -Synthese und antivirale Eigenschaften von pDCs, während CpG-B Oligonukleotide die Ausreifung und somit T-Zellstimulatorische Eigenschaften der pDCs stärken. Außerdem wird eine immunsuppressive Wirkung der pDCs ähnlich regulatorischen T-Zellen diskutiert. Die bereits nachgewiesene Granzym B-Expression könnte im Zusammenhang mit einer Immuntoleranz-vermittelnden Funktion der pDCs stehen und eine Elimination autologer aktivierter T-Zellen oder anderer autoreaktiver Zellen induzieren. Die konkrete Bedeutung der Granzym B Expression für die Funktion der pDCs ist bislang unbekannt.

In dieser Arbeit soll die Expression von zytotoxischen Proteinen der Granzym-Familie und von Perforin in humanen pDCs und mDCs umfangreich untersucht werden. Dazu soll zunächst die Expression von verschiedenen Granzymen und Perforin auf Proteinebene mittels Durchflusszytometrie in pDCs und mDCs analysiert werden. Die gewonnenen Ergebnisse auf Proteinebene sollen anschließend mittels einer PCR auf mRNA-Ebene überprüft werden.

Darüber hinaus soll eine Immunfluoreszenzmikroskopie Erkenntnisse über die intrazelluläre Lokalisation von zytotoxischen Proteinen in humanen pDCs liefern.

Weiterhin soll der Einfluss verschiedener pDC-Liganden auf die Expression von Granzym B in pDCs analysiert werden. Dazu sollen pDCs mit verschiedenen Toll-like-Rezeptor-Liganden und Zytokinen stimuliert und anschließend mittels Durchflusszytometrie und ELISA-Technik auf Granzym B untersucht werden.

Um die Funktionalität der Granzym B-Expression in pDCs zu analysieren, soll durch ein durchflusszytometrisches Zytotoxizitätsassay geprüft werden, ob pDCs dazu in der Lage sind, den Zelltod in Granzym B-sensitiven K562-Zellen zu induzieren.

2 Material und Methoden

2.1 Material und Reagenzien

2.1.1 Geräte

Brutschrank

- HeraCell 150, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Langenselbold

Zytospin

- Shandon Zentrifuge Zytospin 3, Block Scientific, NY, USA

Durchflusszytometrie

- Durchflusszytometer FACSCalibur mit Software CellQuest Pro, BD, Heidelberg und PC PowerMAC G4, Apple, USA

Elektrophoreseapparatur

- Wide Mini Sub Cell GT, Bio Rad, München
- Power Pac300, Bio Rad, München

ELISA

- ELISA-Reader, Anthos HTIII mit Software WinRead 2.3, Anthos Labtec Instruments GmbH, Wals, A

Geldokumentation

- Gel Doc 1000 und Software Molecular Analyst 1.4, Bio Rad Laboratories GmbH, München

Magnetische Zellseparation

- AutoMACS Separator, Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach

Mikroskopie

- Durchlichtmikroskop, Carl-Zeiss, Jena

- Durchlichtmikroskop, Leica DM4000, Wetzlar
- Neubauer-Zählkammer, Roth, Karlsruhe
- Objektträger, Engelbrecht Medizin-und Labortechnik GmbH, Edermünde

Pipetten

- Kolbenhubpipetten Eppendorf Research, verschiedene Volumina, Eppendorf AG, Hamburg
- 8-Kanal-Pipetten Eppendorf Research, Eppendorf AG, Hamburg
- Pipettierhilfe Easypet, Eppendorf AG, Hamburg

Schüttler

- Vortex- Mixer VM-300, Neolab Migge, Heidelberg
- Vortex-Genie 1, Touch Mixer, Scientific Industries Inc., Bohemia, N.Y., USA
- Rocky 3D, Fröbel Labortechnik GmbH, Lindau

Thermocycler

- Eppendorf Gradient, Eppendorf, Hamburg

Waagen

- LC2200 S und analytic, Sartorius, Göttingen

Zentrifugation

- Kühlzentrifuge Labofuge 400R mit den Rotoren 3325B, 8177, 8179 und den Einsätzen 8172, Heraeus, Kendro Laboratory Products, Osterode
- Universal 320R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Blutabnahme

- Butterfly-Venenpunktionssystem BD-Valu-Set, BD Infusion Therapy, Becton Dickinson, Heidelberg
- Fistula Nadel Diacan, B. Braun Medizintechnologie GmbH, Melsungen
- EDTA-Monovetten 9 ml, Sarstedt AG, Nümbrecht
- Multiadapter, Sarstedt AG, Nümbrecht
- Perfusionsbesteck, BD-Value-Set, Becton Dickinson, Heidelberg

Zytospin

- Shandon Filter Cards, Thermo Corporation, Pennsylvania, USA

Durchflusszytometrie

- FACS-Röhrchen (PS-Röhrchen), 0,6ml, Greiner Bio-One, Frickenhausen
- FACS-Röhrchen (BD Falcon) 5 ml, BD Biosciences, Heidelberg

ELISA

- 96-well U-bottom Platten, high binding, Greiner Bio-One, Frickenhausen

Magnetische Zellseparation

- Filter:
 - o Acrodisc Syringe Filters, Pall Corporation, Ann Arbor, USA
 - o Dualex Ultra, 0,22 µm Filter Unit, Millipore, Carrigtwohill, Ireland
- Magnetsäulen (autoMACS Separating Columns), Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Pipetten

- 25 ml Einmalpipetten, Greiner Bio-One, Frickenhausen
- Pipettenspitzen Ep-T.I.P.S., verschiedene Volumina, Eppendorf AG, Hamburg
- Pipettenspitzen Safeseal Premium, verschiedene Volumina, Biozym Scientific GmbH, Hess. Oldendorf

Reaktionsgefäße

- 1,5ml und 2,0 ml, Sarstedt, Nümbrecht
- 15 ml und 50 ml Tubes, Greiner Bio-One, Frickenhausen
- 96-well Mikrotiterplatten, Pharmacia Diagnostics, Freiburg
- 24-well, 12-well und 8-well Zellkulturplatten, BD Falcon, Heidelberg

Sonstige Verbrauchsmaterialien

- Laborfolie Parafilm „M“, Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
- Klebeband, Rexam Medical Packaging, London
- Alufolie
- Autoklavier-Klebeband
- Einweghandschuhe

2.1.3 Chemikalien, Lösungen, Zellen und sonstige Reagenzien

Applichem, Darmstadt

Casein, TAE- Puffer (50 x)

Beckman Coulter, Krefeld

7-AAD

BD Biosciences, Heidelberg

FACS Lysing Solution (10×), gelagert bei 4° C, FACS-Flow, -Rinse, -Clean, Träger- und Reinigungsflüssigkeiten für die Durchflusszytometrie

Biochrom AG, Berlin

Biocoll, Penicillin/Streptomycin-Mix , 10.000 IE/ 10.000 µg/µl, Fetal Calf Serum FCS, gelagert bei -20 °C

Biozym, Hessisch Oldendorf

Agarose

DSMZ, Braunschweig

K562-Zellen

Eppendorf, Hamburg

Biology Grade Water, hochreines Wasser

Fluka, Taufkirchen

Kaliumdihydrogencitrat, Natriumchlorid, Saponin

ImmunoTools, Friesoythe

GrB-ELISA

Invitrogen GmbH, Karlsruhe

FCS, D-PBS Puffer (phosphate-buffered saline), gelagert bei 4° C, RPMI-1640 + L-Glutamin, CFSE Cell Kit (CFSE, DMSO), TRIzol Reagent

MBI Fermentas, St. Leon-Rot

100 bp Leiter, Loading Dye

Merck KGaA, Darmstadt

Aceton, Di-Natriumhydrogenphosphat, Ethanol, Isopropanol, Kaliumchlorid, Kaliumhydrogenphosphat, Kaliumhydroxid, Natriumazid (NaN₃), Schwefelsäure 2M, Saponin, Türk'sche Lösung zur Leukozytenzählung

Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach

Plasmazytoid Dendritic Cell Isolation Kit

Qiagen, Hilden

HotStarTaq *Plus* Master Mix Kit, Omniscript reverse Transcription Kit, Random Hexamer Primer

Roth, Karlsruhe

DAPI, Ethidiumbromid, Tween 20

Sanquin, Amsterdam

HPE-Puffer (5× Konzentrat), Mausserum, Rinderserum

Serotec, Düsseldorf

Mausserum

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

BSA, Trypanblaulösung zur Leukozytenzählung, Saponin, Natriumazid (NaN₃), Mercaptoethanol, Paraformaldehyd

2.1.4 Antikörper, Stimulanzen und Inhibitoren

Stimulanzen

- IL3, ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
- PGE₂, Sigma- Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
- TLR-agonisten
 - Ultra-pure *Escheria coli* K 12 LPS, InvivoGen, San Diego, USA
 - Imiquimod, InvivoGen, San Diego, USA
 - ODN2006-G5, InvivoGen, San Diego, USA
 - ODN2216, InvivoGen, San Diego, USA

- Zytokine
 - GM-CSF, ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
 - IL- 1 β , ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
 - IL-6, ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
 - TNF- α , ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
 - IL-4, ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland
 - TSLP, RD Systems, Minneapolis, USA
 - IFN- γ , ImmunoTools, Friesoythe, Deutschland

Inhibitoren

- EGTA, Calbiochem, Darmstadt
- z-AAD-cmk, Calbiochem, Darmstadt
- z-VAD-fmk, Calbiochem, Darmstadt

2.1.5 Antikörper

Tabelle 2-1 Antikörper gegen Oberflächenantigene und intrazelluläre Antigene sowie ELISA- Antikörper:. In dieser Arbeit verwendete Antikörper sind mit Klonbezeichnung, Isotyp und Markierung bezeichnet, wie sie vom Hersteller bezogen wurden.

	Antigen	Marker	Isotyp	Klon	Firma
Lineage cocktail:	CD3	FITC	IgG1	SK7	BD Biosciences, Heidelberg
	CD14	FITC	IgG2b	MΦP9	BD Biosciences, Heidelberg
	CD16	FITC	IgG1	3G8	BD Biosciences, Heidelberg
	CD19	FITC	IgG1	SJ25C1	BD Biosciences, Heidelberg
	CD20	FITC	IgG1	L27	BD Biosciences, Heidelberg
	CD56	FITC	IgG2b	NCAM16.2	BD Biosciences; Heidelberg

Material und Methoden

Tabelle 2-2 Antikörper gegen Oberflächenantigene und intrazelluläre Antigene sowie ELISA- Antikörper: In dieser Arbeit verwendete Antikörper sind mit Klonbezeichnung, Isotyp und Markierung bezeichnet, wie sie vom Hersteller bezogen wurden.

weitere Antikörper:	CD11c	APC	IgG2b	S-HCL-3	BD Biosciences, Heidelberg
	CD63	PE	IgG1	H5C6	BD Biosciences, Heidelberg
	BDCA-2	APC	IgG1	AC144	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
	CD123	APC	IgG2a	AC145	Miltenyi Biotec GmbH, Bergisch Gladbach
	HLA-DR	PerCP	IgG2a	L243	BD Biosciences, Heidelberg
	Isotypkontrolle	PE	IgG1	X40	BD Biosciences, Heidelberg
	Isotypkontrolle	PE	IgG1	CB9	BD Biosciences, Heidelberg
	Isotypkontrolle	FITC	IgG1	203	ImmunoTools, Friesoythe
	Isotypkontrolle	PE	IgG2b	27-35	BD Biosciences, Heidelberg
	Isotypkontrolle	Biotin	IgG1	n.b.	Caltag Laboratories, Buckingham
	Granzym A	PE	IgG1	CB9	BD Biosciences, Heidelberg
	Granzym B	PE	IgG1	GB11	ImmunoTools, Friesoythe
	Granzym B	FITC	IgG1	HC4	ImmunoTools, Friesoythe
	Granzym K	PE	IgG2b	24C3	Genovac, Freiburg
	Perforin	PE	IgG2b	δG9	BD Biosciences, Heidelberg
	Anti-Maus(FITC)	Alexa488	n.b	n.b	Invitrogen GmbH, Karlsruhe
ELISA- Ak:	Granzym B	Biotin	IgG1	GB10	ImmunoTools, Friesoythe
	Granzym B		IgG1	GB11	ImmunoTools, Friesoythe
Sekundär-	Streptavidin	PE			ImmunoTools, Friesoythe
	Streptavidin-Poly- HRP-Konjugat,				Sanquin Blood Supply Foundation, Amsterdam

2.2 Puffer, Kulturmedien und Lösungen

2.2.1 Zellisolation, Zellkultur und Zellyse

Kulturmedium: RPMI-1640 + L-Glutamin + 10% FCS_{inakt.} (v/v) + Penicillin (10 U/ml) + Streptomycin (100 µg/ml).

Kulturmedium für K562-Zellen:

RPMI-1640 + L-Glutamin + 2% FCS_{inakt.} (v/v) + Penicillin (10 U/ml) + Streptomycin (100 µg/ml) + 50 µM Mercaptoethanol

Stammlösungen: 10% BSA (steril filtriert in PBS)

PBS/0,1% BSA

5 mM CFSE in DMSO

Waschpuffer: PBS + 2% FCS_{inakt.} (v/v)

Zellseparationsmedium: Biocoll

Lysepuffer: 50 mM Tris/HCL, 150 mM NaCl, 1% NP-40 (v/v), pH 8

Durchflusszytometrie

Erythrozyten-Lysispuffer: 10 × Lysing Solution mit H₂O_{deion.} Auf 1fache Konzentration verdünnt.

Waschpuffer: D-PBS + 2% FCS_{inakt.} (v/v) + 0,1 NaN₃ (w/v)

Fixativ: 4% Paraformaldehyd (w/v) in PBS

Permeabilisierungspuffer: 0,1% Saponin (w/v) in Waschpuffer

2.2.2 Magnetische Zellseparation

Laufpuffer: D-PBS + 2 mM EDTA + FCS 1%

Spülpuffer: D-PBS + 2 mM EDTA

Ethanol (70%ig): 700 ml Ethanol (96 %) + 300ml H₂O_{deion.}

2.2.3 Sandwich-ELISA

<u>10 × PBS Stammlösung:</u>	NaCl	80,0 g
	KCL	2,0g
	KH ₂ PO ₄ ×2 H ₂ O	14,4 g
	H ₂ O _{deion.}	ad 1000 ml
	pH	7,3

Bindungspuffer: 1 × PBS, pH 7,3

Blockpuffer 1: 1 × PBS + 2% BSA (w/v)

Waschpuffer: 1 × PBS + 0,05% Tween 20 (v/v)

Puffer 1: 1 × HPE-Puffer

Puffer 2: 1 × HPE-Puffer

1% Mausserum (v/v)

1% Rinderserum (v/v)

Material und Methoden

Substratpuffer (Lösung A): Kaliumdihydrogencitrat 30 mM,
pH 4,1 mit KOH eingestellt

<u>Substratstammlösung (Lösung B):</u>	Ethanol (96%)	45ml
	Aceton	5ml
	TMB	120 mg
	H ₂ O ₂ (30%ig)	100 µl

Lösung B wurde bei 2-8° C im Dunkeln gelagert.

<u>Substratgebrauchslösung (Lösung C):</u>	Lösung A	10 ml
	Lösung B	0,5 ml

Lösung C wurde kurz vor Gebrauch frisch angesetzt.

<u>Stopplösung:</u>	H ₂ SO ₄	2 M
---------------------	--------------------------------	-----

2.2.4 Zytotoxizitätsassay

<u>Permeabilisierungspuffer:</u>	1 × PBS + 1% BSA + 0,5% Tween20
	0,1% Saponin
	4% Paraform

2.2.5 Agarosegelelektrophorese

<u>1 x TAE-Puffer:</u>	50 x TAE-Pufferkonzentrat mit H ₂ O _{deion.} verdünnt.
<u>Ethidiumbromidlsg.:</u>	0,5 µg/ml in 1 x TAE-Puffer

2.3 Isolierung, Differenzierung und Kultivierung von Zellen

2.3.1 Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation

Humanes Vollblut enthält verschiedene Zelltypen: Erythrozyten, Lymphozyten, Monozyten, myeloide und plasmazytoide Dendritische Zellen, sowie neutrophile, eosinophile und basophile Granulozyten. Lymphozyten und Monozyten werden zu den mononukleären Zellen (MNCs) zusammengefasst. Myeloide und plasmazytoide DCs werden als Subpopulationen Dendritischer Zellen in die MNCs eingeordnet. Die verschiedenen Blutzellpopulationen weisen eine unterschiedliche Dichte auf, die genutzt werden kann, um sie von den restlichen Blutbestandteilen mittels einer Dichtegradientenzentrifugation zu trennen.

Für die Isolation von MNCs wurde gesunden Normalpersonen peripheres Blut aus einer punktierten Armvene in EDTA-Monovetten abgenommen. Im Falle einer folgenden Immunmagnetischen Separation, für die größere Blutmengen notwendig waren, wurde Probanden peripheres Blut in mit Heparin gefüllten Perfusorspritzen entnommen. Das venöse Blut wurde mit PBS in einem Verhältnis von 1:2 verdünnt. Sterile 50 ml Reaktionsgefäße wurden mit je 15 ml des Trennmediums Ficoll ($d = 1,077 \text{ g/ml}$) gefüllt und anschließend vorsichtig mit dem verdünnten, antikoagulierten Blut überschichtet. Eine 25minütige Zentrifugation (600g, 8°C, ohne Bremse) verhalf zu einer beschleunigten und verbesserten Auftrennung der Blutbestandteile über den Ficolldichtegradienten. Blutbestandteile mit einer größeren Dichte als das Ficoll, wie Erythrozyten, neutrophile und eosinophile Granulozyten sedimentieren. Die zu isolierenden MNCs (enthalten mDCs und pDCs) weisen eine geringere Dichte auf und finden sich somit in einer trüben Interphase (Abb.2-1) zwischen Ficoll und Plasma wieder. Thrombozyten verbleiben im Plasmaüberstand, da Sie aufgrund ihres kleinen Volumens nur langsam sedimentieren (Luttmann, 2004). Das Plasma wurde vorsichtig bis kurz oberhalb der obersten Phasengrenze abgenommen und verworfen. Danach wurden die MNCs mittels Pipette abgesaugt und in ein frisches Reaktionsgefäß überführt. Nach zwei folgenden Waschschritten mit PBS (Zentrifugation: 10 min, 400g, 8°C), wurde das Zellpellet (MNCs) in 1ml Waschpuffer resuspendiert. Es folgte die Bestimmung der Zellzahl nach 2.3.3..

Bei dieser Separationsmethode ist eine Verunreinigung der MNCs mit basophilen Granulozyten und einigen Thrombozyten nicht zu verhindern (Luttmann et al., 2004). Diese Kontamination war für die Folgeanwendungen jedoch nicht von Bedeutung.

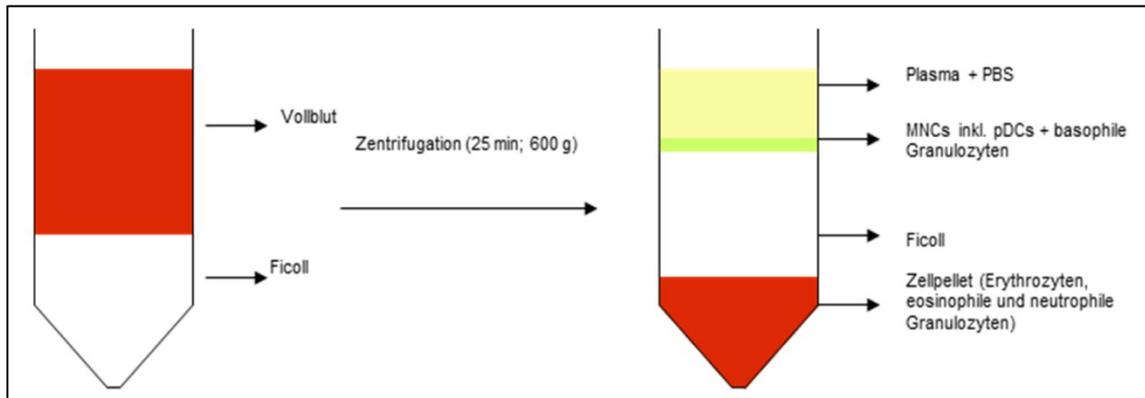


Abb. 2-1 Isolierung mononukleärer Zellen mittels Dichtegradientenzentrifugation. Links: Vollblut geschichtet auf Ficoll, vor der Zentrifugation. Rechts: Verteilung der Blutzellen nach Zentrifugation. Die MNCs (inkl. pDCs) verbleiben aufgrund ihrer geringeren Dichte gegenüber Ficoll, in einer trüben Interphase (grün). Diese kann entnommen und weiter verarbeitet werden.

2.3.2 Immunmagnetische Separation von plasmazytoiden Dendritischen Zellen

PDCs gehören zu den mononukleären Zellen und können anhand der Expression charakteristischer Oberflächenmoleküle identifiziert werden (HLA-DR⁺, CD123⁺, BDCA-2⁺, BDCA-4⁺, Lineage⁻, CD11c⁻). Die automatische immunmagnetische Separation (autoMACS) nutzt das Prinzip der Markierung von zellspezifischen Oberflächenmolekülen durch Magnetbead-gekoppelte Antikörper. Positiv- und Negativsektionen werden durch Antikörpermarkierung der relevanten bzw. sämtlicher irrelevanten Zellen ermöglicht. Die Zellsuspension wird über eine ferromagnetische Säule geleitet, die sich in einem Magnetfeld befindet. Somit werden nur die magnetisch markierten Zellen im Magnetfeld zurück gehalten und erst eluiert, wenn das Magnetfeld ausgeschaltet wird (Abb.2-2). Da diese Methode eine Reinheit und Zellausbeute von über 90% ermöglicht, eignet sie sich besonders, um die kleine Zellpopulation der pDCs zu isolieren (Luttmann, 2004). Um eine Zahl von circa 10⁶ pDCs aus peripherem, venösem Blut zu isolieren, wurden gesunden Normalpersonen 250-300ml Blut entnommen. Daraus wurden, wie in 2.3.1 beschrieben, die MNCs isoliert. Es wurde zunächst eine immunmagnetische Negativsektion durchgeführt. Hierzu wurden die MNCs in Laufpuffer gewaschen (Zentrifugation bei 400g, 8°C und Verwerfen des Überstandes) und anschließend mit einem non-pDC Biotin-Antikörper Cocktail (100 µl pro 10⁸ Zellen) für 10 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach zwei weiteren Waschschritten (Laufpuffer) wurde die Zellsuspension mit Anti-Biotin MicroBeads (100 µl pro 10⁸ Zellen) inkubiert (15 min, 4°C). Es folgten zwei Waschschrritte in Laufpuffer, daraufhin wurden die Zellen in einem Volumen von 500 µl Laufpuffer pro 10⁸ Zellen aufgenommen und mittels AutoMACS negativ selektiert. Das Eluat wurde gewaschen und die Zellzahl erneut bestimmt. Für eine sich anschließende

Positivselektion wurde die Zellsuspension mit einem für pDC spezifischen Magnetbead-gekoppeltem anti-CD304 (BDCA-4) Antikörper inkubiert (100 μ l pro 10^8 Zellen, 15 min, 4°C). Nach einem weiteren Waschschrift in Laufpuffer, folgte die Positivselektion. Die selektierten pDC wurden gewaschen, angefärbt und gezählt, wie in 2.3.3. beschrieben. Anschließend wurde eine Reinheitskontrolle mittels Durchflusszytometrie durchgeführt. Es ergaben sich Reinheiten von > 97%.

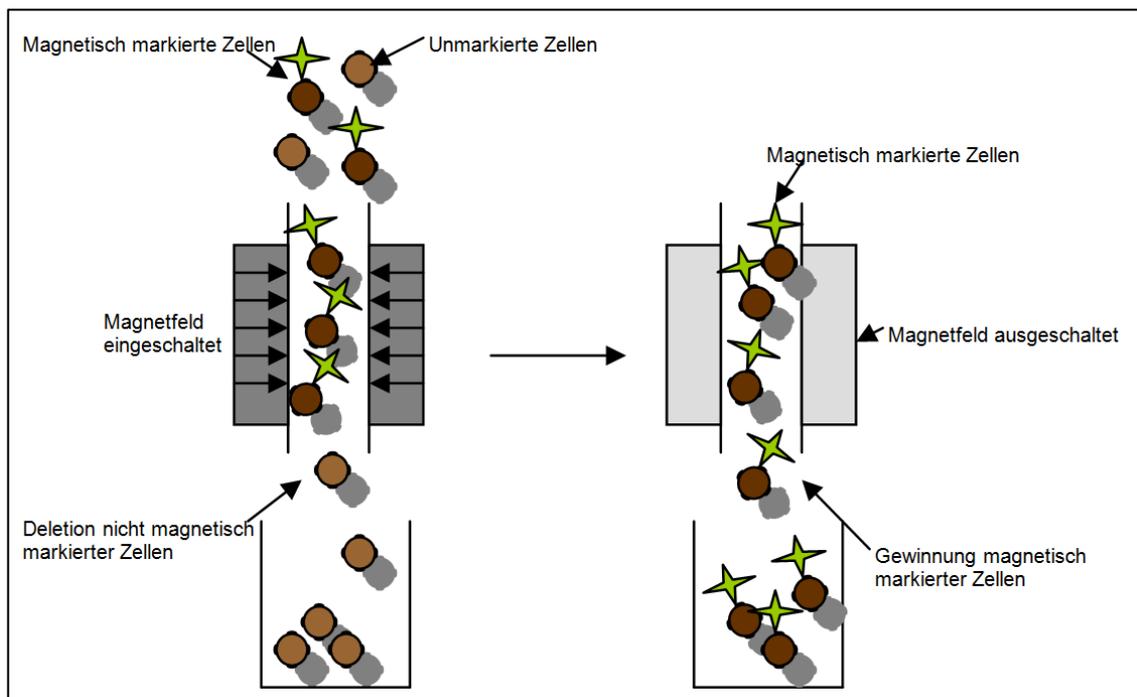


Abb. 2-2 Automatische Magnetische Separation von Zellen (autoMACS). Links: Magnetbead-AK markierte Zellen werden in dem eingeschalteten Magnetfeld zurück gehalten, nicht markierte Zellen können somit in einem Auffang-Gefäß gesammelt werden. Rechts: Das Magnetfeld wird anschließend entfernt. So können magnetisch markierte Zellen in einem zweiten Schritt mittels Puffer aus der Säule eluiert werden.

