



JOHANNES GUTENBERG
UNIVERSITÄT MAINZ

**Primäre und sekundäre autokrine Wirkung von IL-27 auf
neonatale dendritische Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades

„Doktor der Naturwissenschaften“

am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

vorgelegt von

Julia Birkholz

geboren am 19.04.1983 in Kirn

Mainz, im August 2013

Dekan:

Erster Berichtstatter:

Zweiter Berichtstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 19.05.2014

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG.....	8
1.1	Das neonatale Immunsystem.....	8
1.2	Dendritische Zellen.....	8
1.2.1	Die Rolle dendritischer Zellen im Immunsystem.....	8
1.2.2	Subtypen dendritischer Zellen.....	9
1.3	Angeborene Immunität.....	10
1.3.1	Mechanismen zur Pathogenabwehr.....	10
1.3.2	Zytokine und Chemokine: Botenstoffe des Immunsystems.....	10
1.3.3	Antivirale Abwehr: IRFs und weitere durch IFN stimulierbare Gene.....	13
1.4	Adaptive Immunität.....	14
1.4.1	Charakteristika der spezifischen Immunantwort.....	14
1.4.2	Die Rolle der DCs bei der Einleitung der adaptiven Immunantwort.....	15
1.5	Die Bedeutung von IL-27 im Immunsystem.....	17
1.5.1	Struktur und Vorkommen von IL-27.....	17
1.5.2	Rezeptor und Signalgebung.....	18
1.5.3	IL-27 ist ein pleiotropes Zytokin.....	19
1.6	Fragestellung und Ziel der vorliegenden Arbeit.....	20
2	MATERIAL UND METHODEN.....	22
2.1	Probengewinnung und Zellisolation.....	22
2.1.1	Blutproben.....	22
2.1.2	Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs).....	22
2.1.3	Zellzahlbestimmung.....	23
2.1.4	Konservierung isolierter Zellen über einen längeren Zeitraum.....	24
2.1.5	Auftauen der Zellen nach Lagerung in Stickstoff.....	24
2.1.6	Analyse der Zell-Viabilität.....	25
2.1.6.1	TruCount™/Viability-Test.....	25
2.1.6.2	Trypanblau-Färbung.....	25
2.1.7	Isolierung von Zellen mittels magnetischer Separation.....	26
2.1.7.1	Das Prinzip der magnetischen Zellseparation.....	26
2.1.7.2	Positivselektion von CD14+ Zellen.....	26
2.1.7.3	Negativselektion von CD4+ Zellen.....	27
2.2	Zellkulturen.....	27
2.2.1	Generierung monozytärer dendritischer Zellen.....	27
2.2.2	Kokulturen aus monozytären dendritischen Zellen und autologen CD4+ T-Zellen.....	28
2.2.3	Vollblut-Kulturen.....	29
2.2.4	Stimulanzen für die Zellkultur.....	29
2.3	Durchflusszytometrie / FACS-Analysen.....	30
2.3.1	Das Prinzip der Durchflusszytometrie.....	30
2.3.2	Probenvorbereitung für die FACS-Analyse.....	31
2.3.2.1	Bestimmung der Reinheit separierter Zellfraktionen.....	31
2.3.2.2	Nachweis von extra- und intrazellulären Antigenen.....	31

2.3.2.3	Färbungen zur FACS-Analyse von Vollblutproben.....	32
2.3.3	Nachweis sezernierter Zytokine in Zellkultur-Überständen (<i>Cytometric Bead Array</i> , CBA)	32
2.3.4	Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Proliferation	35
2.3.4.1	Das Prinzip des Proliferationsassays mit CFSE.....	35
2.3.4.2	Durchführung des CFSE- Proliferationsassays	35
2.3.5	Verwendete Reagenzien für die FACS-Analyse	36
2.3.5.1	Antikörper für die FACS-Analyse	36
2.3.5.2	Sonstige benötigte Reagenzien für die FACS-Analyse.....	36
2.4	Molekulargenetische Methoden	37
2.4.1	RNA-Isolation aus monozytären dendritischen Zellen.....	37
2.4.2	Reverse Transkription	39
2.4.3	Real Time PCR.....	39
2.4.3.1	Das Prinzip der Real Time PCR	39
2.4.3.2	Durchführung der Real Time PCR.....	40
2.4.3.3	Für die Real Time PCR Verwendete Primer und Sonden	42
2.4.4	PCR Arrays zur Gen-Expressionsanalyse	42
2.5	Statistische Analysen.....	45
2.6	Geräte	46
2.7	Verbrauchsmaterialien	47
2.7.1	Chemikalien und Reagenzien	47
2.7.2	Kits	48
2.7.3	Gebrauchs- und Einwegmaterialien.....	48
3	ERGEBNISSE.....	50
3.1	Die Differenzierung von Monozyten zu unreifen monozytären dendritischen Zellen.....	50
3.2	Hinweise auf die autokrine Produktion von IL-27 in DCs.....	51
3.2.1	IL-27 modifiziert die eigene mRNA-Expression	51
3.2.2	IL-27 beeinflusst auch die IL-27-Protein-Produktion	52
3.2.3	Vergleich der IL-27-Produktion bei unterschiedlicher moDC-Kulturdauer.....	53
3.2.4	Einfluss des STAT-Inhibitors Nifuroxazid auf Faktoren, die IL-27 autokrin induzieren kann	54
3.3	Nachweis der Sekretion inflammatorischer Zytokine bei moDCs	56
3.3.1	IL-27 und die Induktion inflammatorischer Zytokine	56
3.3.2	Einfluss von IL-27 auf die Induktion inflammatorischer Zytokine durch LPS und IFN γ	60
3.3.3	Induktion inflammatorischer Zytokine durch IL-27 in Kombination mit IL-21	65
3.4	Einfluss von IL-27 auf kostimulatorische Moleküle und Reifungsmarker	68
3.5	Einfluss von IL-27 auf die Antigenpräsentations-Kapazität	69
3.6	Die Wirkung von IL-27 auf die Expression antiviraler Gene.....	71
3.6.1	IL-27 induziert Expression von IFIT-Genen	71
3.6.2	IL-27 induziert die Expression von Interferon-Regulatorischen-Faktoren (IRFs)	72
3.7	IL-27 moduliert die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren	74
3.8	Einfluss von IL-27 auf DC-Subpopulationen: mDCs und pDCs	76
3.8.1	Nachweis von intrazellulärem IL-27 bei DC-Subpopulationen	76
3.8.2	Einfluss von IL-27 auf die Expression von Kostimulatoren bei DC-Subpopulationen.....	78
3.9	Wirkung von moDCs auf CD4⁺ T-Zellen.....	81
3.9.1	Sezernierte Zytokine in autologen Kokulturen.....	81
3.9.2	Wirkung von IL-27 auf die Proliferation von neonatalen CD4 ⁺ T-Zellen	82
3.9.3	Proliferation von CD4 ⁺ T-Zellen in autologen Kokulturen mit moDCs	85

4	DISKUSSION	86
4.1	Besonderheiten des neonatalen Immunsystems	86
4.2	Untersuchungsmaterial und Kulturdauer	87
4.3	IL-27-Expressionskapazität neonataler DCs verglichen mit adulten Zellen	87
4.4	Primäre autokrine Wirkung von IL-27 DCs	89
4.5	Sekundäre autokrine Wirkung von IL-27 auf DCs	90
4.6	Die Wirkung neonataler DCs auf autologe T-Zellen	95
4.7	Mechanismen zur Selbstrestriktion von IL-27	95
4.8	