2.3.3 Anfärben der Zellen mittels Türk'scher Lösung

Für die Zellzahlbestimmung wurde eine Zellkernanfärbung mittels Türk'scher Lösung durchgeführt. Dazu wurde eine 1/10 Vol. Zellsuspension mit 9/10 Vol. Türk'scher Lösung bei Raumtemperatur für 5 Minuten inkubiert. Anschließend wurden 10 μ l der gut durchmischten Verdünnung mittels Pipette in eine Neubauer-Zählkammer gegeben. Die Auszählung der Zellen erfolgte sofort bei 200-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop. Dabei wurden mindestens vier Großquadrate der Zählkammer ausgezählt. Anschließend wurde die Zellzahl errechnet. (Mittelwert der Zellsumme bei Auszählung von vier Großquadraten $\times 10^5$).

2.3.4 Kultivierung von MNCs

Um die Granzym B-Expression von pDCs innerhalb einer MNC-Kultur, in Abhängigkeit von verschiedenen Stimulanzien zu untersuchen, wurden isolierte MNCs mit den Agenzien LPS, Imiquimod, IL-3, ODN2216, ODN2006-G, GM-CSF, IL-1 β , IL-6, TNF- α , IL-4, TSLP und IFN- γ stimuliert. Wie in 2.3.1 beschrieben, wurden MNCs aus peripherem Blut gesunder Normalprobanden isoliert. Die Zellen wurden mit Kulturmedium (2.2) auf eine Konzentration von 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. Den Ansätzen wurde LPS (10 μ g/ml), Imiquimod (5 μ g/ml), IL-3 (5 ng/ml), ODN2216 (1 μ M), ODN2006-G (1 μ M), GM-CSF (1000 U/ml), IL-1 β (10 ng/ml), IL-6 (1000 U/ml), TNF- α (500 U/ml), IL-4 (10 ng/ml), TSLP (10 ng/ml) oder IFN- γ (10 ng/ml) zugesetzt. Die Inkubation erfolgte in einem Brutschrank für 20 Stunden bei 37 °C. Anschließend wurden die Zellen geerntet, mit 10 ml Waschpuffer (2.2) verdünnt und abzentrifugiert (400 g, 5 min, 10 °C). Zur Vorbereitung der durchflusszytometrischen Messung wurde eine Antikörpermarkierung nach 2.4.1 durchgeführt.

2.3.5 Kultivierung von pDCs

Mittels Magnetischer Immunseparation wurden pDCs aus frisch isolierten MNCs selektiert (2.3.2). Nach Bestimmung der Zellzahl wurden die pDCs mit Kulturmedium (2.2) auf eine Konzentration von $1-2 \times 10^6$ Zellen/ml eingestellt. Folgend wurde die Kultur mit IL-3 (10 ng/ml) stimuliert und für 16 Stunden bei 37 °C inkubiert. Einigen Ansätzen wurde zuvor Imiquimod (5 μ g/ml), ODN2006-G (1 μ M), ODN2216 (1 μ M) oder LPS (10 μ g/ml) hinzugefügt (Kap2.14). Anschließend wurden die Zellen geerntet und nach 2.4.2 für eine quantitative Granzym B-Messung mittels ELISA aufbereitet.

2.3.6 Kultivierung der Zelllinie K562

Die zytotoxische Wirkung der pDCs wurde an der Granzym B-sensitiven Zelllinie K562 getestet. K562-Zellen wurden in steril angefertigtem Kulturmedium (2.2) bei 37 °C in einem Brutschrank kultiviert. Unter dem Mikroskop wurde die Zellkultur täglich beurteilt, um den optimalen Zeitpunkt des Kulturmediumwechsels und der Kulturverdünnung mit frischem Kulturmedium (2.2) zu ermitteln. Zu gegebener Zeit wurden die K562-Zellen geerntet und abzentrifugiert (200g, 5 Min., 30 °C). Anschließend wurden die Zellen zunächst in 500 μ l Kulturmedium resuspendiert und dann ebenfalls mit Kulturmedium in einem Verhältnis von 1:5 in ein neues Kulturgefäß gegeben. K562-Zellen die für das Zytotoxizitätsassay (2.4.4) benötigt wurden, konnten vor der Befüllung der neuen Kulturgefäße in den benötigten Mengen abgenommen werden.

2.4 Immunologische Methoden

2.4.1 Durchflusszytometrie

2.4.1.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie zeichnet sich gegenüber anderen Methoden der Zellcharakterisierung durch die gleichzeitige Registrierung von verschiedenen Zellparametern sowie einem hohen Durchsatz an Zellen in kurzer Zeit aus. Zellpopulationen können anhand ihrer Zellgröße, Struktur sowie intrazellulärer Zusammensetzung analysiert werden. Ebenso lassen sich nach entsprechender Markierung mit Fluoreszenzfarbstoffen spezifische Oberflächenstrukturen und intrazelluläre Moleküle nachweisen. Bei der Untersuchung werden die Zellen einzeln in einem laminaren Strom an einem Laserstrahl vorbei geleitet. Durch die Registrierung von Vorwärtsstreulicht (Forwardscatter) und in einem 90°-Winkel abgelenktem Seitwärtsstreulicht (Sidescatter), werden Zellgröße und Granularität analysiert. Anhand dieser beiden Parameter können Leukozyten in Lymphozyten, Monozyten und Granulozyten differenziert werden. Weiterhin können verschiedene membranständige sowie intrazelluläre Strukturen mittels fluoreszenzgekoppelter Antikörper markiert werden. Die durch den Argonionenlaserstrahl (488nm) bzw. Helium-Neon-Laser (633 nm) angeregten Fluorochrome emittieren Licht verschiedener Wellenlängen, das durch Photodetektoren registriert wird. In dieser Arbeit wurden die Fluoreszenzfarbstoffe Fluoresceinisothiocyanat (FITC), Phycoerythrin (PE), Allophycocyanin (APC) und Peridin Chlorophyll Protein (PerCP) verwendet (Tab. 2-3).

Tabelle 2-3 Fluorochrome

Fluorochrom	Absorptionsmaximum	Emmissionsmaximum	Anregungswellenlänge
APC	650 nm	660 nm	633 nm
FITC	495 nm	519 nm	488 nm
PE	480 nm, 565 nm	578 nm	488 nm
PerCP	482 nm	678 nm	488 nm

Die Detektion von Antigenen durch die gleichzeitige Verwendung mehrerer fluoreszenzgekoppelter Antikörper ermöglicht somit die Zelltypisierung innerhalb der untersuchten Population. Mit Hilfe der Mess-Software werden Überlappungen der Emissionsspektren kompensiert.

2.4.1.2 *Aufbereitung der pDCS und mDCs für die FACS-Analyse:*

In dieser Arbeit wurden pDCS und mDCs mittels Durchflusszytometrie innerhalb des Vollblutes bzw. MNCs detektiert. pDCs und mDCS können anhand der Expression spezifischer Oberflächenmoleküle identifiziert werden (Tab.2-1) Die Oberflächenmoleküle wurden durch indirekte Markierung mit FITC-, PerCP- und APC- konjugierten Antikörpern dargestellt (Tab.2-1)

Tabelle 2-4 Charakterisierung der mDCs und pDCs anhand ihrer Oberflächenantigenexpression.

Zellpopulation	Oberflächenantigene
plasmazytoide Dendritische Zellen (pDC)	Lineage negativ (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56), HLA-DR ⁺ , BDCA2 ⁺
myeloide Dendritische Zelle (mDC)	Lineage negativ (CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD56), HLA-DR ⁺ , CD11c ⁺

In den mDCs und pDCs wurden intrazellulär Granzym A, B, K und Perforin mittels PE-konjugierten Antikörpern markiert. Zu jeder DC-Subpopulation kam je eine Isotypkontrolle hinzu, so dass pro Proband zehn Ansätze vorbereitet wurden (Tab.2-5). Die Antikörper gegen Oberflächenmoleküle wurden zunächst mit den Zellen für 20 min. unter Lichtausschluss inkubiert. Um die Blutythrozyten zu entfernen, wurden die Ansätze mit je 1 ml FACS-Lysing Solution (2.2) für 10 min inkubiert. Nach anschließender Zentrifugation (400g, 5 min), wurde der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1 ml Permeabilisierungspuffer resuspendiert und unter Lichtausschluss inkubiert (10 min, 4 °C). Mittels des Permeabilisierungspuffers wurde die Zellmembran für die folgende intrazelluläre Markierung reversibel durchlässig gemacht. Die Zellen wurden abzentrifugiert (400 g, 5 Min.) und in ca. 50 µl Permeabilitätspuffer resuspendiert. Anschließend wurden die Antikörper gegen intrazelluläre Antigene entsprechend Tab. 2-4 hinzugefügt. Es folgte eine erneute Inkubation von 20 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Schließlich wurden die Zellen mit Permeabilisierungspuffer gewaschen, in 150 µl PBS resuspendiert und mit Hilfe des Durchflusszytometers gemessen.

Tabelle 2-5 Ansätze für die durchflusszytometrische Messung. Die mDCs und pDCs wurden anhand der FITC-, PerCP- und APC- konjugierten Antikörper eindeutig identifiziert. Die intrazellulären Zielstrukturen (Granzyme und Perforin) wurden mit PE- markierten Antikörpern detektiert.

	FITC-konjugierter Antikörper	Pe-konjugierter Antikörper	PerCP-konjugierter Antikörper	APC-konjugierter Antikörper
1	Lin 1	IgG1/IgG2b	HLA- DR	CD123
2	Lin 1	Granzyme A	HLA- DR	CD123
3	Lin 1	Granzyme B	HLA- DR	CD123
4	Lin 1	Granzyme K	HLA- DR	CD123
5	Lin 1	Perforin	HLA- DR	CD123
6	Lin 1	IgG1/IgG2b	HLA- DR	CD11c
7	Lin 1	Granzyme A	HLA- DR	CD11c
8	Lin 1	Granzyme B	HLA- DR	CD11c
9	Lin 1	Granzyme K	HLA- DR	CD11c
10	Lin 1	Perforin	HLA- DR	CD11c

2.4.1.3 Die durchflusszytometrische Analyse und Auswertung:

Der Auswertprozess in dieser Arbeit erfolgte wie in Abb.2-3 exemplarisch gezeigt. Zunächst wurden die durchflusszytometrisch erfassten Zellen abhängig von ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) in einem FSC/SSC-Diagramm dargestellt (Abb.2-3A). Anschließend wurde ein Gate um die Lymphozyten-, Monozyten- und Granulozytenwolken bei typischer Granularität und Größe gelegt (Abb.2-3A).

In weiteren Dot-Plots wurden zunächst HLA-DR⁺/Lineage⁻ Zellen über ein Gate selektiert (Abb. 2-3B) und anschließend die DC-Subpopulationen anhand der Fluoreszenzeigenschaften der gekoppelten Antikörper identifiziert. Für die Identifikation von mDCs (Lineage⁻, HLA-DR⁺, CD11c⁺) wurden in einem Dot-Plot CD11c⁺-Zellen sowie HLA-DR⁺/Lineage⁻-Zellen selektiert (Abb.2-3C). Um pDCs (Lineage⁻, HLA-DR⁺, CD123⁺) zu identifizieren wurden die HLA-DR⁺/Lineage⁻ Zellen gegen CD123-APC aufgetragen (Abb.2-3D). In einem Histogramm-Plot wurden die identifizierten DC-Subpopulationen jeweils gegen Granzym A, B, K und Perforin aufgetragen (Abb.2-3 C+D). Das Histogramm ist eine Häufigkeitsverteilung, bei der die Stärke des Fluoreszenzsignales gegen die Anzahl der Ereignisse dargestellt wird. Mittels dieser Analyse konnte eine Aussage über den Anteil der Granzym/Perforin⁺ bzw. Granzym/Perforin⁻ Zellen gemacht werden.

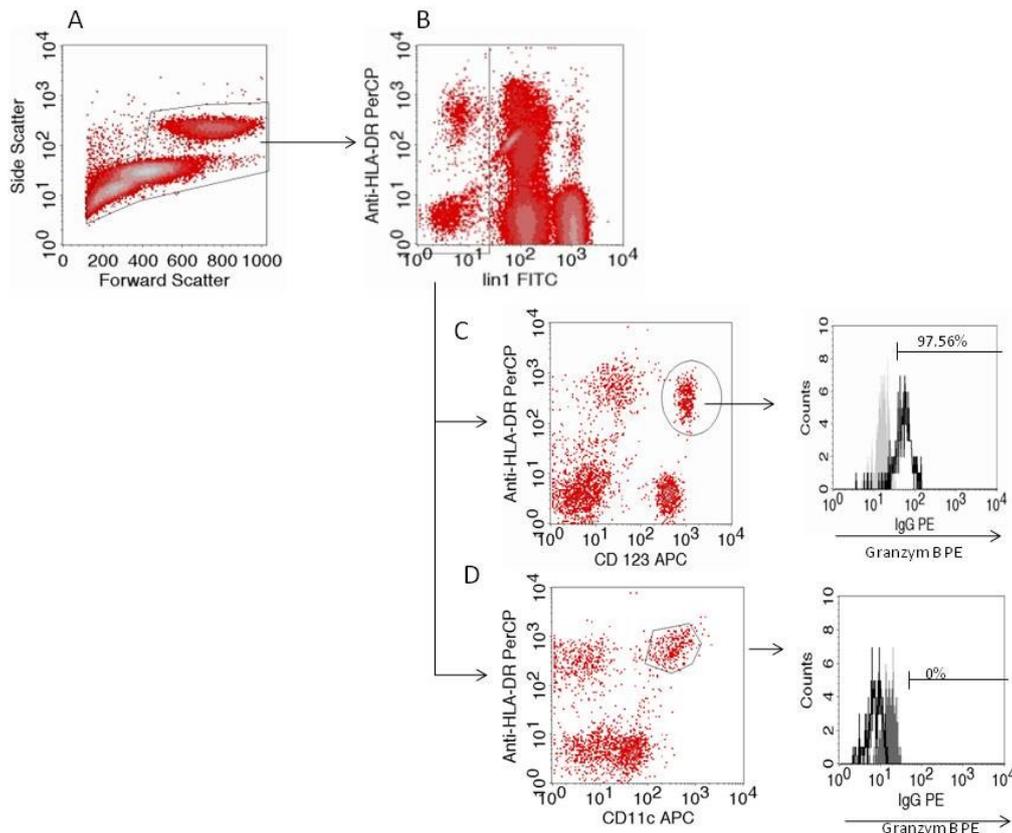


Abb. 2-3 Messstrategie im Beispiel für Granzym B in pDCs. A: Alle gemessenen Zellen wurden anhand ihrer Größe (FSC) und Granularität (SSC) in einem Dot-Plot dargestellt. Das Setzen eines Gates um die Zellwolke, verhindert die Einbeziehung von Zelldetritus in die folgende Auswertung. B-D: Gegenüberstellung von Fluoreszenzen und die durch diese vermittelte Zelleigenschaften im Dot-Plot zur indirekten Identifizierung der DC-Subpopulation. C-D: Identifizierung der DC-Subpopulation sowie Analyse der zytotoxischen Proteine, hier exemplarisch für Granzym B dargestellt. Das Histogramm zeigt die Expression von GrB (schwarz) im Vergleich zu der entsprechenden Isotypkontrolle (grau).

2.4.2 Enzym-Immunoassays (Sandwich-ELISA)

2.4.2.1 *Quantitative Bestimmung von Granzym B mittels Sandwich-ELISA:*

Granzym B wurde in Zelllysaten, sowie Überständen von pDC-Kulturen mit Hilfe eines Sandwich-ELISAs quantifiziert. Das Prinzip des Sandwich-ELISAs basiert auf der Antikörper-Antigen-Reaktion, die einer Gleichgewichtsreaktion nach dem Massenwirkungsgesetz entspricht. Ein monoklonaler, antigenspezifischer Fängerantikörper wird adsorptiv an eine feste Phase (96-well Mikrotiterplatte) gekoppelt (Abb.2-4). Anschließend findet die Detektion des an den Fängerantikörper gebundenen Antigens mittels eines Biotin-markierten zweiten Antikörpers (Detektionsantikörper) statt. Über eine spezifische Bindung von Streptavidin an die Biotin-Moleküle wird das Enzym Meerrettich-Poly-Peroxidase (HRP) an den Detektionsantikörper

gekoppelt (Abb.2-4) Das an den Detektionsantikörper gekoppelte Streptavidin-Poly-HRP-Konjugat setzt ein farbloses Substrat zu einem farbigen Produkt um. So kann die Antigenkonzentration anhand des Substratumsatzes ermittelt werden. Dadurch, dass an einen Antikörper mehrere Biotin-Moleküle gekoppelt werden können, welche wiederum jeweils ein Streptavidin-Poly-HRP- Konjugat binden, wird die Sensitivität der Methode erhöht. In dieser Arbeit wurde das sehr sensitive Tetramethylbenzidin (TMB) zusammen mit H_2O_2 als Substrat für die Meerrettich-Peroxidase (HRP) verwendet. Alle Proben und Standards wurden doppelt bestimmt, um exaktere Ergebnisse zu erzielen.

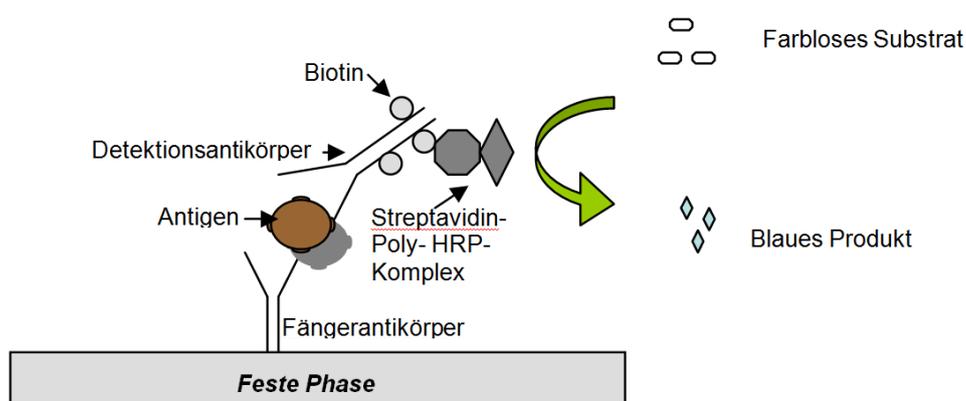


Abb. 2-4 Funktionsprinzip ELISA. Das Antigen bindet über einen Fängerantikörper an die Feste Phase der ELISA-Platte. Ein biotinylierter Detektorantikörper bindet das Antigen. Über eine spezifische Biotin-Streptavidin-Bindung ist das Enzym (HRP) an den Detektionsantikörper gekoppelt. Es erfolgt eine enzymatische Farbreaktion, wodurch das zunächst farblose Substrat in ein blaues Produkt umgewandelt wird.

Die Kavitäten der Mikrotiterplatte wurden mit dem Fängerantikörper (1:100 Verdünnung in Bindungspuffer (2.2), 100 μ l/Kavität) für 16 Stunden bei 2-8 °C beschichtet. Anschließend wurden nicht gebundene Antikörper durch fünfmaliges Waschen mit PBS entfernt. Freie Proteinbindungsstellen wurden durch die Zugabe von 100 μ l Blockpuffer und Inkubation über eine Stunde abgesättigt. Es folgten fünf Waschschrte mit Waschpuffer (2.2) bevor die Proben und die Standards aufgetragen wurden. Die Standards wurden mit Puffer 1 (2.2) angesetzt. Die Proben wurden in verschiedenen Verhältnissen ebenfalls mit Puffer 1 (2.2) verdünnt (Überstände: 1:5, 1:10, 1:50; Lysate: 1:5, 1:50, 1:500). Anschließend fand eine einstündige Inkubation unter leichtem Schütteln statt, der fünf Waschschrte mit Waschpuffer folgten. Es wurden dann je Kavität 100 μ l des biotinylierten Detektionsantikörpers (1:100 in Puffer 2; 2.2) hinzugegeben und unter leichtem Schütteln inkubiert (eine Stunde, Raumtemperatur). Der Puffer 2 enthielt je 1% Maus- und Rinderserum, um unspezifische Bindungen des Detektionsantikörpers zu unterbinden. Ungebundener Detektionsantikörper wurde durch fünfmaliges Waschen mit Waschpuffer entfernt. Anschließend folgte eine 20minütige

Inkubation mit dem Streptavidin-Poly-HRP- Konjugat (1: 5000 in Puffer 1; 100 µl/Kavität) bei Raumtemperatur unter leichtem Schütteln. Nach fünfmaligem Waschen mit Waschpuffer folgte die enzymatische Nachweisreaktion, die durch die Zugabe von Substratlösung C (2.2; 100 µl/Kavität) begonnen wurde. Es wurde im Dunkeln für 10-30 min inkubiert, bis die Standardreihe eine abgestufte Blaufärbung von hell bis dunkel zeigte. Durch Zugabe der Stopplösung (2.2; 100 µl/Kavität) wurde die Enzymreaktion inhibiert. Daraufhin zeigte sich ein Farbumschlag von blau zu gelb. Gemessen wurde die Absorption bei 450 nm und 620 nm als Referenz innerhalb der folgenden 30 Minuten. Die Berechnung der Eichkurven anhand der Standards und die der Antigenkonzentrationen in den Proben wurde mit Hilfe der Software wlogit (www.clb.nl) bzw. WinRead 2.3 durchgeführt. Die verschiedenen Versuchsparameter, wie zum Beispiel die Antikörperkonzentrationen sind in Tab 2-6 aufgeführt.

Tabelle 2-6 Versuchsparameter des Granzym B- ELISA.

	Granzym B
Fängerantikörper, Klon	GB11
Fängerantikörper, Endkonzentration (µg/ml)	2
Detektionsantikörper, Klon	GB10
Detektionsantikörper, Endkonzentration (µg/ml)	1
Streptavidin-Poly-HRP-Konjugat, Endkonzentration (ng/ml)	200
Standard	YT-Indy-Lysat

2.4.2.2 Bestimmung der Nachweisgrenze bei der ELISA-Anwendung

Die niedrigste Antigenkonzentration, die statistisch signifikant von dem Signal des Nullwertes abweicht, ist die Nachweisgrenze. Für jede 96-well Mikrotiterplatte wurde die Nachweisgrenze einzeln bestimmt, indem 10 Kavitäten mit Puffer 1 (2.2) belegt wurden. In diesen 10 Kavitäten - ohne Antigen - wurde anhand der Standardkurve die Antigenkonzentration bestimmt. Aus dem Mittelwert der Adsorptionen, zusätzlich der zweifach addierten Standardabweichung, ließ sich die Nachweisgrenze errechnen. Alle Werte die unterhalb der für die jeweilige Mikrotiterplatte bestimmten Nachweisgrenze lagen, wurden gleich Null gesetzt. Im Mittel entsprach die Nachweisgrenze aller Granzym B-ELISAs einem Wert von 2,7 U/ml.

2.4.3 Zytozentrifugation und intrazelluläre Lokalisation von GrB mittels Fluoreszenzmikroskopie

2.4.3.1 Das Prinzip der Zytozentrifugation (Zytospin):

Die Zytozentrifugation (Zytospin) ermöglicht eine Dünnschichtpräparation von Zellen aus einer flüssigen Matrix. Durch Rotationsvorgänge mit geringen Zentrifugalkräften, wurden pDCs auf einen Objektträger sedimentiert. Bei dieser Methode wird die Integrität der Zellen erhalten und bietet somit eine gute Darstellung der Zellen zur weiteren Analyse unter dem Mikroskop. In dieser Arbeit wurde eine Anfärbung der Zellen mit dem Zellkernfarbstoff DAPI (2.1.3) vorgenommen, um Signale, die sich im Phasenkontrastbild darstellen, als Zellen zu identifizieren. Weiterhin sollte durch die intrazelluläre Markierung des Granulamarkers CD63 mittels eines spezifischen Antikörpers (Tab.2-1) das Vorhandensein von Granula in pDCs überprüft werden. Zusätzlich wurden die pDCs mit Antikörpern gegen Granzym B inkubiert, um die intrazelluläre Verteilung dieses Proteins zu beurteilen.

2.4.3.2 Aufbereitung der pDCs für die mikroskopische Analyse

pDCs wurden isoliert (2.3.2) und für fünf min. in 4% Paraform fixiert. Anschließend wurde die Zellmembran durch eine Behandlung der Zellen mit Permeabilisierungspuffer (2.2) permeabilisiert. Dann wurden die pDCs für 30 min. bei Raumtemperatur mit anti-GrB-FITC, bzw. mit einem FITC-konjugierten Isotypkontrollantikörper inkubiert. Nach einem Waschschrift folgte eine zweite Inkubation der pDCS mit einem Alexa488 konjugierten anti-

mouse Antikörper (15 min., Raumtemperatur). Durch die Zugabe von 20 µl Mausserum, wurden potentielle freie Bindungsstellen des Alexa488-konjugierten Antikörpers blockiert. Anschließend wurden die Markierung der Granula (anti-CD63 PE), sowie die Zellkernanfärbung mit DAPI durchgeführt. Die so behandelten pDCs wurden mit Hilfe der Zytocentrifugation auf Objektträger sedimentiert und standen für die mikroskopische Analyse bereit. Die mikroskopische Untersuchung fand bei 400-facher Vergrößerung unter einem Leica DM4000 Mikroskop statt.

2.4.4 Zytotoxizitätsassay

2.4.4.1 Vorbereitung und durchflusszytometrische Messung des Apoptoseassays:

In dieser Arbeit wurde die zellvermittelte Zytotoxizität der pDCs mittels eines Granzym B-, Caspase-abhängigen Weges untersucht. Als Targetzellen wurde die Granzym B sensitive Zelllinie K562 verwendet. PDCs wurden nach 2.3.2 isoliert und auf eine Zellzahl von 10^6 /ml mit Medium eingestellt. Anschließend wurden die pDCs mit IL-3 in einer Endkonzentration von 10 ng/ml kultiviert. Nach 20 stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet und erneut gezählt. Inzwischen wurde ein Teil der K562- Zellen der Kultur entnommen. Die K562-Zellen wurden in Medium gewaschen (5 min., 200g, 25⁰ C) und anschließend auf eine Zellzahl von 10^6 /ml mit PBS/0,1% BSA eingestellt. Es folgte eine Markierung der Zellen mit CFSE. CFSE ist ein passiv in die Zelle diffundierendes, farbloses Substrat, welches durch intrazelluläre Esterasen fluoreszierende Konjugate bildet. Die Zellen wurden mit CFSE (Endkonzentration 0,125 µM) für 10 Minuten (37 °C) inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von eiskaltem Kulturmedium gestoppt. Es folgten drei Waschschrte mit jeweils frischem Kulturmedium. Je Ansatz wurden 50µl der K562-Zellsuspension (4×10^5 /ml) vorgelegt. Zu einigen Ansätzen wurden jeweils verschiedene Anteile der pDC/IL-3-Suspension hinzugegeben, andere Ansätze wurden als Kontrollen mit Kulturmedium befüllt. Es wurden die verschiedenen Effektor-/Targetzell-Verhältnisse 1:1, 10:1 und 20:1 untersucht. Anschließend wurde Ansätzen mit der E/T ratio 10:1, entweder EGTA (4 mM), Granzym B-Inhibitor (50 µM) oder Caspaseinhibitor (50 µM) entsprechend Tab. 2-7 zugesetzt.

Die Kulturplatten mit den beschriebenen Ansätzen wurden für 6 Stunden bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurde die Vitalitätsfärbung mit 7-Amino-Actinomycin D (7-AAD) durchgeführt. Die Zellsuspension wurde für 15 Minuten mit dem Farbstoff 7-AAD inkubiert. Es schloss sich ein Waschschrift mit Waschpuffer (2.2) an. 7-AAD ist ein Farbstoff, der durch die permeabilisierte Membran apoptotischer und nekrotischer Zellen diffundiert und diese anfärbt. Durch diese Färbemethode lassen sich lebende von toten Zellen unterscheiden. Die K562-Zellen wurden mit Hilfe der Durchflusszytometrie über das CFSE-Signal identifiziert. Der Anteil der toten K562-Zellen konnte über das 7-AAD-Signal ermittelt werden.

Material und Methoden

Tabelle 2-7 Ansätze für das Zytotoxizitätsassay. PDCs und K562-Zellen wurden in einem Effektor-/Target-Verhältnis (E/T ratio) von 10:1 eingesetzt.

Kontrollansatz	K562-Zellen (10⁵/ml) in µl	Medium (µl) + IL-3 (20ng/ml)	pDCs (1x10⁶/ml) in µl + IL3 (20ng/ml)	Zusatz
1	50	50		
2	50	50		
3	50	50		
4	50	50		1 µl EGTA (4 mM)
5	50	50		1 µl EGTA (4 mM)
6	50	50		1 µl AAD (Granzym B-Inhibitor, 50 mM)
7	50	50		1 µl AAD (Granzym B-Inhibitor, 50 mM)
8	50	50		1 µl VAD (Caspaseinhibitor, 50 mM)
9	50	50		1 µl VAD (Caspaseinhibitor, 50 mM)
Zytotoxizitätsassayansatz				
1	50		50	
2	50		50	
3	50		50	1 µl EGTA (4 mM)
4	50		50	1 µl AAD (Granzym B-Inhibitor, 50 mM)
5	50		50	1 µl VAD (Caspaseinhibitor, 50 mM)

2.5 RT-PCR

Mit Hilfe der Reversen Transkription (RT) wurde mRNA in ssDNA umgeschrieben, in dieser Arbeit cDNA (c=copy) genannt. Dafür wurden 5×10^5 pDCs isoliert (2.3.2) und für 4 Stunden mit IL-3 stimuliert. Die Gesamt-RNA wurde durch Zugabe von 1 ml Trizol pro Ansatz (10 min, Raumtemperatur) isoliert. Um die RNA zu extrahieren wurde 0,2 ml Chloroform pro Ansatz zugesetzt und anschließend durch Zentrifugation (10.000 g, 15 min, 4 °C) eine Phasentrennung erzielt. Für die Reverse Transkription wurden das kommerzielle Omniscript reverse Transcription Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) und Random Hexamer Primer verwendet. Das Verfahren wurde nach Protokoll des Herstellers durchgeführt. Anschließend wurden mittels der Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) Granzym/Perforin-spezifische cDNA-Abschnitte mittels spezifischer Primer (Tab.2-8) vervielfältigt.

Die cDNA wurde initial bei 94 °C für 5 min. denaturiert. Darauf folgten 40 Zyklen unter zeitgesteuerten Temperaturwechseln:

1. Denaturierung der cDNA bei 94 °C für 30 s.
2. Primerhybridisierung mit denaturierter cDNA (Annealing) bei 56 °C für 30 s.
3. Elongation bei 72 °C für 30 s.

Zum Schluss erfolgte eine finale Elongation bei 72 °C für 5 min.. β -Aktin diente bei allen cDNA-Proben als Referenzwert zur Verifikation gleicher cDNA-Mengen. Der RT-PCR schloss sich eine Analyse der PCR-Produkte durch Agarosegelelektrophorese an. Die Agarosegelelektrophorese diente der Identifizierung und Größenbestimmung von PCR-Produkten. Das Wanderungsverhalten der DNA-Moleküle ist von der Agarosekonzentration, der elektrischen Feldstärke sowie der Größe und Gestalt der DNA-Moleküle abhängig. Die Größe solcher Moleküle lässt sich anhand eines Längenstandards bestimmen.

Für die Gelelektrophorese wurden ca. 0,5 cm dicke Agarosegele gegossen (2,0% Agarose (w/v) in 1 x TAE-Puffer aufgekocht und auf 50 °C abgekühlt). Den Proben wurde 1/6 Vol. Lauffrontmarker hinzugefügt. Eine 100 bp-Leiter wurde als Größenstandard mitgeführt. Die Elektrophorese erfolgte mit konstanter Spannung von 3-7 V/cm Elektrodenabstand, bei Raumtemperatur. Anschließend wurde das Gel in Ethidiumbromidlösung (2.1.3) gefärbt (30 min.) und in $\text{H}_2\text{O}_{\text{deion.}}$ gewässert (10 min.). Mit Hilfe des Dokumentationssystems Gel Doc 1000 (Bio Rad) erfolgte die Auswertung der Gele.

Tabelle 2-8 Basensequenzen der in der PCR verwendeten Primer.

PCR	Primer	Basensequenz
Granzym A	GrA-s	5' -ttt ctg gca tcc tct ctc tea- 3'
	GrA-as	5' -ggg tca tag cat gga tag gg- 3'
Granzym B	GrB-s	5' -tgc agg agg atc gaa agt gcg- 3'
	GrB-as	5' -gag gca tgc cat tgt ttc gtc- 3'
Granzym H	GrH-s	5' -tgt tca gtt tct gca aga gaa gag- 3'
	GrH-as	5' -ttg aga cat aac ccc agc ca- 3'
Granzym K	GrK-s	5' -atg agg cct cca aac aaa cac- 3'
	GrK-as	5' -cca gag act ata gcg tgg aag- 3'
Granzym M	GrM-s	5' -cag gga ctc ggt gca gca tg- 3'
	GrM-as	5' -gga cac gta agg cgc cac ag-3'
Perforin	Perforin-s	5' -cag tac agc ttc agc act gac- 3'
	Perforin-as	5' - atg aag tgg gtg ccg tag ttg- 3'
β-actin	β -actin-s	5' -agc ggg aaa tcg tgc gtg- 3'
	β -actin-as	5' -cag ggt aca tgg tgg tgc- 3'

2.6 Aufbau der Versuche

2.6.1 Versuchsblock I: Nachweis zytotoxischer Proteine in Dendritischen Zellen des peripheren Blutes

In der ersten Versuchsphase sollte die Synthese zytotoxischer Proteine in pDCs und mDCs des peripheren Blutes nachgewiesen werden. Dazu wurden Zellen aus humanem peripherem Blut gewonnen (2.3.1). Die Proteine Granzym A, B, K und Perforin, wurden mittels Durchflusszytometrie (2.4.1) analysiert. In einem zweiten Schritt sollten die auf Proteinebene erlangten Ergebnisse mit Hilfe der RT-PCR auf RNA-Ebene überprüft werden. Zusätzlich konnte mit dieser Methode die Expression von Granzym H untersucht werden, für das kein durchflusszytometrietauglicher Antikörper erhältlich war. Weiterhin sollte die intrazelluläre Lokalisation der zytotoxischen Proteine, mittels Fluoreszenzmikroskopie analysiert werden. Bei 400-facher Vergrößerung (2.4.3) unter dem Leica DM4000 Mikroskop wurden die Ergebnisse durch digitale Fotos dokumentiert.

2.6.2 Versuchsblock II: Einfluss verschiedener Stimulanzen auf die Granzym B-Synthese in pDCs

In der zweiten Versuchsphase sollte der Einfluss von verschiedenen Stimulanzen auf die Granzym B-Synthese in pDCs untersucht werden. In einem ersten Schritt wurden dazu MNC-Kulturen mit verschiedenen Zytokinen und TLR-Agonisten (2.3.4) stimuliert. Nach einer 20 stündigen Inkubation wurde die Granzym B-Expression in pDCs durchflusszytometrisch (2.4.1) gemessen. Die besonders interessanten Ergebnisse wurden anhand von isolierten pDCs (Kap. 2.3.2) verifiziert, indem die Granzym B-Expression mittels Sandwich-ELISA in Kulturüberständen und Zelllysaten ermittelt wurde.

2.6.3 Versuchsblock 3: Nachweis der pDC-vermittelten Granzym B-abhängigen Zytotoxizität

Um die Funktionalität der Granzym B-Expression in pDCs zu analysieren, sollte untersucht werden, ob pDCs mittels Granzym B den Zelltod der Granzym B-sensitiven Zelllinie K562 induzieren können. Dazu wurden pDCs wie in Abschnitt 2.3.2 isoliert und mit den K562

Zielzellen über 6 Stunden inkubiert. Der Anteil toter K562-Zellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. In einigen Ansätzen erfolgte die Zugabe der Inhibitoren EGTA, z-AAD-cmk und z-VAD-fmk. Diese Inhibitoren reduzieren die Wirkung der zytotoxischen Enzyme und vermindern die Mechanismen der Zelltötung. Anhand von spezifischer Granzym B-Inhibition mit z-AAD-cmk und Caspaseinhibition mit z-VAD-fmk sollte ermittelt werden, ob der zytotoxische Effekt Granzym B- bzw. caspaseabhängig ist. EGTA als Inhibitor der Granula-vermittelten Apoptose wurde eingesetzt, um die Bedeutung des Granula-Exozytose-Apoptoseweges für den pDC-induzierten Zelltod zu analysieren.

2.7 Statistik

Erhobene Daten wurden mit dem Programm Slide Write Plus 7.0 analysiert. Symmetrisch verteilte Daten wurden durch den Mittelwert und die Standardabweichung dargestellt. Daten, die keine symmetrische Verteilung zeigten, wurden anhand von Boxplots visualisiert. Diese zeigen den Median (Querbalken) sowie den Interquartilsabstand (Boxen). Extremwerte und Ausreißer wurden nicht berücksichtigt. In Kapitel 3.1.2 und 3.4 wurden Einzelwertdarstellungen gewählt, um die Abhängigkeit der Daten zu präsentieren. Signifikante Unterschiede wurden anhand des T-Tests für gepaarte Proben ermittelt. Im Falle der Abbildungen mittels Boxplots (3.3 und 3.4) ist der Wilcoxon-Tests angewendet worden. Es wurde in allen Fällen ein Signifikanzniveau von $P < 0,05$ gewählt. Signifikante Ergebnisse wurden in den Grafiken hervorgehoben (*). Die Grafiken sind mit Hilfe der Software Slide Write Plus 7.0 und Excel 2007 erstellt worden.

3 Ergebnisse

3.1 Granzyme und Perforin in mDCs und pDCs des Vollblutes

3.1.1 Expression zytotoxischer Proteine in mDCs und pDCs

Plasmazytoide Dendritische Zellen (pDCs) des peripheren humanen Vollblutes exprimieren das zytotoxische Protein Granzym B. Die Granzym B-Expression in pDCs wurde unter hiesigen Laborbedingungen geprüft. Darüber hinaus wurde die Expression weiterer zytotoxischer Proteine der Granzym-Familie und von Perforin in pDCs sowie auch in mDCs auf Protein- und/oder mRNA-Ebene analysiert.

MDCs und pDCs wurden aus dem peripheren Vollblut gewonnen und mittels Durchflusszytometrie analysiert (2.4.1). MDCs wurden als Lineage⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺ und pDCs als Lineage⁻ HLA-DR⁺ CD123⁺ identifiziert (Abb.3.1) und anschließend auf die Expression der genannten zytotoxischen Proteine untersucht. Die Analyse der mDCs zeigte, dass weder Granzym A, Granzym B, Granzym K noch Perforin in mDCs des peripheren Blutes exprimiert werden (Abb.3.1). Im Gegensatz dazu konnte in pDCs eine signifikante Granzym B-Expression bei allen Probanden festgestellt werden. Granzym B war in fast 100% der pDCs nachweisbar. Daher wurden für Granzym B, die Medianen Fluoreszenzintensitäten (MFI) des anti-GrB-PE-Antikörpers, anstatt der Prozentzahl Granzym B-positiver Zellen, registriert. Anhand der MFI kann die Menge der gebundenen fluoreszierenden Antikörper ermittelt werden, so dass auf die Quantität der Granzym B-Expression geschlossen werden kann. Die höchste MFI für Granzym B lag bei 22. Im Mittel lagen die MFIs für Granzym B in pDCs bei 14 ± 7 (n=6). Granzym A, Granzym K und Perforin konnten in pDCs durchflusszytometrisch nicht detektiert werden.

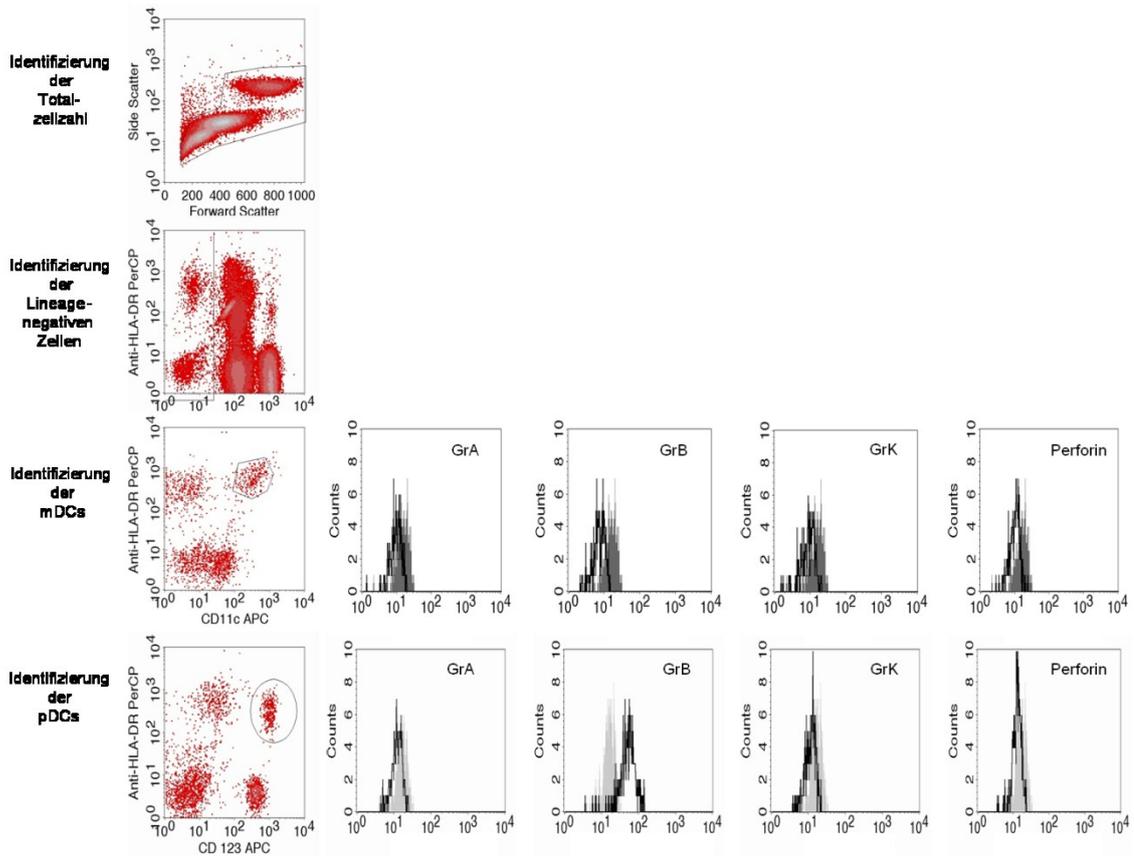


Abb. 3-1 Identifizierung von mDCs und pDCs mittels Durchflusszytometrie. MDCs wurden in frisch entnommenem peripherem Vollblut, als Lineage⁻ HLA-DR⁺ CD11c⁺ und pDCs als Lineage⁻ HLA-DR⁺ CD123⁺ durchflusszytometrisch identifiziert. Die Histogramme zeigen die Messung der Granzym A-, Granzym B-, Granzym K- und Perforinexpression (schwarze Linie) im Vergleich zu der entsprechenden Isotypkontrolle (grau). Dargestellt ist die Expression zytotoxischer Proteine eines repräsentativen Probanden.

Die Expression der zytotoxischen Proteine Granzym A, B, H, K, M und Perforin in pDCs auf mRNA-Ebene wurde mittels spezifischer RT-PCR-Protokolle untersucht. Dazu wurde die Gesamt-RNA frisch isolierter sowie IL-3 stimulierter pDCs von zwei repräsentativen Probanden analysiert (2.5). Die Gesamt-RNA peripherer mononukleärer Zellen (MNCs) diente als Positivkontrolle und H₂O (statt cDNA) als Negativkontrolle. Abbildung 3-2 zeigt das entsprechende PCR-Gel. Die für Granzym B spezifische mRNA konnte sowohl in frisch isolierten als auch in IL-3 stimulierten pDCs detektiert werden. Dabei stellten sich in der Gelelektrophorese die Banden für Granzym B spezifische mRNA in IL-3-stimulierten pDCs stärker dar als in frisch isolierten pDCs. Für Granzym A, Granzym K und Perforin konnte keine spezifische mRNA in pDCs detektiert werden. Somit konnten die durchflusszytometrisch ermittelten Daten bezüglich der Expression zytotoxischer Proteine in pDCs auf mRNA-Ebene bestätigt werden. Granzym M und Granzym H konnten zuvor nicht durchflusszytometrisch analysiert werden, da keine entsprechenden Antikörper erhältlich waren. Mittels RT-PCR wurde für Granzym H und Granzym M ebenfalls keine spezifische mRNA nachgewiesen.

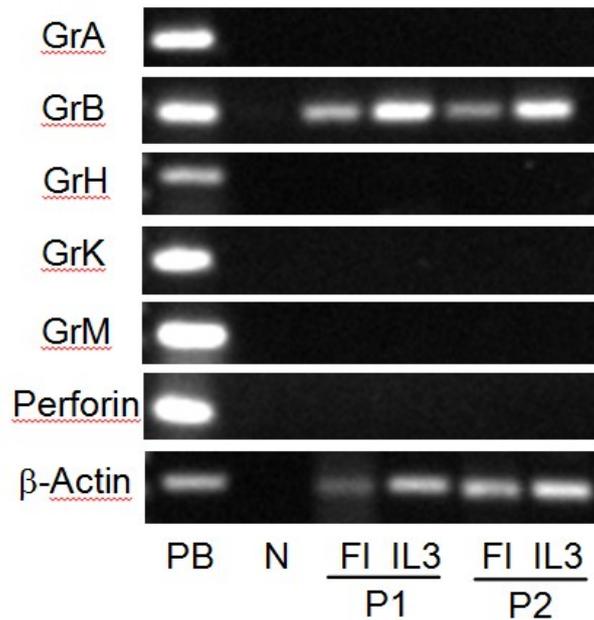


Abb. 3-2 Nachweis zytotoxischer Proteine in pDCs auf mRNA-Ebene mittels RT-PCR. Eine RT-PCR wurde mit der Gesamt-mRNA frisch isolierter (FI) und IL-3 stimulierter (IL-3) pDCs von zwei verschiedenen Probanden (P1, P2) sowie mit der Gesamt-mRNA von peripheren mononukleären Zellen (MNCs) (PB) als Positivkontrolle, durchgeführt. Als Negativkontrolle (N) diente H₂O anstelle von cDNA.

3.1.2 Einfluss von Kulturbedingungen und IL-3 auf die Granzym B-Expression in pDCs

Um zu bestätigen dass, die Granzym B-Expression in pDCs durch Aktivierung dieser Zellen mittels IL-3 stimulierbar ist, wurden MNCs aus venösem Blut isoliert und mit sowie ohne Zusatz von IL-3 (10 ng/ml) für 20 Stunden kultiviert (2.3.4). PDCs wurden durchflusszytometrisch als Lineage-negative HLA-DR⁺ CD123⁺ Zellen identifiziert (2.4.1) und ihre Granzym B-Expression analysiert. Es wurde eine signifikante Erhöhung der MFI-Werte für Granzym B in pDCs alleine durch die Kulturbedingungen festgestellt ($p = 0,005$) (Abb. 3-3). Die Zugabe von IL-3 zu der MNC-Kultur induzierte eine weitere Steigerung der Granzym B-Expression in den pDCs im Vergleich zu der Kultur ohne IL-3 ($p = 0,007$) (Abb. 3-3).

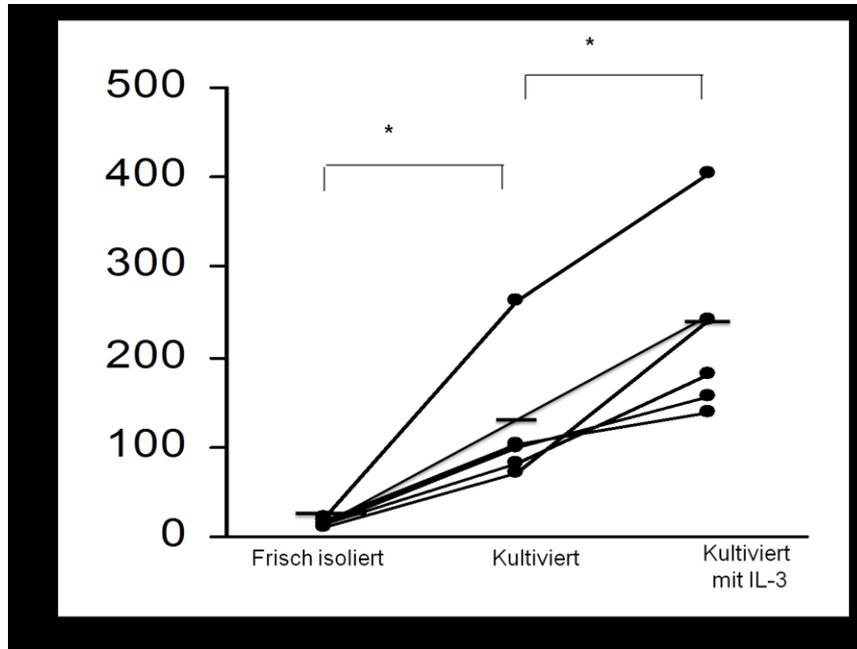


Abb. 3-3 Einfluss von IL-3 auf die Granzym B-Expression in pDCs. Dargestellt ist die Mediane Fluoreszenzintensität (MFI) des Anti-GrB-PE Antikörpers. MNCs wurden von 5 gesunden Probanden isoliert und für 20 Stunden mit/ohne IL-3 (10ng/ml) kultiviert. PDCs wurden durchflusszytometrisch als Lineage⁻ HLA-DR⁺ CD123⁺ identifiziert und die Expressionsintensität von GrB bestimmt. Schwarze Balken stellen den Mittelwert dar. Mittels gepaarten T-Tests wurden die Gruppen miteinander verglichen. Das Signifikanzniveau (*) wurde auf $P < 0,05$ festgesetzt.

3.1.3 Intrazelluläre Lokalisation von Granzym B in pDCs

Die intrazelluläre Lokalisation von Granzym B in pDCs war ein Ziel dieser Arbeit (2.4.3). Mit IL-3 stimulierte pDCs wurden mit dem fluoreszierenden Zellkernfarbstoff DAPI (Abb. 3-4a) markiert und konnten somit unter dem Fluoreszenzmikroskop als Zellen identifiziert werden.

Nach Markierung der pDCs mit einem fluoreszierenden anti-Granzym B-Antikörper (Abb.3-4c+g), zeigte sich ein granuläres Verteilungsmuster von Granzym B in den pDCs. Die Co-Lokalisation des anti-Granzym B-Antikörpers mit einem Antikörper gegen den für Granula spezifischen Marker CD63 (Abb. 3-4e+h) bestätigte die granuläre Verteilung von Granzym B zusätzlich.

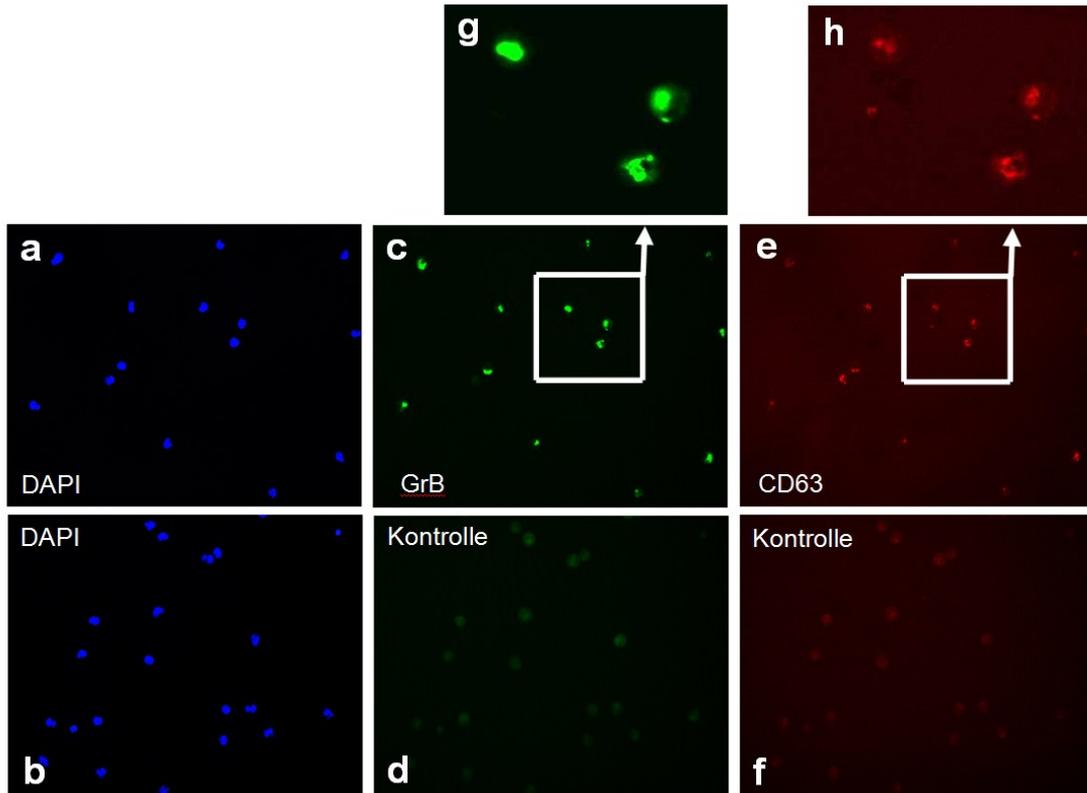


Abb. 3-4 Intrazelluläre Lokalisation von Granzym B in pDCs. Mit IL-3 für 16 Stunden stimulierte pDCs wurden durch Markierung mit dem Zellkernfarbstoff DAPI als Zellen identifiziert (a, b). Anschließend wurden pDCs mit einem anti-Granzym B-Antikörper (c, g) sowie mit einem Antikörper gegen den Granulamarker CD63 (e, h) markiert. Entsprechende Isotypkontrollen wurden ebenfalls mitgeführt (d, f). Fluoreszenzmikroskopische Bilder wurden digital bei einer Vergrößerung von x100(a-f) bzw. x400 (g, h) aufgenommen.

3.2 Der Effekt von TLR-Agonisten auf die Granzym B-Expression in pDCs

Über die Toll-like-Rezeptoren 7 und 9 erkennen pDCs virale und bakterielle Bestandteile und initiieren daraufhin eine Immunantwort. In dieser Arbeit sollte der Effekt von TLR7- und 9-Agonisten auf die Granzym B-Expression in pDCs untersucht werden. Dafür wurden MNC-Kulturen mit dem TLR7-Agonist Imiquimod bzw. den Oligonukleotiden ODN2006-G und ODN2216 (TLR9-Liganden) für 20 Stunden stimuliert. Der TLR4-Ligand LPS wurde als Kontrollstimulanz eingesetzt, da pDCs aus dem peripheren Blut TLR4 nicht exprimieren. Die durchflusszytometrische Analyse von Granzym B in pDCs einer MNC-Kultur zeigte eine signifikante Suppression der Granzym B-Expression nach Stimulation mit Imiquimod ($p = 0,046$) und ODN2216 ($p = 0,046$) (Abb.3-5). Nach Kultivierung der MNCs mit ODN2006-G konnten bei der Durchflusszytometrie keine pDCs mehr in der MNC-Kultur identifiziert werden. Überraschenderweise konnte ein signifikanter Anstieg der Granzym B-Expression nach Zugabe der Kontrollstimulanz LPS zu der MNC-Kultur festgestellt werden ($p = 0,02$) (Abb.3-5).

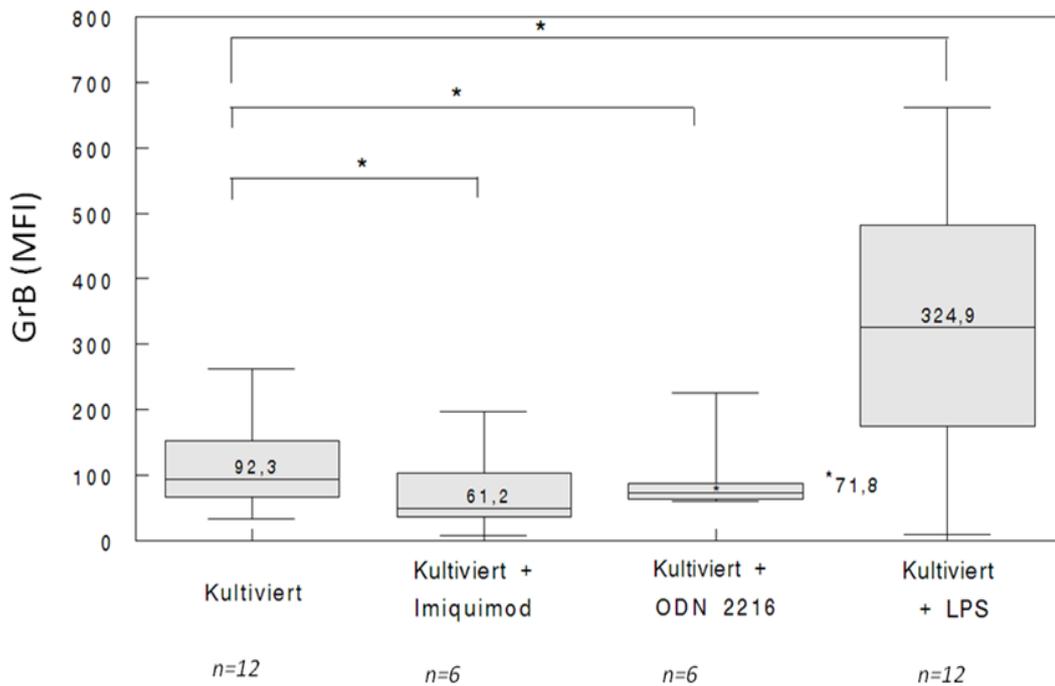


Abb. 3-5 Der Effekt von TLR-Agonisten auf die Granzym B-Synthese in pDCs einer MNC-Kultur. Dargestellt ist die Granzym B-Expression in pDCs als MFI in Boxplots mit Median (Querbalken), Interquartilsabstand (Boxen) und Spannweite (äußere Querbalken). Die Anzahl (n) der Probanden wurde unter den einzelnen Boxplots dargestellt. MNCs wurden für 20 Stunden mit den TLR7-Agonisten Imiquimod (5µg/ml) bzw. den TLR9-Liganden ODN2216 (1µM), ODN2006-G (1µM) sowie LPS (TLR4, 10µg/ml) stimuliert. Anschließend wurde Granzym B in pDCs mittels Durchflusszytometrie quantifiziert. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden mittels gepaartem Wilcoxon-Test verglichen. *P < 0,05 wurden als signifikant definiert.

Die mittels Durchflusszytometrie gewonnenen Ergebnisse über den Effekt der TLR-Agonisten auf die Granzym B-Synthese in pDCs sind nur für pDCs einer stimulierten MNC-Kultur aussagekräftig. Um einen indirekten Einfluss der TLR-Agonisten auf die Granzym B-Synthese in pDCs von einem direkten Einfluss zu unterscheiden, wurden pDCs immunmagnetisch isoliert (2.3.2) und mit IL-3 sowie den oben genannten TLR-Liganden für 16 Stunden stimuliert. Mittels eines Sandwich-ELISAs (2.4.2) wurde anschließend die Granzym B-Konzentration in Zelllysaten und Überständen quantifiziert. Abbildung 3-6 zeigt die Ergebnisse des Sandwich-ELISAs. Die untersuchten Agonisten der Toll-like-Rezeptoren 7 und 9 supprimierten signifikant die GrB-Synthese in pDCs. Durch Zusatz von Imiquimod (TLR7-Agonist) und ODN2006-G (TLR9-Agonist) fand eine starke, signifikante Reduktion der GrB-Expression statt, die sowohl

in den Kulturüberständen als auch in den Zelllysaten nachgewiesen wurde (jeweils $p < 0,05$). ODN2216 (TLR9-Agonist) supprimierte die Granzym B-Expression weniger stark, führte jedoch ebenfalls zu einer signifikanten Reduktion der Granzym B-Konzentration in den Zelllysaten und dem Gesamt-Granzym B (jeweils $p < 0,05$). Der TLR4-Ligand LPS hatte keinen Effekt auf die Granzym B-Synthese in isolierten pDCs.

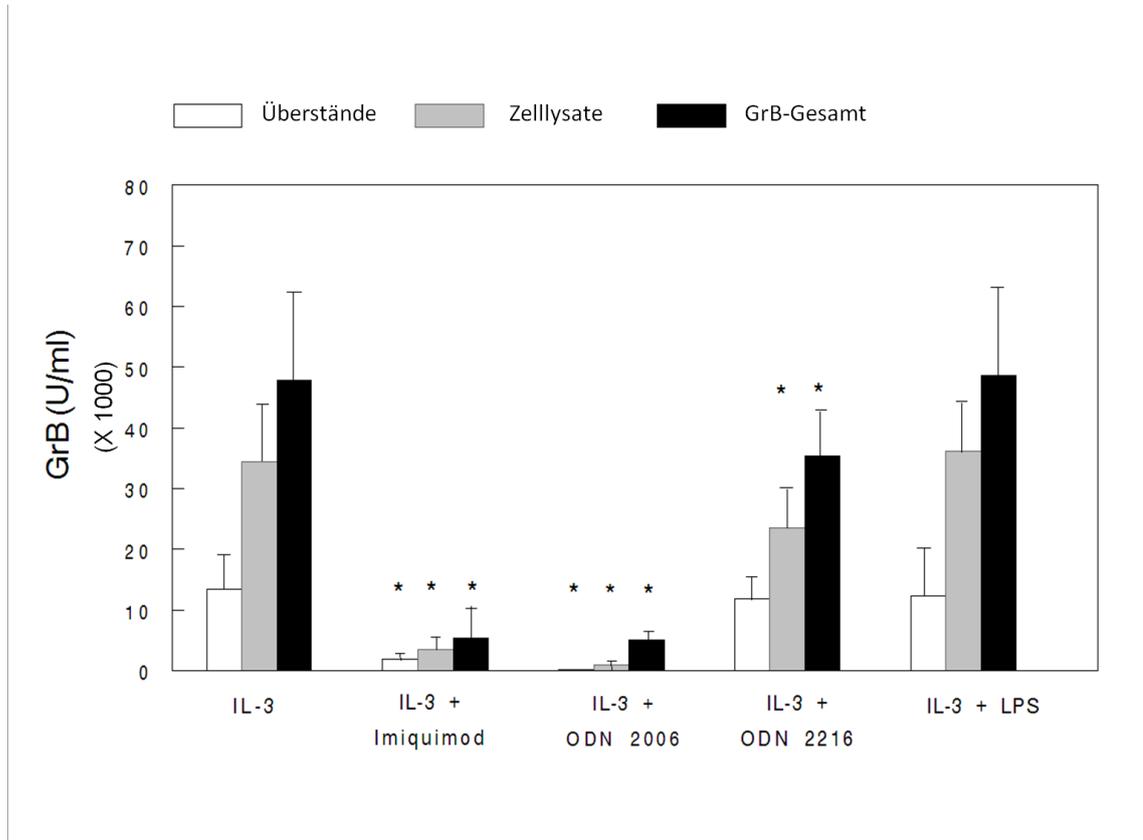


Abb. 3-6 TLR-Agonisten supprimieren die Granzym B-Synthese in pDCs. pDCs von 4 Probanden wurden immunmagnetisch isoliert und mit IL-3 (10ng/ml) sowie den TLR-Agonisten Imiquimod (10 μ g/ml), ODN2006-G (1 μ M), ODN2216 (1 μ M) und LPS (10 μ g/ml) für 16 Stunden stimuliert. Granzym B wurde in Zelllysaten und Überständen mit Hilfe eines Sandwich-ELISAs quantifiziert. Gezeigt sind die Ergebnisse als Säulendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. Signifikanzen wurden mit Hilfe des gepaarten T-Tests ermittelt und das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ (*) festgesetzt.

3.3 Der Effekt von Zytokinen auf die Granzym B-Expression in pDCs

Äquivalent zu 3.2 wurde der Einfluss von verschiedenen Zytokinen auf die Granzym B-Expression in pDCs untersucht. Abbildung 3-7 zeigt die Ergebnisse der durchflusszytometrisch ermittelten Granzym B-Expression in pDCs, einer mit Zytokinen stimulierten MNC-Kultur. Wie bereits beschrieben (3.1.2) führte IL-3 zu einem signifikanten Anstieg der Granzym B-Expression in pDCs ($p = 0,005$).

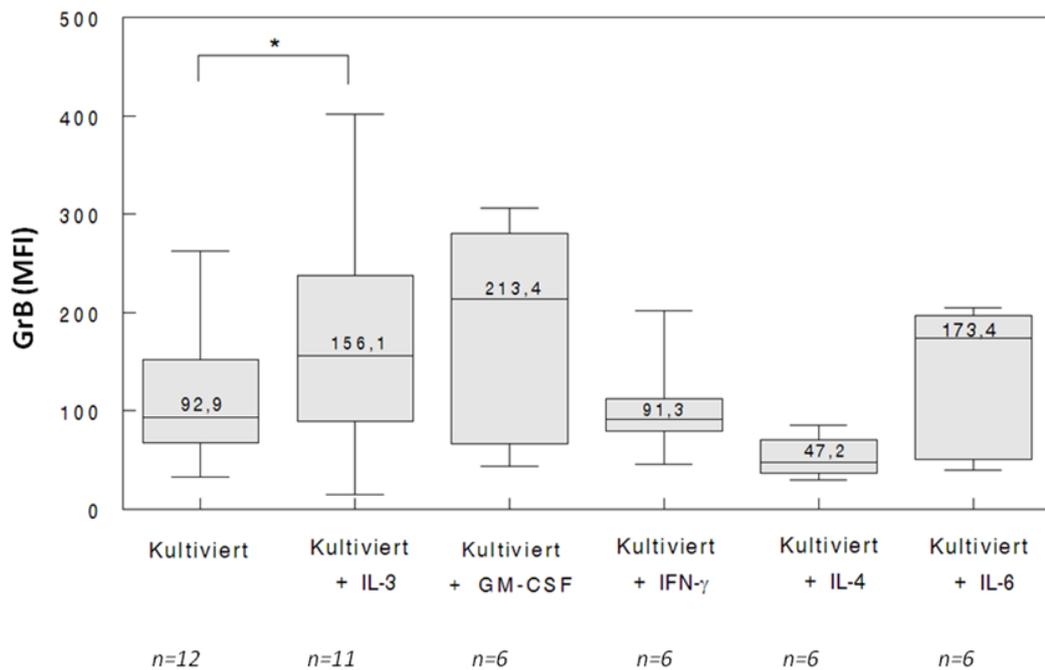


Abb. 3-7 Der Effekt von Zytokinen auf die Granzym B-Expression in pDCs einer MNC-Kultur. Dargestellt ist die Granzym B-Expression als MFI in Boxplots mit Median (Querbalken), Interquartilsabstand (Boxen) und Spannweite (äußere Querbalken) sowie Anzahl (n) der Probanden. MNCs wurden mit verschiedenen Zytokinen (GM-CSF (1000U/ml), IL-6 (1000U/ml), IL-4 (10ng/ml), IFN- γ (10ng/ml), IL-3 (5ng/ml)) für 20 Stunden stimuliert. Anschließend wurden pDCs mittels Durchflusszytometrie identifiziert und Granzym B quantifiziert. Mittels gepaartem Wilcoxon-Test wurden der Vergleich zwischen kultivierten und mit Stimulanzen kultivierten pDCs angestellt. $P < 0,05$ (*) wurde als signifikant definiert.

GM-CSF und IL-6 erhöhten die Granzym B-Expression probandenabhängig, jedoch nicht signifikant ($p > 0,05$). IL-4 supprimierte die Granzym B-Expression, jedoch ebenfalls nicht signifikant ($p > 0,05$). Darüber hinaus wurden Stimulationsversuche mit den Zytokinen IFN- γ , IL-1 β , TSLP und TNF- α sowie PGE₂ durchgeführt. Diese Stimulanzen hatten lediglich marginale, nicht signifikante Effekte auf die Granzym B-Expression und sind daher nicht in Abbildung 3-7 gezeigt.

Um einen indirekten Einfluss der Zytokine auf die Granzym B-Expression in den pDCs einer MNC-Kultur von einem direkten Einfluss zu unterscheiden, wurden pDCs immunmagnetisch isoliert und mit IL-3 sowie den oben genannten Zytokinen stimuliert. Abbildung 3-8 zeigt, dass IL-4 die Granzym B-Expression in pDCs signifikant supprimierte (jeweils $p < 0,05$ für Zelllysate, Kulturüberstände und Gesamt-Granzym B). Die Stimulation mit GM-CSF führte zu einem leichten, nicht signifikanten Anstieg der Granzym B-Expression. Andere untersuchte Zytokine bzw. PGE₂ zeigten keinen Effekt auf die Granzym B-Expression in pDCs und werden in der Abbildung 3-8 nur teilweise gezeigt.

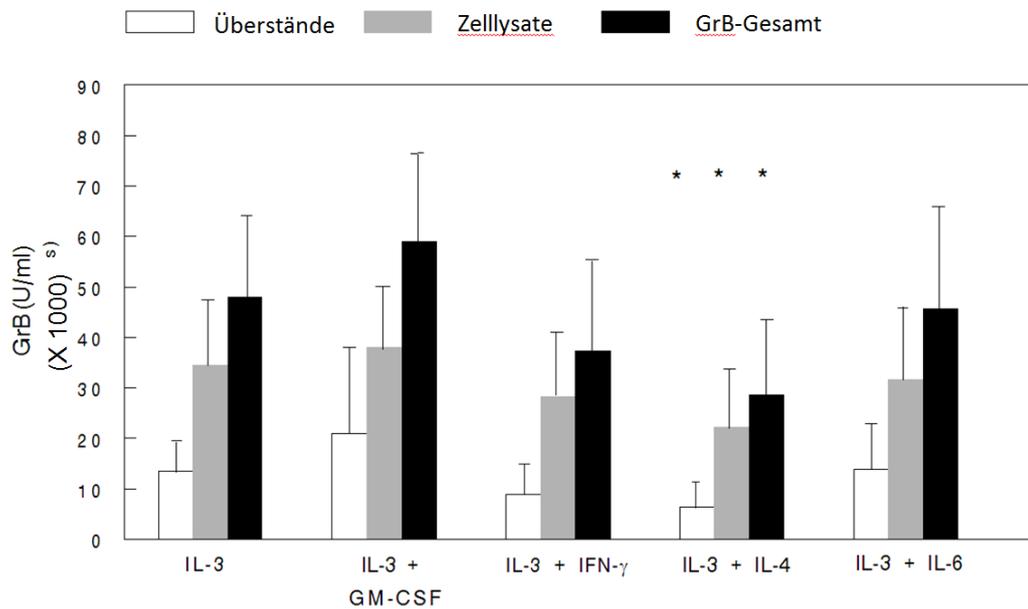


Abb. 3-8 IL-4 supprimiert die Granzym B-Expression in pDCs. PDCs von 4 Probanden wurden immunmagnetisch isoliert und mit IL-3 (10ng/ml) sowie den Zytokinen GM-CSF (1000U/ml), IFN- γ (10 ng/ml), IL-4 (10 ng/ml) und IL-6 (10vg/ml) für 16 Stunden stimuliert. Granzym B wurde in Zelllysaten und Überständen mit Hilfe eines Sandwich-ELISAs quantifiziert. Gezeigt sind die Ergebnisse als Säulendiagramm mit Mittelwert und Standardabweichung. Unterschiede zwischen IL-3 stimulierten und IL-3- + Zytokin-stimulierten pDCs wurden mittels T-Test für gepaarte Proben ermittelt. $P < 0,05$ (*) wurde als signifikant definiert.

3.4 PDCs initiieren einen Granzym B-, Caspase-abhängigen Zelltod in K562 Zellen

Um die Funktionalität der Granzym B-Expression in pDCs zu analysieren wurde, anhand eines Zytotoxizitätsassays (2.4.4) untersucht, ob pDCs mittels Granzym B den Zelltod der Granzym B-sensitiven Zelllinie K562 induzieren können. IL-3 stimulierte pDCs wurden mit der Targetzelllinie K562 für 6 Stunden kultiviert. Als Kontrolle wurden K562-Zellen ohne pDCs inkubiert. Die K562-Targetzellen wurden durchflusszytometrisch über das CFSE-Signal identifiziert und quantifiziert. Lebende Zellen (7-AAD⁻) wurden von toten Zellen (7-AAD⁺) unterschieden. Abbildung 3-9 vergleicht die durchflusszytometrische Messstrategie von K562-Zellen ohne als auch mit Zusatz von IL-3 stimulierten pDCs am Beispiel eines repräsentativen Probanden. Der Kontrollansatz ohne Zusatz von pDCs zeigte einen Anteil von $4,6\% \pm 1,4\%$ toter K562-Zellen. Durch diesen Kontrollansatz wurde der Anteil an toten K562 Zellen ermittelt, der unabhängig von den pDCs ist. Der pDC-vermittelte Zelltod von K562-Zellen wurde anhand von verschiedenen Effektor-/Target-Verhältnissen analysiert (1:1, 10:1, 20:1).

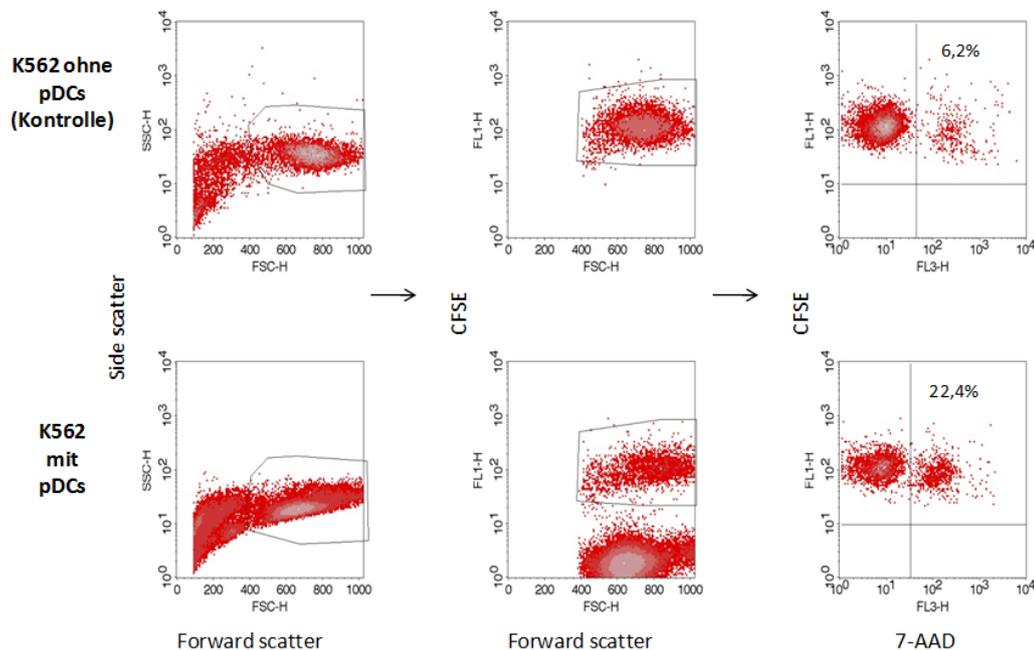


Abb. 3-9 Messstrategie des Zytotoxizitätsassays. In einem FSC/SSC-Plot wurde die Gesamtzellzahl identifiziert und durch das Setzen eines Gates vom Zelldetritus getrennt. Anschließend wurden die CFSE-markierten Targetzellen (K562) identifiziert und der Anteil der 7-AAD⁺ K562-Zellen ermittelt. Der Prozentsatz 7-AAD⁺ Zellen entspricht dem Anteil toter K562 Zellen. Dargestellt ist die Messstrategie von Targetzellen (K562) ohne pDCs (Kontrollansatz) sowie von K562-Zellen mit pDCs im Verhältnis 20:1, eines repräsentativen Probanden.

Bei der Analyse von verschiedenen Effektor/Target-Verhältnissen wurde eine signifikante Zunahme des Anteils der 7-AAD⁺-Zellen festgestellt. Für ein Effektor-/Target-Verhältnis von 10:1 ergab sich ein signifikanter Anstieg der 7-AAD⁺-Zellen auf 16,6 % ± 5,6% (p = 0,04) im Vergleich zu den Kontrollansätzen. Bei einem Effektor-/Target-Verhältnis von 20:1 zeigte sich eine signifikante Erhöhung der 7-AAD⁺-Zellen auf 28,6 % ± 10,3 % (p < 0,03). In Abbildung 3-10 ist der pDC-vermittelte Zelltod von K562-Zellen in Abhängigkeit des Effektor-/Target-Verhältnisses dargestellt.

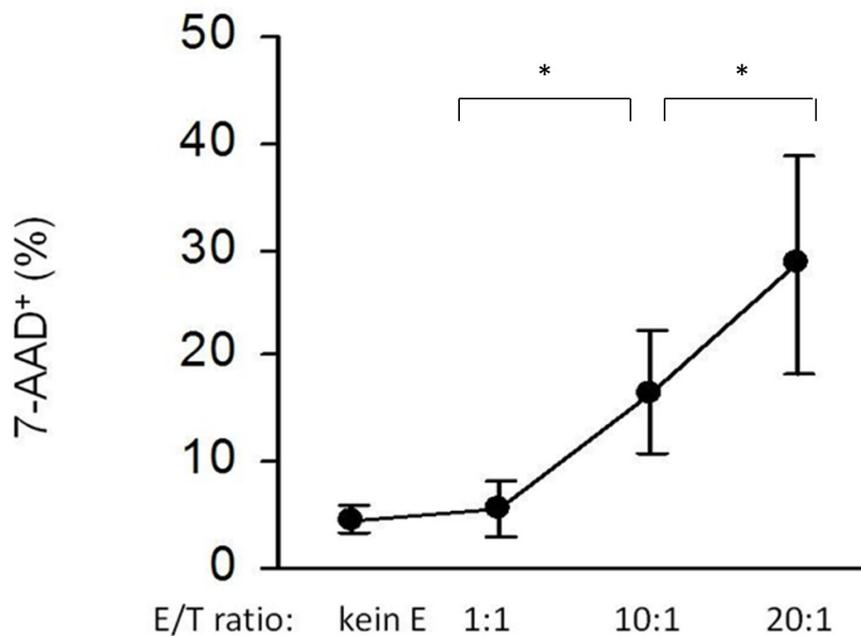


Abb. 3-10 PDC-vermittelter Zelltod von Targetzellen in Abhängigkeit des Effektor-/Target-Verhältnisses. IL-3 stimulierte pDCs von 3 Probanden wurden mit K562-Zellen in verschiedenen Effektor-/Target-Verhältnissen (E/T ratio) für 6 Stunden kultiviert. Die Prozentzahl der 7-AAD⁺-Zellen entspricht dem Ausmaß der Zelltodes. Ergebnisse sind als Mittelwert ± Standardabweichung dargestellt.

Verschiedene Studien beschreiben EGTA als Inhibitor der Granula-vermittelten Apoptose. EGTA bindet divalente Kationen. Das für den Zellkontakt zwischen Zielzelle und zytotoxischer Zelle benötigte Kalzium wird durch EGTA gebunden und somit die Granula-vermittelte Apoptose inhibiert. In dieser Arbeit wurde mittels EGTA die Bedeutung des Granula-vermittelten Apoptosewegs für den pDC-vermittelten K562-Zelltod untersucht. Für diesen Versuchsteil wurde ein pDC/K562-Verhältnis von 10:1 genutzt und EGTA (4mM) zugegeben. Abbildung 3-11 zeigt, dass durch Zusatz von EGTA der Anteil der 7-AAD⁺-Zellen signifikant von 11,9 % ± 4,2 % auf 5,9 % ± 2,6 % reduziert wird (p < 0,05).

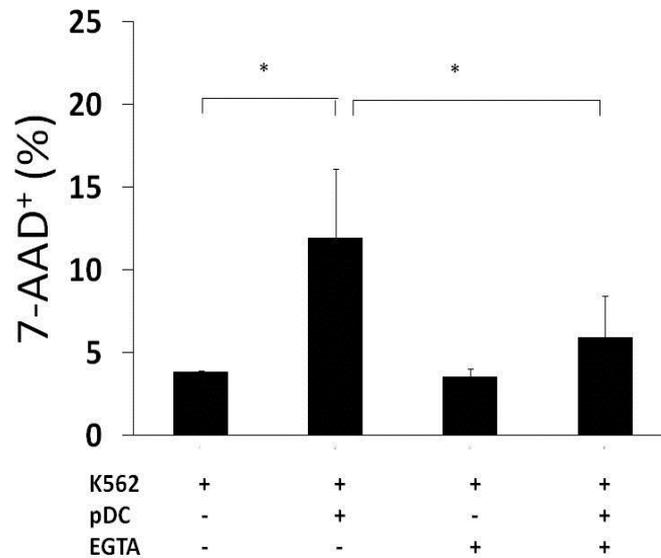


Abb. 3-11 EGTA supprimiert den pDC-vermittelten Zelltod. Dargestellt sind die toten Target-Zellen (7-AAD⁺) in Prozent. EGTA (4mM) supprimiert die Anzahl 7-AAD⁺-Zellen signifikant. Signifikanzen wurden mittels gepaartem T-Test ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt. Untersuchung an 3 Probanden (N=3).

Der Effekt des Granzym B-Inhibitors z-AAD-cmk sowie des Caspaseinhibitors z-VAD-fmk auf den pDC-vermittelten Zelltod wurde untersucht, um dessen Granzym B- bzw. Caspaseabhängigkeit zu prüfen. Für diese Versuche wurde eine E/T ratio von 10:1 gewählt. Die Abbildungen 3-12 und 3-13 zeigen, dass der Anteil von 7-AAD⁺-Zellen nach Zugabe des Granzym B- bzw. Caspaseinhibitors signifikant supprimiert wurde (jeweils $p < 0,05$). Nach Kultivierung in Gegenwart von z-AAD-cmk (50 μ M) wurde eine Reduktion der 7-AAD⁺-Zellen von 14,4 % \pm 5,4 % auf 4,6 % \pm 2,3 festgestellt (Abb.3-12). Die Zugabe des Caspaseinhibitors z-VAD-fmk (50 μ M) ergab ebenfalls eine signifikante Reduktion der 7-AAD⁺-Zellen von 15,3 % \pm 6,1 % auf 4,2 % \pm 1,9 % . .

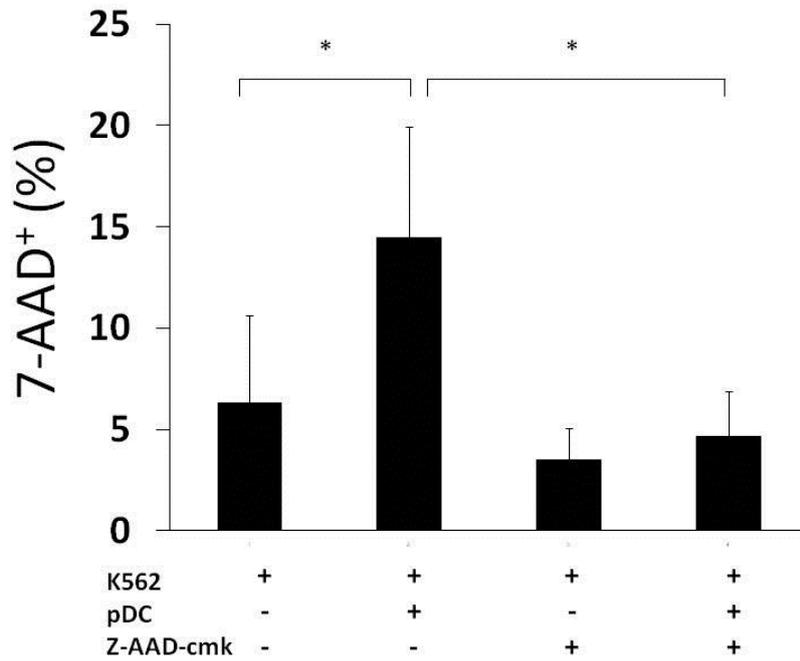


Abb. 3-12 Das zytotoxische Potential von pDCs wird durch den Granzym B-Inhibitor z-AAD-cmk **supprimiert**. PDCs und K562-Zellen wurden mit einem Effektor-/Target-Verhältnis (E/T ratio) von 10:1 für 6 Stunden co-kultiviert. Mittels Zugabe des Granzym B-Inhibitors z-AAD-cmk (50 μ M) wurde der Anteil der toten K562-Zellen (7-AAD⁺) signifikant reduziert. Signifikanzen wurden mittels gepaartem T-Test ermittelt. Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgesetzt. Untersuchung an drei Probanden (N=3).

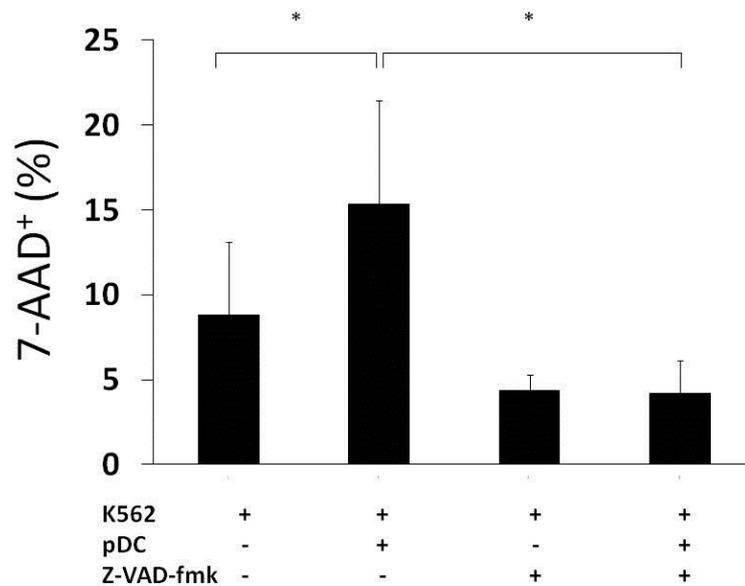


Abb. 3-13 Der pDC-vermittelte Zelltod ist **Caspase-abhängig**. Durch den Einfluss des Caspaseinhibitors z-VAD-fmk (50 μ M) wurde die Anzahl toter K562 Zellen signifikant (* $p < 0,05$) reduziert. Statistische Unterschiede wurden mittels gepaarten T-Tests ermittelt. * Das Signifikanzniveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt. Untersuchung an drei Probanden (N=3).

4 Diskussion

4.1 MDCs aus dem peripheren Blut synthetisieren keine zytotoxischen Proteine der Granzym-Familie

Die immunologischen Funktionen von mDCs wurden in den vergangenen Jahren ausführlich beschrieben. Als professionelle antigenpräsentierende Zellen sind mDCs in der Lage, verschiedene Immunantworten in naiven T-Zellen zu induzieren, vor allem eine starke TH1-Polarisierung (Cella et al. 1999, Farkas et al. 2004, Steinbrink et al. 2009). Ob mDCs ähnlich der NK-Zellen zytotoxische Proteine exprimieren und funktionell nutzen können, ist bisher nicht bekannt. In dieser Arbeit konnten die Granzyme A, B, und K nicht auf Proteinebene in mDCs detektiert werden (3.1.1). Somit konnte erstmals eine richtungsweisende Aussage zu der Frage, ob mDCs eines der zytotoxischen Proteine der Granzym-Familie exprimieren, gemacht werden. Risoan et al. 2002 verglichen die Expression von Granzym B-mRNA in pDCs und mDCs die aus Monozyten generiert wurden (MDDCs). Im Gel der RT-PCR zeigte sich lediglich eine sehr schwache Bande für Granzym B-spezifische mRNA bei mit GM-CSF/CD40L aktivierten MDDCs. Bei nicht-aktivierten MDDCs konnte keine Granzym B-spezifische Bande detektiert werden. Ob die von Risoan et al. 2002 ermittelten Erkenntnisse an MDDCs direkt auf mDCs aus dem Blut übertragen werden können, ist jedoch fragwürdig. Matsui et al. 2009 konnten mittels RT-PCR bestätigen, dass frisch isolierte mDCs keine Transkription von Granzym B zeigen. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass naive mDCs keine Granzyme exprimieren, beweisen dies allerdings nicht. So könnten z.B. unter bestimmten Stimulationsbedingungen für Granzyme codierende Genabschnitte abgelesen werden, die normalerweise inaktiv sind. Außerdem konnte aus Mangel an geeigneten Antikörpern bislang nicht untersucht werden, ob mDCs die Granzyme M und H auf Proteinebene synthetisieren. Da in den verschiedenen Studien Granzym B lediglich schwach in aktivierten MDDCs auf mRNA-Ebene und die Granzyme A, B und K nicht auf Proteinebene in mDCs detektiert werden konnten (Risoan et al. 2002 Matsui et al. 2009, eigene Daten), gibt es bisher keine Hinweise darauf, dass frisch isolierte mDCs Granzyme synthetisieren.

4.2 Die Synthese zytotoxischer Proteine in pDCs

4.2.1 Die Synthese von Granzym B

In dieser Arbeit wurde die Expression der Granzyme A, B, H, K und M in pDCs analysiert. Es konnte gezeigt werden, dass pDCs von den untersuchten Granzymen lediglich Granzym B exprimieren. Dabei wurde die Expression von Granzym B in pDCs auf Protein-Ebene mittels Durchflusszytometrie und ELISA sowie mit Hilfe einer RT-PCR auf mRNA-Ebene nachgewiesen. Außerdem konnte ein Anstieg der Granzym B-Expression in pDCs nach Stimulation mit IL-3 verzeichnet werden.

Diese Ergebnisse entsprechen denen von Risoan et al. (2002) gewonnenen Erkenntnissen bezüglich der Expression von Granzym B in humanen pDCs. Diese Studie untersuchte die Granzym B-Expression humaner pDCs aus Tonsillen ebenfalls mittels Durchflusszytometrie sowie RT-PCR. Dabei konnte festgestellt werden, dass naive sowie aktivierte pDCs große Mengen Granzym B-spezifischer mRNA exprimieren, im Vergleich zu aktivierten T-Zellen als Positivkontrolle. Nach Stimulation der pDCs *in vitro* mit IL-3 und CD40 wurde ein signifikanter Anstieg der Expression Granzym B-spezifischer mRNA verzeichnet. Eine noch stärkere Granzym B-Expression in pDCs, ähnlich der Intensität der Granzym B-Expression von NK-Zellen, konnte nach *in vitro* Stimulation mit IL-3 nachgewiesen werden (Risoan et al. 2002). Matsui et al. (2009) gelang es, diese Erkenntnisse der Granzym-B-Expression in pDCs und deren Hochregulierung durch IL-3 an humanen pDCs des peripheren Blutes zu reproduzieren. Dabei konnte ebenfalls gezeigt werden, dass pDCs lediglich Granzym B exprimieren, während z.B. CD8⁺ T-Zellen die entsprechende mRNA für die Expression verschiedener Granzyme synthetisieren (Matsui et al. 2009). Eine weitere Studie zeigte, dass die Granzym B-Expression der pDCs durch den Translationsinhibitor Cycloheximid vollständig inhibiert werden kann (Jahrsdörfer et al. 2010). Es konnte also in verschiedenen Studien übereinstimmend mit dieser Arbeit die Granzym B-Synthese in pDCs demonstriert werden (Risoan et al. 2002, Santoro et al. 2005, Facchetti et al. 2003, Matsui et al. 2009, Jahrsdörfer et al. 2010). Im Gegensatz zu IL-3 stimulierten pDCs konnte in dieser Arbeit in unstimulierten pDCs lediglich eine geringe Granzym B-Expression festgestellt werden. Jahrsdörfer et al. (2010) zeigten, dass pDC-Vorstufen gesunder Probanden kaum Granzym B exprimieren, während mit IL-3 oder IL-3/IL-10 stimulierte pDCs große Mengen Granzym B synthetisieren. IL-3 scheint dabei nicht nur die Granzym B-Synthese zu stimulieren, sondern vor allem die Überlebenszeit von pDCs zu verlängern (Colonna et al. 2004). Die Bestätigung dieser Ergebnisse unter hiesigen Laborbedingungen bildete die Grundlage für weiterführende Versuche und ist von essentieller Bedeutung für die Vergleichbarkeit mit anderen Studien.

Granzym B wird zusammen mit Perforin in den zytoplasmatischen Granula von Effektorzellen des Immunsystems gespeichert, wie z.B. in NK-Zellen oder zytotoxischen T-Zellen (Rissoan et al. 2002, Liebermann et al. 2003). Für pDCs war bisher nicht bekannt, in welcher Form Granzym B gespeichert und sezerniert wird und ob die an anderen Zellen bisher erlangten Erkenntnisse auf pDCs übertragbar sind. In dieser Arbeit konnte mittels fluoreszenzmikroskopischer Analysen gezeigt werden, dass Granzym B in pDCs in granulärer Form gespeichert wird. Dies wurde bestätigt durch die Co-Lokalisation von Granzym B mit CD63, einem spezifisch in lysosomalen Membranen lokalisierten Protein (Metzelaar et al. 1991, Colonna et al. 2004). Somit scheinen pDCs in der Lage zu sein, Granzym B in zytoplasmatischen Granula zu speichern, ähnlich wie andere zytotoxische Effektorzellen des Immunsystems. Eine aktuelle Studie konnte ebenfalls mikroskopisch eine perinukleäre granuläre Granzym B-Speicherung in pDCs beobachten. Diese Studie diskutiert, dass pDCs Granzym B *de novo* nach entsprechender Stimulation der Zellen synthetisieren und dieses nicht, wie andere zytotoxische Zellen, vorsynthetisieren und speichern (Jahrsdörfer et al. 2010). Die genauen molekularen Mechanismen der Granzym B-Synthese und -Sekretion in pDCs bleiben aber unbekannt. Auch die funktionelle Relevanz der Granzym B-Expression in pDCs sowie mögliche immunologische Wirkungen sind bisher nicht ausreichend untersucht worden.

4.2.2 PDCs initiieren Granzym B-abhängig den Zelltod in Zielzellen

In dieser Arbeit konnte eine effektive Granzym B-vermittelte Zytotoxizität der pDCs gegenüber der Granzym B-sensiblen Zelllinie K562 nachgewiesen werden. Mittels eines Zytotoxizitätsassays wurde bei einem E/T-Verhältnis von 10:1 eine signifikante Erhöhung des Anteils 7-AAD⁺-Zellen festgestellt (3.4). Diese Granzym B-vermittelte Zytotoxizität konnte durch die Zugabe eines spezifischen Granzym B- oder eines Caspase-Inhibitors vollständig blockiert werden. Diese Erkenntnisse lassen vermuten, dass das von pDCs stammende Granzym B in das Zytosol der Targetzellen gelangt und dort ein Caspase-abhängiger Zelltod initiiert wird.

Verschiedene Autoren beschreiben, dass der Granula-vermittelte Zelltod sowohl Caspase-abhängig als auch Caspase-unabhängig ablaufen kann (Trapani et al 2002, Sarin et al. 1997). Die signifikante Suppression des Anteils 7-AAD⁺-Zellen nach Zugabe des spezifischen Caspaseinhibitors z-VAD-fmk beweist die Caspase-Abhängigkeit des Granzym B-vermittelten, durch pDCs initiierten Zelltodes in den K562-Zielzellen.

EGTA fand in verschiedenen Studien, wie auch in dieser Arbeit, Einsatz als Inhibitor der Granula-vermittelten Apoptose (van Kooyk et al. 1991, Labadia et al. 1998). EGTA inhibiert Ca^{2+} -abhängige Polymerisation und führt dadurch zu einer Unterbrechung von Zell-Zellkontakten. Die Erkenntnisse über Ca^{2+} -abhängige Mechanismen der Interaktion zwischen zytotoxischer Zelle und Zielzelle sowie den Einsatz von EGTA als Inhibitor stammen von Studien an CTLs, wie z.B. zytotoxischen T-Zellen (van Kooyk et al. 1991, Labadia et al. 1998, Somersalo et al. 2004). Ob diese lückenlos auf pDCs übertragbar sind, ist nicht sicher. Eine aktuelle Studie diskutiert, dass die Verbindung zwischen pDCs und CD4^{+} T-Zellen mobiler und unverbindlicher ist als die feste Verbindung der CTL mit ihrer Zielzelle (Jahrsdörfer et al. 2010).

Matsui et al. (2009) zeigten ebenfalls, dass mit IL-3/CD40L aktivierte pDCs in der Lage sind, den Zelltod in K562-Zellen als Targetzellen einzuleiten. Diese Studie konnte bei E/T-Verhältnissen von 100:1 und langer Effektor-/Target-Co-Kultivierung (18-24 Stunden) eine signifikante Zytotoxizität der mit IL-3/CD40L stimulierten pDCs nachweisen. Des Weiteren konnte in der genannten Studie nachgewiesen werden, dass pDCs exklusiv Granzym B als Protein der Granzym-Familie synthetisieren. Die Granzym B-Abhängigkeit der Zytotoxizität von pDCs gegenüber K562-Zellen liegt daher nahe, kann durch diese Studie jedoch nicht endgültig bewiesen werden, da keine Kontrollversuche mit Granzym B-spezifischen Inhibitoren durchgeführt wurden.

In der Studie von Matsui et al. (2009) wurde lediglich eine schwache Zytotoxizität der pDCs gegenüber K562-Zellen beschrieben. Allerdings können Unterschiede bei Material und Methoden des Zytotoxizitätsassays, im Vergleich zu dieser Arbeit, einen Einfluss auf die Ausprägung der Ergebnisse gehabt haben. Lecouer et al. (2001) demonstrieren, dass die in dieser Arbeit verwendete Methode sensitiver ist, vor allem für Versuche mit niedrigen E/T-Ratios. In dieser Arbeit wurde CFSE zur Markierung der Targetzellen verwendet. CFSE ist ein gut untersuchtes und für die Markierung von Lymphozyten gern genutztes Substrat, das nur bei der Verwendung sehr hoher Konzentrationen selbst zytotoxisch wirkt (Fazekas De St Groth et al. 1999, Parish et al. 1999). Matsui et al. (2009) nutzten das Gammastrahlen-emittierende Cr^{51} für ihren Zytotoxizitätsassay. Durch dieses Substrat können Zellen geschädigt werden (Parish et al. 1999). Der zytotoxische Einfluss verwendeter Substrate, Materialien und Methoden muss demnach bei dem Vergleich der Daten berücksichtigt werden. Matsui et al. (2009) markierten K562-Zellen mit Cr^{51} . Bei dieser Methode wird das Chrom^{51} in den Zellkern der Targetzellen aufgenommen und kann nach dem Tod der Targetzellen im Überstand quantifiziert werden. Dagegen fand in dieser Arbeit eine Markierung der lebenden K562-Zellen mit dem Zellfarbstoff

CFSE statt. Anschließend wurde eine zweite Markierung mit 7-AAD durchgeführt (2.4.4). 7-AAD ist ein Substrat welches durch die permeabilisierten Membranen von apoptotischen und nekrotischen Zellen diffundiert und diese anfärbt. Eine Unterscheidung von lebenden und toten Targetzellen ist somit möglich. Außerdem scheint die Verwendung von 7-AAD besonders sensitiv für die Erkennung von frühapoptotischen Zellen zu sein, da 7-AAD bereits bei beginnender Permeabilisierung der Zellmembran in das Zytosol eindringen kann, während Cr⁵¹ in diesem Apoptosestadium noch nicht freigesetzt wird (Khosravi-Far, Lockshin, Zakeri & Piacentini 2008). Die in dieser Arbeit verwendete Methode ist demnach sensitiver und liefert genauere Ergebnisse. Hinzu kommt, dass die pDCs bei Matsui et al. (2009) andersartig stimuliert wurden, so dass die Ergebnisse in ihrer Ausprägung kaum miteinander verglichen werden können.

4.2.3 Die zytotoxische Wirkung der pDCs ist Perforin-unabhängig

Perforin ist in der Lage durch Ca²⁺-abhängige Polymerisation lytische Membranporen zu bilden. Diese lytische Wirkung von Perforin ist stark dosisabhängig (Tschopp et al. 1986). Die exakte Rolle von Perforin bei der Granzym B-abhängigen Apoptose ist widersprüchlich beschrieben. Es ist unklar, ob Perforin für die Granula-vermittelte Apoptose eine essentielle Rolle spielt oder lediglich unterstützend wirkt. Außerdem werden unterschiedliche Angriffspunkte von Perforin beim Ablauf des Granzym B-induzierten Zelltodes diskutiert. Einerseits wird die äußere Zellmembran für den Ansatzpunkt von Perforin gehalten. Perforin könnte durch Porenbildung den Durchtritt von zytotoxischen Proteinen in die Zelle ermöglichen (Tschopp et al. 1986, Sauer et al. 1991, Shiver et al. 1991, Nakajima et al. 1995). Andere Studien vermuten, dass die zytotoxischen Proteine durch Endozytose in Zielzellen gelangen und Perforin für die Ausschüttung dieser Stoffe aus den Endosomen verantwortlich ist (Froelich et al. 1996, Shi et al. 1997, Pinkoski et al. 1998). Ob die zytotoxische Wirkung von Granzym B Perforin-abhängig oder lediglich durch Perforin unterstützt ist, wird ebenso widersprüchlich diskutiert (Kagi et al. 1994, Lowin et al. 1994, Kojima et al. 1994, Motyka et al. 2000, Thierry et al. 2011). In pDCs konnte bisher keine Perforin-Expression nachgewiesen werden (Rissoan et al. 2002). Auch in dieser Arbeit konnte weder auf Proteinebene (3.1.1), noch auf mRNA-Ebene (3.1.1) die Expression von Perforin in pDCs detektiert werden. So scheint die Granzym B-vermittelte Apoptose durch pDCs über einen Perforin-unabhängigen Mechanismus zu erfolgen. EGTA wurde von Grossmann et al. 2004 als Perforin-spezifischer Inhibitor in Zytotoxizitätsassays mit regulatorischen T-Zellen eingesetzt, da EGTA die Ca²⁺-abhängige Polymerisation des Perforin inhibiert. In dieser Arbeit konnte die Granzym B-abhängige

Zytotoxizität von pDCs mittels Einsatz des Inhibitors EGTA inhibiert werden (3.4). Dieses Ergebnis steht unter den Gesichtspunkten von Grossmann et al. 2004 eigentlich im Widerspruch zu der Annahme, dass pDCs kein Perforin synthetisieren. Allerdings vermag EGTA durch die Bindung kovalenter Kationen nicht nur die Polymerisation von Perforin zu unterbinden, sondern auch den Ca^{2+} -abhängigen Zellkontakt zwischen zytotoxischer Zelle und Zielzelle (van Kooyk et al. 1991, Labadia et al. 1998, Somersalo et al. 2004). Daher kann von der Verwendung von EGTA als Inhibitor nicht von einer Perforin-Abhängigkeit der Reaktion ausgegangen werden. Die Hypothese, dass die Granzym B-vermittelte Apoptose Perforin-unabhängig ist, wird durch die Beobachtung gestützt, dass die Wirkung von Perforin durch direkte Injektion von Granzymen in das Zytosol sowie durch endosomolytische, bakterielle und virale Toxine, substituiert werden kann (Froelich et al. 1996, Browne et al. 1999). Es ist somit vorstellbar, dass andere bisher nicht identifizierte Bestandteile der Granula in pDCs die Funktion von Perforin übernehmen. Der Durchtritt von zytotoxischen Proteinen in die Zielzelle könnte ebenfalls über Perforin-unabhängige Mechanismen, wie z.B. durch Endozytose oder Mannose-6-Phosphat-Rezeptor-vermittelt, erfolgen (Pinkosky et al. 1998, Gross et al. 2003, Kurschus et al. 2004). Weiterhin konnten verschiedene Studien zeigen, dass andere Zellarten in der Lage sind einen Granzym B-vermittelten, Perforin-unabhängigen Zelltod zu initiieren (Gondek et al. 2005, Tschopp et al. 2006, Kurschus et al. 2004, Gross et al. 2003, Pardo et al. 2007). Gondek et al. (2005) demonstrierten dies z.B. für murine CD4^+ regulatorische T-Zellen. Die Zellen von Perforin-defizienten Mäusen initiierten dabei genauso effizient eine Granzym B-vermittelte Apoptose, wie die Zellen von Wildtyp-Mäusen. Die an Knockout-Mäusen getesteten Ergebnisse sind eindeutig, jedoch nicht problemlos auf den Menschen übertragbar. Czystowska et al. (2010) zeigten, dass auch die Wirkung humaner regulatorischer T-Zellen Perforin-unabhängig ist. Außerdem konnte auch für humane basophile Granulozyten ein Granzym B-abhängiger, Perforin-unabhängiger zytotoxischer Mechanismus beschrieben werden (Tschopp et al. 2006). Das zeigt, dass Perforin nicht in jedem Fall für den Granzym B-vermittelten Zelltod essentiell ist. In dieser Arbeit konnte kein Perforin in pDCs detektiert werden. Auch Rissoan et al. (2002) konnten kein Perforin in pDCs nachweisen. Jahrsdörfer et al. (2010) bestätigten aktuell, die auf diese Arbeit zurückzuführende Annahme, dass pDCs eine Granzym B-vermittelte, jedoch Perforin-unabhängige Wirkung auf Zielzellen haben.

4.3 Einfluss von TLR-Liganden und Zytokinen auf die Granzym B-Synthese in pDCs

Die unterschiedlichen immunologischen Funktionen von pDCs und deren Beeinflussung durch verschiedene Stimulanzen wurden in vielen Studien beschrieben. So initiieren pDCs, nach Erkennung viraler und bakterieller Antigene über TLR7 und 9 eine IFN- α -abhängige TH1-Immunantwort (Cella et al. 2000, Iwasaki et al. 2004, Lund et al. 2003, Lund et al. 2004). Außerdem sind pDCs z.B. in der Lage, eine effiziente TH2-Antwort in naiven CD4⁺ T-Zellen zu induzieren (Kawamura et al. 2006, Moseman 2004). Dabei spielen viele chemische Botenstoffe, wie z.B. Zytokine, TLR-Liganden etc., eine entscheidende Rolle für die Aktivierung bzw. Suppression der pDC-Funktionen. Die Beeinflussung der Granzym B-Synthese in pDCs ist bis auf die IL-3-abhängige Aktivierung vollkommen unbekannt (Rissoan et al. 2002). In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Zytokine und TLR-Liganden auf die Granzym B-Synthese in pDCs analysiert.

In Gegenwart viraler oder synthetischer TLR7- und TLR9-Liganden kommt es zu einer Hochregulation von TRAIL in pDCs. pDCs werden dadurch zu potenten Killer-Zellen von TRAIL-sensitiven Targetzellen (Chaperot et al. 2005). Um eine mögliche Granzym B-vermittelte Rolle der pDCs bei der Induktion antiviraler oder antibakterieller Immunantworten zu untersuchen, wurde der Effekt von TLR7- und TLR9-Liganden auf die Granzym B-Expression in pDCs untersucht. Dabei konnte gezeigt werden, dass Imiquimod und das CpG-Oligonukleotid ODN2006 die IL-3-induzierte Granzym B-Synthese in pDCs stark supprimieren (3.2). Diese Erkenntnisse sprechen gegen eine Granzym B-vermittelte Funktion der pDCs bei der antiviralen oder antibakteriellen Immunantwort und lassen vermuten, dass pDCs die verschiedenen zytotoxischen Mechanismen im Zusammenhang mit unterschiedlichen Funktionen im Immunsystem nutzen. Eine andere Studie konnte jedoch eine signifikante Zelltötung von Tumorzelllinien (inkl. der Granzym B-sensiblen K562-Zelllinie) durch CpG- und Influenzavirus-stimulierte pDCs demonstrieren (Matsui et al. 2009). Es kann jedoch bei Matsui et al. (2009) nicht eindeutig bewiesen werden, dass die Tötung von Tumorzelllinien durch pDCs Granzym B-vermittelt und nicht durch andere zytotoxische Mechanismen verursacht wurde. So zeigten Chaperot et al. (2005), dass mit CpG ODN bzw. Influenzavirus stimulierte pDCs TRAIL-abhängig virus-infizierte sowie Tumor-Targetzellen töten. Es kann also von der Matsui et al.-Studie (2009) nicht darauf geschlossen werden, dass die Zytotoxizität CpG-bzw. Virus-stimulierter pDCs Granzym B-vermittelt ist.

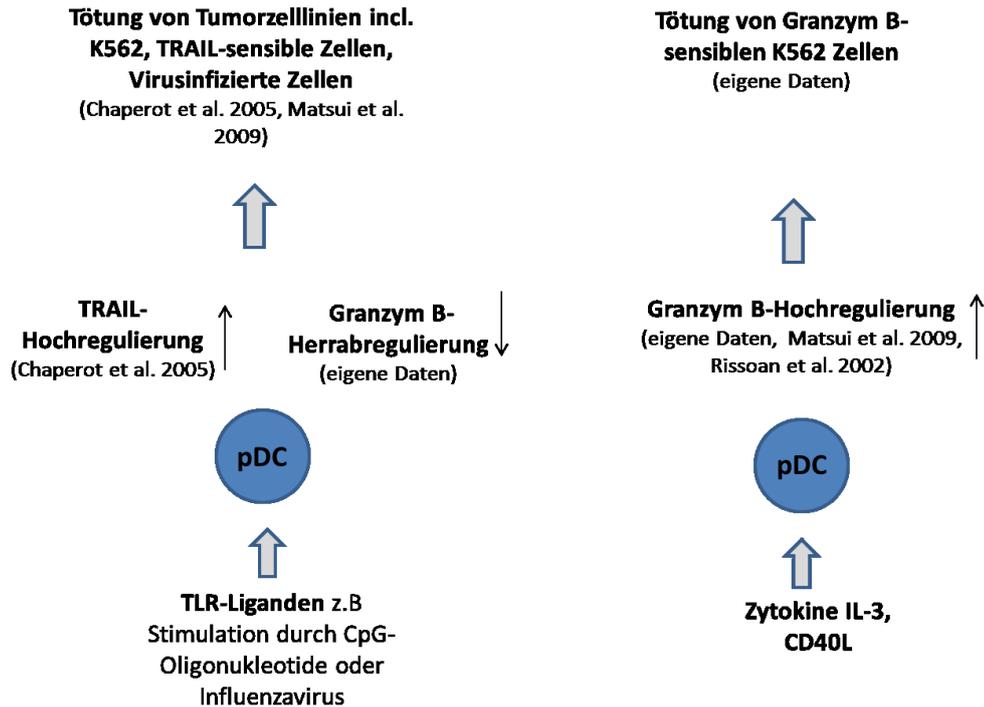


Abb. 4-1 Zytotoxische Mechanismen von pDCs nach unterschiedlicher Stimulation. Nach Stimulation von pDCs durch synthetische oder virale TLR7- und TLR9-Liganden kommt es zur Hochregulierung von TRAIL. Dadurch werden pDCs zu effektiven Killern von TRAIL-sensitiven Zellen (Chaperot et al. 2005). Diese Arbeit konnte die Granzym B-vermittelte Zelltötung von K562-Tumorzellen demonstrieren, dabei wurde durch eine Stimulation mit IL-3 die Granzym B-Synthese hochreguliert.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss verschiedener Zytokine auf die Granzym B-Synthese in pDCs analysiert. Die Ergebnisse zeigen, dass IL-4 die Granzym B-Expression in pDCs von gesunden Probanden signifikant reduziert (3.3). IL-4 ist ein immunmodulatorisches Zytokin, das eine wichtige Rolle bei der Kommunikation zwischen Antigenpräsentierenden Zellen und T-Zellen spielt. So ist IL-4 z.B. der stärkste Auslöser einer Differenzierung naiver T-Helfer-Zellen zu CD4⁺ TH2-Zellen und inhibiert zudem die TH1-Immunantwort (Hsieh et al. 1992, Seder et al. 1992, Julia et al. 2000, Zhu et al. 2001). Der Einfluss von IL-4 auf die Granzym B-Synthese in verschiedenen Zellarten wurde von mehreren Studien beschrieben. Kienzle et al. konnten im Mausmodell zeigen, dass IL-4 die Granzym B-Synthese in CD8⁺ T-Zellen hemmt und somit die zytotoxische Funktion dieser Zellen supprimiert (Kienzle et al. 2002, Kienzle et al. 2005). Bratke et al. (2008) demonstrierten eine Suppression der Zytotoxizität von *in vitro* generierten, adaptiven CD4⁺ regulatorischen T-Zellen, durch den inhibierenden Einfluss von IL-4 auf die Granzym B-Synthese. Es scheint, dass der Einfluss von IL-4 auf pDCs stark abhängig vom vorherrschenden Milieu ist. So zeigte eine Studie, dass pDCs aus dem Blut von Atopikern sowie Nicht-Atopikern unterschiedlich auf IL-4 reagieren (Uchida et al. 2001). Es konnte weiterhin demonstriert werden, dass IL-4 die IL-3-induzierte Überlebensrate von pDCs von gesunden Probanden inhibiert. Dieses gilt jedoch nicht für das IL-3-induzierte Überleben von pDCs von Atopikern.

Zudem ist die Entwicklung der pDCs durch TH1-/TH2-Mediatoren in verschiedene Richtungen polarisierbar (Schröder et al. 2005). Es ist daher sehr wahrscheinlich, dass die Granzym B-Synthese in pDCs und deren Beeinflussbarkeit durch unterschiedliche Stimulanzen stark von dem vorherrschenden Milieu und der Voraktivierung der pDCs abhängt und dadurch unterschiedlich ausfallen kann. Verschiedene Rollen der pDCs, sowohl bei der Initiierung unterschiedlicher Immunantworten, als auch bei der Generierung bzw. Verstärkung von autoimmun- und inflammatorischen Erkrankungen, ist somit möglich. Die zentrale Bedeutung der Granzym B-Expression für die Funktion von pDCs und deren Regulierung durch verschiedene Stimulanzen war bisher weitgehend unbekannt. Die Erkenntnisse dieser Arbeit schaffen somit die Basis für weitere Studien.

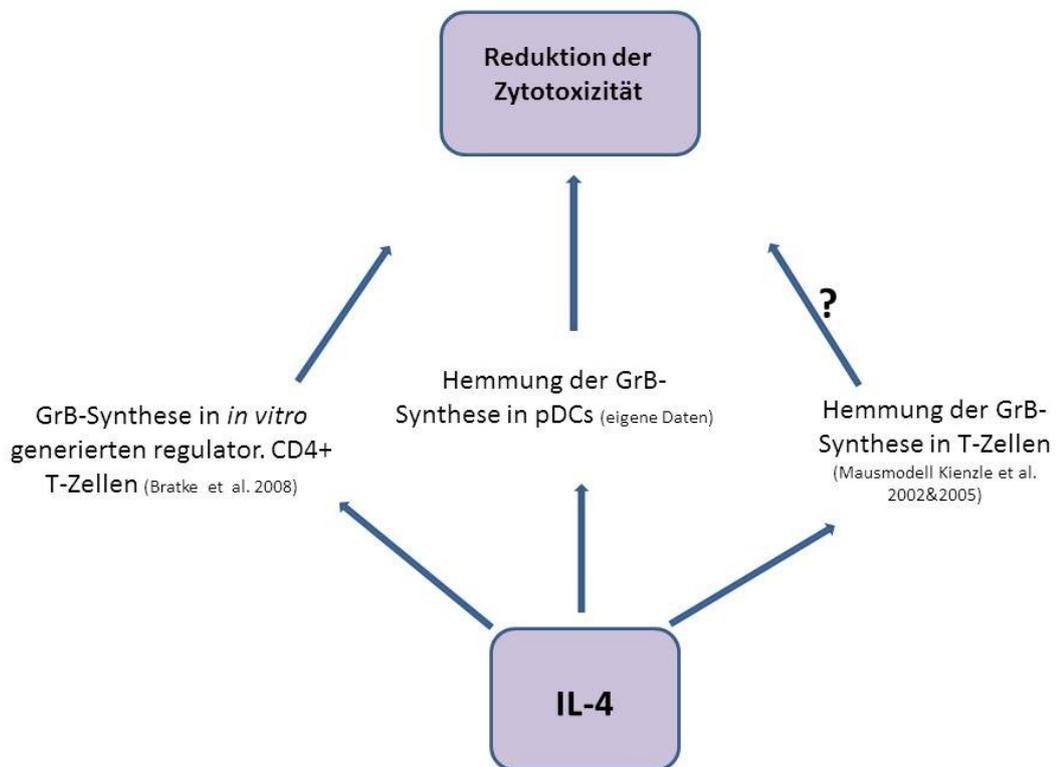


Abb. 4-2 Der Einfluss von IL-4 auf die Granzym B-Synthese in verschiedenen Zellpopulationen. IL-4 supprimiert die Granzym B-Synthese in pDCs (eigene Daten) und in vitro generierten regulatorischen T-Zellen (Bratke et al. 2008). Im Mausmodell konnten Kienzle et al. zeigen, dass IL-4 die Granzym B-Synthese in CD8⁺ T-Zellen inhibiert. Eine Reduktion der Granzym B-Synthese führt in diesen Zellen wahrscheinlich zu einer Verminderung der Zytotoxizität. Die Wirkung von IL-4 scheint jedoch vom Level der Voraktivierung abzuhängen.

4.4 Mögliche Bedeutung der Granzym B-Synthese für die Funktion der pDCs *in vivo*

pDCs repräsentieren die Verbindung zwischen nativem und adaptivem Immunsystem und spielen eine essentielle Rolle bei viralen, autoimmunen und neoplastischen Erkrankungen (Gilliet et al. 2008, Colonna et al. 2004, Waldner et al. 2009, Schettini et al. 2008). Bisher wurden unterschiedliche Funktionen von pDCs in mehreren Studien beschrieben. Eines der Hauptcharakteristika ist ihre Fähigkeit, große Mengen Typ 1- Interferone zu produzieren und zu sezernieren und somit eine antivirale Immunantwort zu initiieren und zu regulieren (Colonna et al. 2004, Gilliet et al. 2008). Weiterhin können pDCs als antigenpräsentierende Zellen verschiedene Immunantworten durch T-Zell-Aktivierung initiieren (Villadangos & Young 2008). Welche Rolle die Granzym B-Synthese für die Funktion der pDCs innerhalb des Immunsystems spielt ist bisher nicht bekannt. Granzym B zeichnet sich klassischerweise durch die Initiierung von Apoptose in Targetzellen aus (Chowdhury & Liebermann 2008, Lord et al. 2003). Eine Granzym B-vermittelte, zytotoxische Funktion der pDCs konnte in dieser Arbeit anhand der Granzym B-sensiblen Zelllinie K562 demonstriert werden (3.4).

Mehrere Studien zeigen, dass verschiedene inflammatorische Erkrankungen, u.a. virale, autoimmune und auch allergische Erkrankungen, mit erhöhten Mengen von löslichem Granzym B einhergehen (Buzza et al. 2006, Jahrsdörfer et al. 2010). Das erhöhte Vorkommen von pDCs am Entzündungsort (Jahnsen et al. 2000, Bangert et al. 2003, Bratke et al. 2006, Bratke et al. 2004, Bratke et al. 2010) weist daraufhin, dass zumindest ein Teil des dort vorhandenen, löslichen Granzym B von pDCs stammen könnte. Eine Beteiligung der pDCs bei der Genese dieser Erkrankungen ist somit sehr wahrscheinlich. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Granzym B-Synthese in pDCs durch den Einfluss von TLR-Liganden supprimiert wird (3.2). Es kann somit die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Granzym B-vermittelte Zytotoxizität der pDCs durch TLR-Liganden reduziert wird. Dagegen zeigten Chaperot et al. 2006 bereits, dass TLR-Liganden die TRAIL-vermittelte Apoptose durch pDCs induzieren und das Virus-stimulierte pDCs TRAIL-abhängig Virus-infizierte A549-Zellen direkt eliminieren können. Eine mögliche Rolle des von pDCs synthetisierten Granzym Bs bei der antiviralen bzw. antibakteriellen Immunantwort konnte durch die Erkenntnisse dieser Arbeit weitestgehend ausgeschlossen werden, da die Granzym B-Expression in pDCs in Anwesenheit von TLR7- und TLR9-Liganden stark supprimiert wird (3.2). Somit scheinen pDCs diese beiden zytotoxischen Mechanismen für unterschiedliche immunologische Mechanismen zu nutzen.

Eine mögliche Bedeutung für die Granzym B-Synthese in pDCs ist die Vermittlung von Immuntoleranz. Für pDCs wurden bisher sowohl Immunsystem-aktivierende als auch immunsupprimierende Wirkungen beschrieben (Fallarino et al. 2004, Colonna et al. 2004, Steinmann 2007, Hadeiba et al. 2008). So vermutet eine Studie, dass pDCs in der Lage sind, $CD4^+ CD25^+$ regulatorische T-Zellen zu induzieren (Mosemann et al. 2004). Außerdem induziert die Stimulation von pDCs mit den Liganden CTLA4-Ig oder OX2(CD200)-Ig die Synthese der 2,3-Dioxygenase, die eine starke Suppression der T-Zell-Proliferation vermittelt (Fallarino et al. 2004). pDCs haben demnach sowohl Immunsystem-aktivierende als auch Immunsystem-supprimierende Funktionen und scheinen eine essenzielle Rolle bei der Feinregulierung des Gleichgewichtes zwischen effektiver Immunantwort und Unterdrückung von Auto-Reaktivität zu spielen. Einige Studien vermuten, dass IL-3 sowie das immunsuppressive Zytokin IL-10 einen eher tolerogenen pDC-Phänotyp generieren, aus dem die Suppression von T-Zell-Immunantworten resultiert (Grouard et al. 1997, Beckebaum et al. 2004, Duramad et al. 2003). Im Gegensatz dazu, wird dem Einfluss von TLR7-, TLR9- sowie CD40-Liganden auf pDCs die Induktion einer pro-inflammatorischen Immunantwort inklusive der T-Zell-Aktivierung zugeschrieben (Villadangos et al. 2008, Jaehn et al. 2008, Marschner et al. 2005). Die Granzym B-Synthese in pDCs ist mittels IL-3 stark stimulierbar und durch TLR7- und TLR9-Liganden supprimierbar (3.2). Diese Erkenntnisse sprechen für eine immunsupprimierende Wirkung durch Granzym B. Einige Studien konnten bereits demonstrieren, dass adaptive regulatorische T-Zellen Granzym B-abhängig den Zelltod in autologen Zellen wie z.B. aktivierten T-Zellen initiieren und somit Immuntoleranz vermitteln können (Grossmann et al. 2004a und 2004b, Gondek et al. 2005). De Heer et al. 2004 zeigten im Mausmodell, dass pDCs in der Lunge Immuntoleranz gegen harmlose Antigene vermitteln, wobei der zugrundeliegende Mechanismus bislang unbekannt ist. In dieser Studie an Mäusen mit einem pDC-Mangel führte die Inhalation von normalerweise harmlosen Antigenen zu einer TH2-Immunantwort und den Kardinalsymptomen von Asthma. So könnten pDCs durch die Initiierung eines Granzym B-vermittelten Zelltodes in autologen Immunzellen eine immunsupprimierende Funktion aufweisen, analog zu den regulatorischen T-Zellen. Allerdings konnten in weiteren Analysen unserer Arbeitsgruppe keine physiologischen Targetzellen wie z.B. naive oder aktivierte $CD4^+$ oder $CD8^+$ T-Zellen, Monozyten oder verschieden differenzierte mDCs, identifiziert werden (Bratke et al. 2010). Jedoch könnten es sein, dass die *in vitro* Stimulation der pDCs mit IL-3 und die *in vitro* Generation bzw. Aktivierung der autologen Zellen nicht ausreichend war, um die Expression aller für den Targetzell/pDC-Kontakt benötigten Oberflächenmoleküle zu induzieren. Jahrsdörfer et al. 2010 demonstrieren aktuell, dass $CD4^+$ T-Zellen das von pDCs sezernierte Granzym B aufnehmen und dadurch die T-Zell-Proliferation supprimiert wird. Mittels der Spinning-Disk konfokalen Mikroskopie konnte in der

genannten Studie beobachtet werden, dass CD4⁺ T-Zellen das von pDCs sezernierte Granzym B aufnehmen und es dadurch im Anschluss zu einer Verminderung der T-Zellproliferationsrate kommt. Bei der Inkubation von Granzym B-negativen pDC-Vorstufen mit CD4⁺ T-Zellen zeigte sich keine Aufnahme von Granzym B in die T-Zellen. Somit konnte demonstriert werden, dass das in die CD4⁺ T-Zellen aufgenommene Granzym B wirklich von den pDCs stammte und nicht aus CD4⁺ T-Zellen kommt (Jahrsdörfer et al. 2010). Es ist also davon auszugehen, dass pDCs mittels Synthese und Sezernierung von Granzym B einen Einfluss auf andere Zellen *in vitro* ausüben. Diese Studie postuliert, dass pDCs über Granzym B eine immunmodulierende Rolle ähnlich der regulatorischen T-Zellen einnehmen (Gondek et al. 2005, Vignali et al. 2008). So sollen pDCs eine Auto-Reaktivität von präaktivierten T-Zellen verhindern können, indem sie z.B bei viralen Infektionen eine frühe T-Zell-Antwort inhibieren. Die Akute Phase von viralen Infektionen geht mit großen Mengen extrazellulären Granzym Bs einher (Buzza et al. 2006). Es ist allerdings davon auszugehen, dass pDCs keinen großen Anteil dieses Granzym B-Aufkommens bereitstellen, da TLR-Liganden die Granzym B-Synthese in pDCs supprimieren (3.2). Die Entwicklung hochspezifischer T-Zellen führt zu einer Expression von Co-stimulatorischen Molekülen wie z.B. CD40L (Diehl et al. 2000), die dann eine Suppression der Granzym B-Expression in pDCs bewirkt und somit die frühe T-Zell-Expansion erlaubt. Die Studie von Jahrsdörfer et al. 2010 konnte jedoch nicht klären, durch welche Granzym B-abhängigen Mechanismen genau die Minderung der T-Zell-Expansion zustande kommt. Es ist vorstellbar, dass Granzym B entweder den Zelltod in den CD4⁺ T-Zellen einleiten kann oder auf die Replikationsrate einen hemmenden Einfluss ausübt (Wieckowski et al. 2002, Loeb et al. 2006, Jahrsdörfer et al. 2010). Eine Zytotoxizität der pDCs gegenüber CD4⁺ T-Zellen konnte durch unsere Arbeitsgruppe *in vitro* nicht nachgewiesen werden (Bratke et al. 2010). Dennoch ist ein solcher Mechanismus *in vivo* nicht auszuschließen. *In vitro* konnte bereits eine Granzym B-vermittelte Initiation des Zelltodes in den Granzym B-sensiblen K562-Zellen sowie eine Beeinflussung von CD4⁺ T-Zellen demonstriert werden (Matsui et al. 2009, Bratke et al. 2010, Jahrsdörfer et al. 2010). Ob die erlangten Erkenntnisse auch für pDCs *in vivo* gelten und auf den menschlichen Körper übertragbar sind, ist nicht bekannt.

Inwiefern pDCs eine Rolle bei der Entstehung bzw. Dynamik von autoimmunen sowie neoplastischen Erkrankungen spielen, ist derzeit noch nicht vollkommen geklärt. PDCs sind in erhöhter Anzahl am allergischen Entzündungsort (Jansen et al. 2000, Bangert et al. 2003, Bratke et al. 2006) sowie im peripheren Blut von Atopikern (Uchida et al. 2001, Matsuda et al. 2002, Hashizume et al. 2005) vorhanden. Ob pDCs eine TH1- oder TH2-Immunantwort initiieren,

scheint von dem vorherrschendem Mikromilieu und der daraus resultierenden Voraktivierung durch TH1- oder TH2-Mediatoren abhängig zu sein (Schroeder et al. 2005). Zudem reagieren pDCs aus dem Blut von Atopikern und Nicht-Atopikern unterschiedlich auf IL-4 (Uchida et al. 2001). In dieser Arbeit konnte bei Normalprobanden eine Suppression der Granzym B-Synthese in IL-3 stimulierten pDCs unter Einfluss von IL-4 gezeigt werden (3.3). Bei pDCs aus dem Blut von Atopikern wird allerdings die IL-3 induzierte Überlebenszeit unter dem Einfluss von IL-4 gesteigert (Uchida et al. 2001). Das bei Allergikern vorherrschende TH2-Milieu könnte demnach die Entwicklung und Differenzierung von pDCs so beeinflussen, dass sie keine Immuntoleranz mehr gegen Allergene vermitteln können. Somit könnte die Entstehung einer allergischen bzw. autoimmunen Erkrankung begünstigt werden und der Mechanismus der Granzym B-vermittelten Toleranzinduktion außer Kraft gesetzt werden. Das pDCs unter TH2-Bedingungen ein TH2-polarisierendes Potential aufweisen (Farkas et al. 2004), könnte die allergische Entzündungsreaktion verstärken und aufrechterhalten. Zudem sezernieren in einem TH2-Milieu differenzierte pDCs nach TLR7-Stimulation vermehrt IL-4 (Bratke et al. 2011). In weiterführenden Experimenten unserer Arbeitsgruppe konnten erhöhte Granzym B-Spiegel in endobronchialen pDCs von Atopikern nach segmentaler Allergenprovokation detektiert werden (Bratke et al. 2010). Außerdem wurden erhöhte Mengen an löslichem Granzym B in der BALF nachgewiesen, ähnlich wie zuvor in den Studien von Tschopp et al. 2006 und Bratke et al. 2004. Von welchen Zellen dieses Granzym B stammt ist nicht genau bekannt. Es konnte in mehreren Studien eine erhöhte pDC-Anzahl im peripheren Blut von Atopikern nachgewiesen werden (Uchida et al. 2001, Matsuda et al. 2002, Hashizume et al. 2005). Dennoch bleibt unbekannt, inwiefern pDCs an der Sekretion von Granzym B in den Atemwegen von Atopikern beteiligt sind.

Schettini et al. (2008) machten die Beobachtung, dass pDCs in erhöhter Anzahl in verschiedene Tumore infiltrieren und offenbar eine zentrale Rolle in der Tumor-Immunität spielen. Weiterhin ist bekannt, dass das für die Granzym B-Expression in pDCs hauptsächlich verantwortliche IL-3 sowie IL-10 vermehrt im Milieu neoplastischer Erkrankungen vorkommen (Beckebaum et al. 2004, Mustea et al. 2009, Aldinucci et al. 2005). Es könnte daher angenommen werden, dass pDCs Granzym B-abhängig eine Expansion von Tumor-spezifischen T-Zellen reduzieren und somit zu der immunsuppressiven Wirkung neoplastischer Erkrankung beitragen könnten. Dieser Zusammenhang bleibt jedoch bisher ungeklärt. Es sind weitere Studien notwendig um eine mögliche Granzym B-vermittelte Rolle von pDCs bei autoimmunen sowie neoplastischen Erkrankungen zu klären. Klassischerweise ist Granzym B in den Granula zytotoxischer Zellen enthalten und dient der Induktion von Apoptose in von CTLs erkannten Zielzellen (Chowdhury et al. 2008, Lord et al. 2003). Dennoch sind inzwischen weitere Funktionen für Granzym B

beschrieben worden. Dazu zählen Zytokin-ähnliche Effekte (Metkar et al. 2003), Spaltung von Rezeptoren (Loeb et al. 2006, Wieckowski et al. 2002), immunsuppressive Funktionen (Buzza et al. 2006, Romero et al. 2008, Devadas et al. 2006, Gondek et al. 2005), Abbau für die Virus-Replikation wichtiger viraler Proteine (Romero et al. 2008) sowie der Abbau und das Remodelling von extrazellulärer Matrix (Froelich et al. 1993). In zwei Studien wird beschrieben, dass Granzym B das Remodelling extrazellulärer Matrix durch die Spaltung von Vitronectin, Fibronectin und Laminin beeinflusst. Dieser Prozess führt durch den Verlust von Zell-Zellkontakten zum Zelltod (Pardo et al. 2007, Buzza et al. 2005). Somit sind auch extrazelluläre Funktionen des von pDCs stammenden Granzym B denkbar, wie z.B. das Remodelling der Atemwegsepithelien bei Asthmatikern. Genauere Zusammenhänge sind derzeit noch nicht bekannt und bedürfen weiterer Forschung.

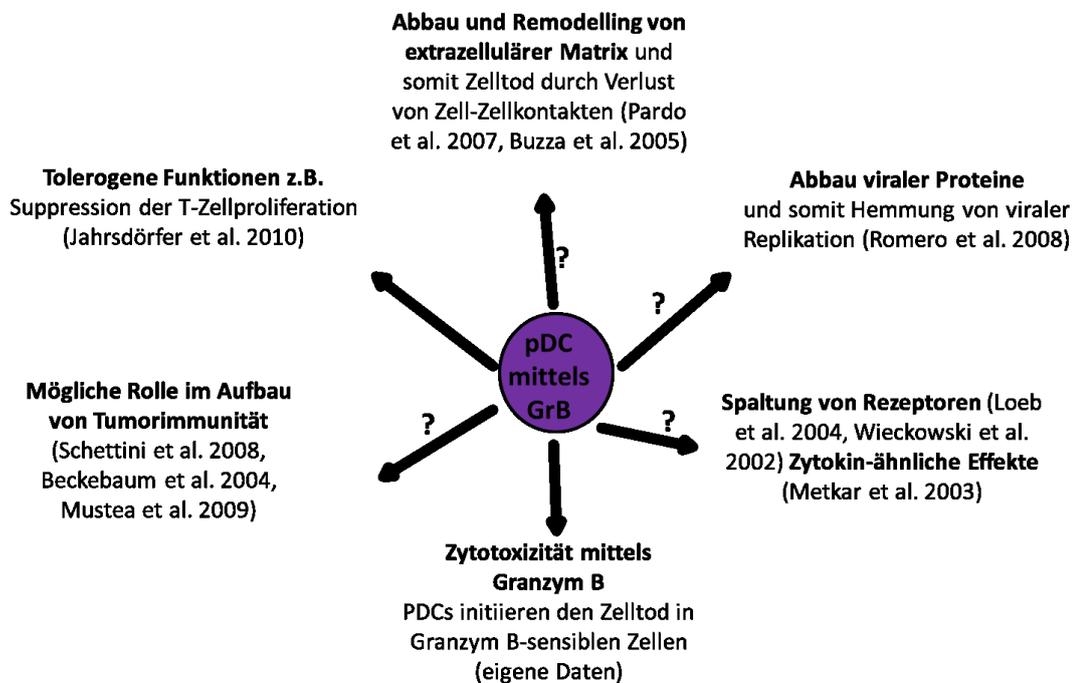


Abb. 4-3 Mögliche Granzym B-vermittelte Funktionen von pDCs. In dieser Arbeit konnte eine Granzym B-vermittelte Zytotoxizität gegenüber der Tumorzelllinie K562 demonstriert werden. Es sind jedoch weitere Granzym B-abhängige Funktionen von pDCs denkbar. Jahrsdörfer et al. 2010 zeigten, dass pDCs mittels Granzym B in der Lage sind, eine Suppression der T-Zellproliferation herbeizuführen. Des Weiteren könnten pDCs eine Rolle bei der Generierung einer Immunität von Tumoren spielen (Schettini et al. 2008, Beckebaum et al. 2004, Mustea et al. 2009). Außerdem wurden inzwischen weitere Funktionen für Granzym B beschrieben, wie z.B. die Spaltung von Rezeptoren (Loeb et al. 2004, Wieckowski et al. 2002), Zytokin-ähnliche Effekte (Metkar et al. 2003), Abbau viraler Proteine (Romero et al. 2008) sowie Abbau und Remodelling von extrazellulärer Matrix (Pardo et al. 2007, Buzza et al. 2005).

5 Zusammenfassung

MDCs und pDCs bilden als Teil der angeborenen Immunität die Verbindung zwischen angeborenem und adaptivem Immunsystem und spielen eine essentielle Rolle bei viralen, autoimmunen und neoplastischen Erkrankungen. Für beide DC-Populationen sind bereits viele verschiedene pro-inflammatorische aber auch immunsupprimierende Mechanismen beschrieben worden. In vorangehenden Arbeiten konnte gezeigt werden, dass pDCs das zytotoxische Protein Granzym B synthetisieren. Eine funktionelle Bedeutung der Granzym B-Expression in pDCs war allerdings nicht bekannt. Ziel dieser Arbeit war eine umfangreiche Expressionanalyse zytotoxischer Proteine der Granzym-Familie (Granzyme A, B, H, K, M) inklusive des funktional mit den Granzymen eng assoziierten Proteins Perforin in humanen pDCs und mDC. Zusätzlich sollte die Granzym-abhängige Funktion der DC-Populationen näher charakterisiert werden.

Während in unstimulierten mDCs aus dem peripheren Blut keine Granzym- und Perforin-Expression nachgewiesen werden konnte, zeigten pDCs auf mRNA- sowie auf Protein-Ebene eine deutliche Expression von Granzym B, die durch Stimulation mit IL-3 stark anstieg. Fluoreszenzmikroskopisch zeigte Granzym B eine granuläre Verteilung im Zytoplasma der pDCs. Die Expression weiterer Granzyme sowie von Perforin konnte in naiven pDCs nicht nachgewiesen werden. Um erste Hinweise auf die Bedeutung der Granzym B-Expression für die Funktion der pDCs zu erlangen, wurden diese mit unterschiedlichen Zytokinen stimuliert. Hier zeigte lediglich IL-4 eine leichte, aber signifikante Suppression der Granzym B-Synthese, während GM-CSF, IL-6 und IFN- γ keinen signifikanten Effekt hatten. Eine mögliche anti-virale/bakterielle Funktion der Granzym B-Expression in pDCs wurde durch Stimulation mittels Toll-like Rezeptor 7 und 9 Agonisten untersucht. Hier zeigte sich eine starke signifikante Suppression der Granzym B-Synthese durch Imiquimod (TLR7-Agonist) und ODN2006 bzw. ODN2216 (TLR9-Agonisten).

Die funktionelle Expression von Granzym B in pDCs konnte schließlich in einem Zytotoxizitätsassay nachgewiesen werden. Hier zeigte sich, dass pDCs in K562-Zellen einen Granzym B- und Caspase-abhängigen Zelltod initiieren können. Die nicht nachweisbare Expression von Perforin zeigt zudem, dass der pDC-induzierte Zelltod Perforin-unabhängig ist. Physiologische Zielzellen konnten bisher jedoch nicht identifiziert werden.

Diese Arbeit zeigt die selektive und funktionelle Expression von Granzym B in pDCs. Zudem lässt die Suppression der Granzym B-Synthese in pDCs durch das pro-inflammatorische Th2-Zytokin IL-4 sowie durch Toll-like Rezeptor 7 und 9 Agonisten vermuten, dass der Granzym B-

abhängige Zelltod keine Rolle bei der Parasitenabwehr bzw. bei der Bekämpfung bakterieller bzw. viraler Infekte spielt. Möglicherweise ist dieser Mechanismus für immunregulierende Funktionen der pDCs von Bedeutung, wie bereits für regulatorische T-Zellen beschrieben.

6 Literaturverzeichnis

1. **Aldinucci D, Olivo K, Lorenzon D, Poletto D, Gloghini A, Carbone A, Pinto A.**
The role of interleukin-3 in classical Hodgkin's disease. *Leuk Lymphoma*. 2005 Mar;46(3):303-11. Review.
2. **Alimonti JB, Shi L, Baijal PK, Greenberg AH.**
Granzyme B induces BID-mediated zytochrome c release and mitochondrial permeability transition. *J. Biol. Chem*. 2001; 276: 6974- 6982.
3. **Arpinati M, Green CL, Heimfeld S, Heuser JE, Anasetti C.**
Granulocyte-colony stimulating factor mobilizes T helper 2-inducing dendritic cells. *Blood* 2000; 95: 2484-2490.
4. **Austyn JM.**
Lymphoid dendritic cells. *Immunology*. 1987 Oct;62(2):161-70. Review
5. **Banchereau J.**
Dendritic cells: therapeutic potentials. *Transfus Sci*. 1997 Jun; 18(2):313-26.
6. **Banchereau J, Steinmann RM.**
Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392: 245- 252.
7. **Bangert C, Friedl J, Stary G, Stingl G, Kopp T.**
Immunopathologic features of allergic contact dermatitis in humans: participation of plasmazytoid dendritic cells in the pathogenesis of the disease? *J Invest Dermatol*. 2003 Dec;121(6):1409-18
8. **Beckebaum S, Zhang X, Chen X, Yu Z, Frilling A, Dworacki G, Grosse-Wilde H, Broelsch CE, Gerken G, Cicinnati VR.**
Increased levels of interleukin-10 in serum from patients with hepatocellular carcinoma correlate with profound numerical deficiencies and immature phenotype of circulating dendritic cell subsets. *Clin Cancer Res*. 2004 Nov 1;10(21):7260-9.
9. **Blom B, Ho S, Antoneko S, Liu YJ.**
Generation of interferon α -producing predendritic cell (Pre-DC)2 from human CD34+ hematopoietic stemm cells. *J. Exp. Med*. 2000; 192: 1785-1796.

- 10. Bonifaz L, Bonnyay D, Mahnke K, Rivera M, Nussenzweig MC, Steinman RM.**
Efficient targeting of protein antigen to the dendritic cell receptor DEC-205 in the steady state leads to antigen presentation on major histocompatibility complex class I products and peripheral CD8⁺ T cell tolerance. *J Exp Med.* 2002 Dec 16;196(12):1627-38
- 11. Bratke K, Böttcher B, Leeder K, Schmidt S, Küpper M, Virchow JC JR, Luttmann W.**
Increase in granzyme B⁺ lymphocytes and soluble granzyme B in bronchoalveolar lavage of allergen challenging patients with atopic asthma. *Clin Exp Immunol.* 2004; 136(3): 542-48.
- 12. Bratke K, Haupt F, Kuepper M, Bade B, Faehndrich S, Luttmann W, Virchow JC JR.**
Decrease of cytotoxic T cells in allergic asthma correlates with total serum immunoglobulin E. *Allergy* 2006; 61: 1351-1357.
- 13. Bratke K, Goettsching H, Kuepper M, Geyer S, Luttmann W, Virchow JC.**
Interleukin-4 suppresses the cytotoxic potential of in vitro generated, adaptive regulatory CD4 T cells by down-regulation of granzyme B. *Immunology.* 2009 Jul;127(3):338-44. Epub 2008 Dec 23.
- 14. Bratke K, Nielsen J, Manig F, Klein C, Kuepper M, Geyer S, Julius P, Lommatzsch M, Virchow JC JR.**
Functional expression of granzyme B in human plasmacytoid dendritic cells: a role in allergic inflammation. *Clin Exp Allergy* 2010
- 15. Bratke K, Klein C, Kuepper M, Lommatzsch M, Virchow JC.**
Differential development of plasmacytoid dendritic cells in Th1- and Th2-like cytokine milieu. *Allergy.* 2011 Mar;66(3):386-95. doi: 10.1111/j.1398-9995.2010.02497.x. Epub 2010 Oct 29.
- 16. Buzza MS, Zamurs L, Sun J, Bird CH, Smith AI, Trapani JA, Froelich CJ, Nice EC, Bird PI.**
Extracellular matrix remodeling by human granzyme B via cleavage of vitronectin, fibronectin, and laminin. *J Biol Chem.* 2005 Jun 24;280(25):23549-58. Epub 2005 Apr 19.
- 17. Buzza MS, Bird PI.**
Extracellular granzymes: current perspectives. *Biol Chem.* 2006 Jul;387(7):827-37. Review.

- 18. Cella M. et al.**
Plasmazytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type 1 interferon. *Nat. Med.* 1999; 5: 919-923.
- 19. Chaperot L. et al.**
Leukemic plasmazytoid dendritic cells share phenotypic and functional features with their normal counterparts. *Eur. J.Immunol.* 2004; 34: 418-426.
- 20. Chaperot L, Blum A, Manches O, Lui G, Angel J, Molens JP, Plumas J.**
Virus or TLR agonists induce TRAIL-mediated cytotoxic activity of plasmazytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2006 Jan 1;176(1):248-55.
- 21. Chen W. et al.**
Thrombopoietin cooperates with FLT-3-ligand in the generation of plasmazytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood* 2004; 103: 2547- 2553.
- 22. Chowdhury D, Lieberman J.**
Death by a thousand cuts: granzyme pathways of programmed cell death. *Annu Rev Immunol.* 2008;26:389-420.
- 23. Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ.**
Plasmazytoid dendritic cells in immunity. *Nature* 2004; 12: 1219-1226.
- 24. Corcoran L. et al.**
The lymphoid past of mouse plasmazytoid dendritic cells and thymic dendritic cells. *J Immunol.* 2003; 170: 4926-4932.
- 25. Cullen SP, Martin SJ.**
Mechanisms of granule-dependent killing. *Nature* 2008; 15: 251-262.
- 26. Cyster JG.**
Chemokines and cell migration in secondary lymphoid organs. *Science.* 1999 Dec 10;286(5447):2098-102
- 27. Davies DR, Cohen GH.**
Interactions of protein antigens with antibodies. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1996; 93: 7-12.
- 28. De Heer HJ, Hammad H, Soullié T, Hijdra D, Vos N, Willart MA, Hoogsteden HC, Lambrecht BN.**
Essential role of lung plasmazytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *J Exp Med.* 2004 Jul 5;200(1):89-98.
- 29. Del Hoyo GM. et al.**
Characterization of a common precursor population for dendritic cells. *Nature* 2002; 415: 1043-1047.

30. **Devadas S, Das J, Liu C, Zhang L, Roberts AI, Pan Z, Moore PA, Das G, Shi Y.**
Granzyme B is critical for T cell receptor-induced cell death of type 2 helper T cells. *Immunity*. 2006 Aug;25(2):237-47. Epub 2006 Aug 10.
31. **Diehl L, Den Boer AT, van der Voort EI, Melief CJ, Offringa R, Toes RE.**
The role of CD40 in peripheral T cell tolerance and immunity. *J Mol Med (Berl)*. 2000;78(7):363-71.
32. **Duramad O, Fearon KL, Chan JH, Kanzler H, Marshall JD, Coffman RL, Barrat FJ**
IL-10 regulates plasmacytoid dendritic cell response to CpG-containing immunostimulatory sequences. *Blood*. 2003 Dec 15;102(13):4487-92. Epub 2003 Aug 28.
33. **Dzionic A. et al.**
BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type 2 C-type lectin, mediates antigen capture and is a potent inhibitor of interferon α/β induction. *J Exp Med* 2001; 194: 1823-1834.
34. **Dzionic A. et al.**
Plasmacytoid dendritic cells: from specific surface markers to specific cellular functions. *Hum. Immunol*. 2003; 63: 1133-1148.
35. **Fallarino F et al.**
Murine plasmacytoid dendritic cells initiate the immunosuppressive pathway of tryptophan catabolism in response to CD200 receptor engagement. *J Immunol*. 2004 Sep 15;173(6):3748-54.
36. **Farkas L, Kvale EO, Johanson FE, Jahnsen FL, Lund-Johansen F.**
Plasmacytoid dendritic cells activate allergen-specific TH2-memory cells: modulation by CpG oligodeoxynucleotides. *J Allergy Clin Immunol* 2004; 114: 436-443.
37. **Fazekas De St Groth B et al.**
Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester and the virgin lymphocyte: A marriage made in heaven. *Immunology and Cell Biology* 1999; 77: 530-538.
38. **Fazekas De St Groth B et al.**
Experimental models linking dendritic cell lineage, phenotype and function *Immunol Cell Biol*. 2002 Oct;80(5):469-76. Review
39. **Fellows E, Gil-Parrado S, Jenne DE, Kurschus FC.**
Natural killer cell-derived human granzyme H induces an alternative, caspase-independent cell-death program. *Blood* 2007; 110(2): 544-552.

40. **Froelich CJ, Zhang X, Turbov J, Hudig D, Winkler U, Hanna WL.**
Human granzyme B degrades aggrecan proteoglycan in matrix synthesized by chondrocytes. *J Immunol.* 1993 Dec 15;151(12):7161-71.
41. **Ganten D, Ruckpaul K**
Handbuch der Molekularen Medizin: Immunsystem und Infektiologie. *Springer-Verlag Berlin Heidelberg* 1999.
42. **Gilliet M, Cao W, Liu YJ.**
Plasmazytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nat Rev Immunol.* 2008; 8: 594-606.
43. **Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ.**
Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol.* 2005; 174:1783–1786.
44. **Grabbe S, Kämpgen E, Schuler G.**
Dendritic cells: multi-lineal and multi-functional. *Immunol Today.* 2000 Sep;21(9): 431-3.
45. **Grossman WJ, Verbsky JW, Barchet W, Colonna M, Atkinson JP, Ley TJ.**
Human T regulatory cells can use the perforin pathway to cause autologous target cell death. *Immunity* 2004 (A); 21:589–601.
46. **Grossman WJ, Verbsky JW, Tollefsen BL, Kemper C, Atkinson JP, Ley TJ.**
Differential expression of granzymes A and B in human cytotoxic lymphocyte subsets and T regulatory cells. *Blood* 2004 (B); 104:2840–8.
47. **Grouard G, Rissoan MC, Filgueira L, Durand I, Banchereau J, Liu YJ.**
The enigmatic plasmazytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin (IL)-3 and CD40-ligand. *J Exp Med.* 1997 Mar 17;185(6):1101-11.
48. **Hadeiba H, Sato T, Habtezion A, Oderup C, Pan J, Butcher EC.**
CCR9 expression defines tolerogenic plasmazytoid dendritic cells able to suppress acute graft-versus-host disease. *Nat Immunol.* 2008 Nov;9(11):1253-60. Epub 2008 Oct 5.
49. **Hashizume H, Horibe T, Yagi H, Seo N, Takigawa M.**
Compartmental imbalance and aberrant immune function of blood CD123+ (plasmazytoid) and CD11c+ (myeloid) dendritic cells in atopic dermatitis. *J Immunol.* 2005 Feb 15;174(4):2396-403.

-
50. **Heibein JA. et al.**
Granzyme B-mediated zytochrome c release is regulated by the Bcl-2 family members Bid and Bax. *J. Exp. Med.* 2000; 192: 1391-1402.
51. **Heufler C, Koch F, Schuler G.**
Granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 1 mediate the maturation of murine epidermal Langerhans cells into potent immunostimulatory dendritic cells. *J Exp Med.* 1988 Feb 1;167(2):700-5
52. **Hou Q, Zhao T, Zhang H, Lu H, Zhang Q, Sun L, Fan Z.**
Granzyme H induces apoptosis of target tumor cells characterized by DNA fragmentation and Bid-dependent mitochondrial damage. *Mol Immunol.* 2008;45(4): 1044-55.
53. **Hsieh CS, Heimberger AB, Gold JS, O'Garra A, Murphy KM.**
Differential regulation of T helper phenotype development by interleukins 4 and 10 in an alpha beta T-cell-receptor transgenic system. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992; 89:6065–6069.
54. **Jaehn PS, Zaenker KS, Schmitz J, Dzionek A.**
Functional dichotomy of plasmazytoid dendritic cells: antigen-specific activation of T cells versus production of type I interferon. *Eur J Immunol.* 2008 Jul;38(7):1822-32.
55. **Jahnsen FL, Lund-Johansen F, Dunne JF, Farkas L, Haye R, Brandtzaeg P.**
Experimentally induced recruitment of plasmazytoid (CD123high) dendritic cells in human nasal allergy. *J Immunol.* 2000 Oct 1;165(7):4062-8
56. **Jahrsdörfer B. et al.**
Granzyme B produced by human plasmazytoid dendritic cells suppresses T-cell expansion. *Blood* 2010; 115: 1156-1165.
57. **Julia V et al.**
Priming by microbial antigens from the intestinal flora determines the ability of CD4+ T cells to rapidly secrete IL-4 in BALB/c mice infected with *Leishmania major*. *J Immunol.* 2000; 165(10):5637-45.
58. **Jonuleit H et al.**
Pro-inflammatory zytokines and prostaglandins induce maturation of potent immunostimulatory dendritic cells under fetal calf serum-free conditions. *Eur J Immunol.* 1997 Dec;27(12):3135-42
59. **Kawamura K et al.**
Virus-stimulated plasmazytoid dendritic cells induce CD4+ zytotoxic regulatory T cells. *Blood* 2006;107:1031-8.

- 60. Kienzle N, Buttigieg K, Groves P, Kawula T, Kelso A.**
A clonal culture system demonstrates that IL-4 induces a subpopulation of nonzytolytic T cells with low CD8, perforin, and granzyme expression. *J Immunol.* 2002; 168:1672–81.
- 61. Kienzle N, Olver S, Buttigieg K, Groves P, Janas ML, Baz A, Kelso A.**
Progressive differentiation to a poorly zytolytic CD8low phenotype in the presence of IL-4. *J Immunol.* 2005; 174:2021–9.
- 62. Kohrgruber N. et al.**
Survival, maturation and function of CD11c- and CD11c+ peripheral blood dendritic cells are differentially regulated by zytokines. *J Immunol* 1999; 163: 3250-3259.
- 63. Kuwana T. et al.**
Bid, Bax and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane. *Cell* 2002; 111: 331-342.
- 64. Lennert K, Remmele W.**
Karyometric research on lymph node cells in man. I. Germinoblasts, lymphoblasts & lymphocytes. *Acta Haematol.* 1958; 19: 99-113.
- 65. Liebermann J.**
The ABCS of granule-mediated zytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nature* 2003; 3: 361-370.
- 66. Loeb CR, Harris JL, Craik CS.**
Granzyme B proteolyzes receptors important to proliferation and survival, tipping the balance toward apoptosis. *J Biol Chem.* 2006 Sep 22;281(38):28326-35. Epub 2006 Jun 23.
- 67. Lord SJ, Rajotte RV, Korbitt GS, Bleackley RC.**
Granzyme B: a natural born killer. *Immunol Rev.* 2003 Jun;193:31-8.
- 68. Lucas, M. et al.**
Dendritic cells prime natural killer cells by trans-presenting interleukin 15. *Immunity.* 26, 2007, 4: 503-517
- 69. Marschner A, Rothenfusser S, Hornung V, Prell D, Krug A, Kerkmann M, Wellisch D, Poeck H, Greinacher A, Giese T, Endres S, Hartmann G.**
CpG ODN enhance antigen-specific NKT cell activation via plasmazytoid dendritic cells. *Eur J Immunol.* 2005 Aug;35(8):2347-57.

- 70. Matsuda H et al.**
Alteration of balance between myeloid dendritic cells and plasmazytoid dendritic cells in peripheral blood of patients with asthma. *Am J Respir Crit Care Med.* 2002 Oct 15;166(8):1050-4
- 71. Matsui T et al.**
CD2 distinguishes two subsets of human plasmazytoid dendritic cells with distinct phenotype and functions. *J Immunol.* 2009; 182(11): 6815-6823.
- 72. Matsuno K, Ezaki T, Kudo S, Uehara Y.**
A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their terminal division, active phagozytosis, and translocation from the liver to the draining lymph. *J Exp Med.* 1996 Apr 1;183(4):1865-78
- 73. Matzinger P.**
Tolerance, danger, and the extended family. *Annu Rev Immunol.* 1994;12:991-1045.
- 74. McDonald G, Shi L, Vande Velde C, Liebermann J, Greenberg AH.**
Mitochondrial-dependent and- independent regulation of granzyme B-induced apoptosis. *J. Exp. Med.* 1999; 189: 131-144.
- 75. Mellman I, Steinman RM**
Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines. *Cell.* 2001 Aug 10;106(3):255-8.
- 76. Metkar S. et al.**
Granzyme B activates procaspase-3 which signals a mitochondrial amplification loop for maximal apoptosis. *J. Cell Biol.* 2003; 160: 875-885.
- 77. Mosemann EA, Liang X, Dawson AJ et al.**
Human plasmazytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+ CD25+ regulatory T cells. *J Immunol* 2004; 173:4433-42.
- 78. Mustea A, Braicu EI, Koensgen D, Yuan S, Sun PM, Stamatian F, Lichtenegger W, Chen FC, Chekerov R, Sehouli J.**
Monitoring of IL-10 in the serum of patients with advanced ovarian cancer: results from a prospective pilot-study. *Zytokine.* 2009 Jan;45(1):8-11. Epub 2008 Dec 13.
- 79. Niess JH, Reinecker HC.**
Lamina propria dendritic cells in the physiology and pathology of the gastrointestinal tract. *Curr Opin Gastroenterol.* 2005 Nov;21(6):687-91. Review
- 80. O'Doherty U. et al.**
Human blood contains two subsets of dendritic cells, one immunologically mature and the other immature. *Immunology* 1994; 487-493.

-
- 81. Pardo J, Wallich R, Ebnet K, Iden S, Zentgraf H, Martin P, Ekiciler A, Prins A, Müllbacher A, Huber M, Simon MM.**
Granzyme B is expressed in mouse mast cells *in vivo* and *in vitro* and causes delayed cell death independent of perforin. *Cell Death Differ.* 2007 Oct;14(10):1768-79. Epub 2007 Jun 29.
- 82. Parish CR.**
Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies. *Immunology and Cell Biology* 1999; 77: 499–508.
- 83. Pulendran B. et al.**
Flt-3-ligand and granulocyte colony-stimulating factor mobilize distinct human dendritic cell subsets *in vivo*. *J. Immunol.* 2000; 165: 566-572.
- 84. Randolph GJ, Angeli V, Swartz MA.**
Dendritic-cell trafficking to lymph nodes through lymphatic vessels. *Nat Rev Immunol.* 2005 Aug;5(8):617-28. Review
- 85. Reid TR, Merigan TC, Basham TY.**
Resistance to interferon-alpha in a mouse B-cell lymphoma involves DNA methylation. *J Interferon Res.* 1992 Apr;12(2):131-7.
- 86. Rissoan MC. et al.**
Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 1999; 238: 1183-1186.
- 87. Rissoan MC. et al.**
Subtractive hybridization reveals the expression of immunoglobulin-like transcript 7, Eph-B1, granzyme B and novel transcripts in human plasmacytoid dendritic cells. *Blood* 2002; 100: 3295-3303.
- 88. Roake JA.**
Pathways of dendritic cell differentiation and development. *Eye (Lond).* 1995;9 (Pt 2):161-6
- 89. Robinson SP et al.**
Human peripheral blood contains two distinct lineages of dendritic cells. *Eur J Immunol* 1999; 29: 2769-2778.
- 90. Romero V, Andrade F.**
Non-apoptotic functions of granzymes. *Tissue Antigens.* 2008 May;71(5):409-16. Epub 2008 Mar 10. Review.
- 91. Schettini J, Mukherjee P.**
Physiological role of plasmacytoid dendritic cells and their potential use in cancer immunity. *Clin Dev Immunol.* 2008; 2008: 106321.

92. **Schroeder JT, Bieneman AP, Xiao H, Chichester KL, Vasagar K, Saini S, Liu MC.**
TLR9- and FcepsilonRI-mediated responses oppose one another in plasmacytoid dendritic cells by down-regulating receptor expression. *J Immunol.* 2005 Nov 1;175(9):5724-31.
93. **Seder RA, Paul WE, Davis MM, Fazekas de St Groth B.**
The presence of interleukin 4 during in vitro priming determines the lymphokine-producing potential of CD4+ T cells from T cell receptor transgenic mice. *J Exp Med.* 1992; 176:1091-1098.
94. **Sharif-Askari E. et al.**
Direct cleavage of the human DNA fragmentation factor-45 by granzyme B induces caspase-activated DNase release and DNA fragmentation. *EMBO J.* 2001; 20: 3101-3113.
95. **Siegal FP. et al.**
The nature of the principal type 1 interferon-producing cells in human blood. *Science* 1999; 284: 1835-1837.
96. **Sozzani S. et al.**
Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J Immunol.* 1995 Oct 1;155(7):3292-5
97. **Sozzani S, Mantovani A, Allavena P.**
Control of dendritic cell migration by chemokines. *Forum (Genova).* 1999 Oct-Dec;9(4):325-38
98. **Spits H, Couwenberg F, Bakker AQ, Weijer K, Uittenbogaart CH.**
Id2 and Id3 inhibit development of CD34+ stem cells into predendritic cell (pre-DC)2 but not into pre-DC1. Evidence for a lymphoid origin of pre-DC2. *J Exp Med* 2000; 192: 1775-1784.
99. **Steinbrink K, Mahnke K, Grabbe S, Enk AH, Jonuleit H.**
Myeloid dendritic cell: From sentinel of immunity to key player of peripheral tolerance? *Human Immunology* 2009; 289-293.
100. **Steinmann RM, Cohn ZA.**
Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J Exp Med* 1973; 137:1142-1162
101. **Steinmann RM, Cohn ZA.**
Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. II. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 1974 a; 139: 380-397.

-
- 102. Steinmann RM, Lustig DS, Cohn ZA.**
Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III. Functional properties in vitro. *J Exp Med* 1974 b;v139: 1431-1445.
- 103. Steinmann RM, Adams JC, Cohn ZA.**
Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. IV. Identification and distribution in mouse spleen. *J Exp Med* 1975; 141: 804-820.
- 104. Steinmann RM, Inaba K.**
Myeloid dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology* 1999; 66: 205-209.
- 105. Thomas DA, Scorrano L, Putchu GV, Korsmeyer SJ, Ley TJ.**
Granzyme B can cause mitochondrial depolarization and cell death in the absence of BID, BAX and BAK. *Pro. Acad. Sci. USA* 2001; 98: 14985- 14990.
- 106. Uchida Y, Kurasawa K, Nakajima H, 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.* 2001 Dec;108(6):1005-11.
- 107. van Vliet SJ et al.**
Innate signaling and regulation of Dendritic cell immunity. *Curr Opin Immunol.* 2007 Aug;19(4):435-40. Epub 2007 Jul 12. Review
- 108. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ.**
How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol.* 2008 Jul;8(7):523-32. Review.
- 109. Villadangos JA, Young L.**
Antigen-presentation properties of plasmazytoid dendritic cells. *Immunity.* 2008 Sep 19;29(3):352-61. Review.
- 110. Waldner H.**
The role of innate immune responses in autoimmune disease development. *Autoimmun Rev.* 2009; 8(5): 400-404.
- 111. Wang GQ. et al.**
Resistance to granzyme B-mediated zytochrome c release in Bak-deficient cells. *J. Exp. Med.* 2001; 194: 1325-1337.
- 112. Waterhouse NJ, Trapani JA.**
H is for helper: granzyme H helps granzyme B kill adenovirus-infected cells. *Trends Immunol.* 2007;28(9): 373-5.
- 113. Watowich S, Liu YJ.**
Mechanisms regulating dendritic cell specification and development. *Immunological Reviews* 2010; 238: 76-92

- 114. Wieckowski E, Wang GQ, Gastman BR, Goldstein LA, Rabinowich H.**
Granzyme B-mediated degradation of T-cell receptor zeta chain. *Cancer Res.* 2002 Sep 1;62(17):4884-9.
- 115. Zhu J, Guo L, Watson CJ, Hu-Li J, Paul WE.**
Stat6 is necessary and sufficient for IL-4's role in Th2 differentiation and cell expansion. *J Immunol.* 2001; 166(12):7276-81.
- 116. Zuniga EI, McGavern DB, Pruneda-Paz JL, Teng C, Oldstone MB.**
Bone marrow plasmacytoid dendritic cells can differentiate into myeloid dendritic cells upon virus infection. *Nat. Immunol.* 2004; 5: 1227-1234.
- 117. Programmed Cell Death: General Principles for Studying Cell Death**
herausgegeben von Roya Khosravi-Far, Richard A. Lockshin, Zahra Zakeri, Mauro Piacentini

7 Anhang

7.1 Thesen

1. Dendritische Zellen (DCs) sind Leukozyten, die Pathogene und Antigene erkennen, phagozytieren und somit das angeborene sowie das erworbene Immunsystem aktivieren. Des Weiteren vermitteln sie Immuntoleranz gegen Auto-Antigene. Unter Einfluss von verschiedenen Stimuli differenzieren aus pluripotenten Stammzellen myeloide oder lymphoide dendritische Zellen. DCs im Blut können über die unterschiedliche Expression von Oberflächenmolekülen als plasmazytoide Dendritische Zellen ($CD123^+CD11c^-$) beziehungsweise myeloide Dendritische Zellen ($CD123^-CD11c^+$) identifiziert werden.
2. pDCs synthetisieren das zytotoxische Protein Granzym B. Das wurde durch verschiedene Studien bereits nachgewiesen. In dieser Arbeit konnte in pDCs eine signifikante Granzym B-Expression in der FACS-Analyse nachgewiesen werden. Auf mRNA-Ebene wurde jeweils für frisch isolierte pDCs sowie für mit IL-3-stimulierten pDCs die Expression von Granzym B mittels spezifischer RT-PCR-Protokolle bestätigt. Auf diese Weise wurde die Expression von Granzym A, H, K, M und Perforin in pDCs ausgeschlossen.
3. MDCs synthetisieren keines der untersuchten zytotoxischen Proteine (Granzym A, B, K und Perforin)
4. Granzym B verteilt sich intrazellulär in pDCs in einem granulären Muster. Dies wurde mittels Fluoreszenzmikroskopie erstmals beobachtet. Durch Co-Lokalisation eines anti-Granzym-B-Antikörpers mit einem Antikörper gegen den für Granula spezifischen Marker CD63 konnte die granuläre Speicherung von Granzym B in pDCs untermauert werden.
5. Die Expression von Granzym B in pDCs wird durch verschiedene Stimulanzen beeinflusst. Über die Toll-like-Rezeptoren 7 und 9 erkennen pDCs virale und bakterielle Bestandteile und initiieren daraufhin eine Immunantwort. Die Toll-like Rezeptorliganden Imiquimod (TLR7) und ODN2216 sowie ODN2006-G (beide TLR9) induzierten eine signifikante Suppression der Granzym-B-Synthese in pDCs. Dies lässt

vermuten, dass die Granzym B-Synthese bei der antiviralen und antibakteriellen Immunantwort eine untergeordnete Rolle spielt.

6. Zytokine haben unterschiedliche Einflüsse auf die Granzym B-Synthese in pDCs. IL-3 ruft eine signifikante Stimulation der Granzym B-Synthese in pDCs hervor. GM-CSF und IL-6 erhöhten die Granzym B-Synthese lediglich bei einzelnen Probanden. Die Stimulation mit IL-4 führte zu einer signifikanten Suppression der Granzym B-Synthese in pDCs.

7. pDCs initiieren einen Granzym B- und Caspase-abhängigen Zelltod in Zielzellen. Diese zytotoxische Funktion der pDCs ist Perforin-unabhängig. Die Induktion eines Zelltodes von K562-Tumorzellen konnte in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Die Granzym B- und Caspase-Abhängigkeit der zytotoxischen Funktion wurde durch den Einsatz der spezifischen Inhibitoren z-AAD-cmk (Granzym B-Inhibitor) und z-VAD-fmk (Caspase-Inhibitor) verifiziert. Weder in den durchflusszytometrischen Messungen, noch bei den RT-PCR-Untersuchungen konnte Perforin in pDCs nachgewiesen werden. Wir postulieren daher, dass die Granzym B-abhängige Zytotoxizität von pDCs Perforin-unabhängig ist.

8. Verschiedene Funktionen der Granzym B-vermittelten Zytotoxizität der pDCs sind denkbar. Das erhöhte Vorkommen von pDCs am Entzündungsort legt zum Beispiel eine Granzym B-vermittelte Funktion bei Entzündungen nahe. Da die Granzym B-Synthese in pDCs durch die TLR-Liganden Imiquimod, ODN2006-G und ODN2216 supprimiert wird, ist eine Beteiligung an der antiviralen und antibakteriellen Immunantwort eher unwahrscheinlich. Des Weiteren wäre der Einsatz der Granzym B-vermittelten Zytotoxizität gegen körpereigene Zellen denkbar. Die Funktion von Granzym B wird derzeit in verschiedenen Bereichen diskutiert, z.B. der Tumormunität, Zytokin-ähnlicher-Effekte, immunsuppressive Funktionen, Umbau extrazellulärer Matrix u.a..

7.2 Curriculum vitae

Persönliche Angaben

Name: Juliane Maria Nielsen

Anschrift: Ehnernstraße 184, 26121 Oldenburg
julianenielsen@yahoo.de

geboren: 19.01.1984 in München

Nationalität: deutsch

Familienstand: ledig

Beruf: 01/2011 Assistenzärztin Innere Medizin I, Klinikum
Oldenburg/ „European Medical School
Oldenburg-Groningen“ in Oldenburg (Oldenb.)

Studium/Praktika:

10/2003 – 06/2010 Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
Abschluss: Staatsexamen, Gesamtnote: gut (2,3)

Examina: Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 09/2005
Note: gut (2,0)
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung 06/2010
Note: gut (2,5)

Famulaturen:

02/2006	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, Zentrum für Frauen- Kinder und Jugendmedizin
08/2006	Praxis für Allgemeinmedizin, Rostock
02/2007	Integratives Gesundheitszentrum Boizenburg, Innere Medizin
03/2007	Klinikum Süd Rostock, Gastroenterologie
08/2008	Universitätsklinikum Rostock, Kardiologie

Praktisches Jahr:

02/2009-06/2009	Hospital Gral. San Martin, Universidad de La Plata, Argentinien Klinik für Allgemeinchirurgie, Traumatologie Prof. Dr.med. M. C. Canestri
06/2009-10/2009	Spital Bülach, Schweiz Zentrum für Innere Medizin, Notaufnahme Dr. med. G. Mang
10/2009-01/2010	Universitätsklinikum Rostock Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe Prof. Dr. med. B. Gerber

Schulische Ausbildung

1990 - 1996	Grundschule Schottmüller, Hamburg
1996 - 1998	Gymnasium Corvey, Hamburg
1998 - 2003	Gymnasium Elbe, Boizenburg/ Elbe
	Leistungskurse: Englisch, Deutsch
	Abschluss: Abitur (Note: 1,5)

7.3 Publikation

K. Bratke, J. Nielsen, F. Manig, C. Klein, M. Kuepper, S. Geyer, P. Julius, M. Lommatzsch, J. C. Virchow. Functional expression of granzyme B in human plasmacytoid dendritic cells: a role in allergic inflammation. Clin Exp Allergy 2010;40:1015-1024.

7.4 Danksagung

Diese Arbeit ist dank der Mithilfe vieler Personen zu dem geworden, was sie jetzt ist. Dafür möchte ich meinen herzlichen Dank aussprechen:

Ich danke meinem Doktorvater Prof. J.C. Virchow jr. mir die finanzielle und personelle Möglichkeit geschaffen zu haben, diese Arbeit zu realisieren. Dafür bin ich sehr dankbar.

Ein sehr großer Dank gilt meinem Betreuer Dr. Kai Bratke für die unermüdliche Unterstützung und Hilfsbereitschaft. Danke für eine arbeitsreiche, lustige, interessante, erschöpfende, aber erfolgreiche Zeit. Vielen Dank für all Dein Wissen, dass Du mit mir geteilt hast und dein akribisches Engagement diese Arbeit immer wieder streng zu korrigieren. Du trägst einen großen Anteil an dieser Arbeit, dafür werde ich immer dankbar sein.

Ich danke der ganzen Laborgruppe! Michael, vielen Dank für deine Hilfe va. bei der Zytozentrifugation. Aber auch für viele kleine Tipps und Unterhaltungen nebenbei. Simone möchte ich für die große Hilfe bei der RT-PCR bedanken. Allen und da sei vor allem auch Petra genannt, für viel Spaß, den Nicht-wissenschaftlichen-Gedankenaustausch, Kuchenpausen und Grillpartys. Außerdem danke ich Marek Lommatzsch für das Bereitstellen der Blutentnahmematerialien, der Anleitung und des kreativen Basteln einer „Abnahmetechnik“.

Ein herzlicher Dank geht an meine Eltern für die Unterstützung in all den Jahren. Ihr habt mir die Möglichkeit und die Zeit gegeben, eine Arbeit wie diese zu absolvieren und erfolgreich abzuschließen. Das ist sehr großzügig und ich danke euch vielmals, dass ihr mir das ermöglicht habt. Ich danke euch aber ganz besonders dafür, dass ihr in den einigen Jahren in denen es für mich persönlich etwas schwierig war, für mich da wart und nie das Motivieren leid geworden seid.

Danke an die vielen Freunde und Kommilitonen die ihr Blut gelassen haben. Danke an Ina für ein unermüdliches „Jule kommst du mit in die Bibo, Doktorarbeit?“ und an Michi für den technischen Support. Herzlichen Dank an Steffi, Ina, Thea und Katrin dafür, dass ihr meine Freundinnen seid. Danke an Hanna und Lotte für den täglichen Spaziergang während des Schreibens.

7.5 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, dass ich diese Arbeit selbstständig verfasst und keine weiteren als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet habe.

Oldenburg, Datum

Juliane Maria Nielsen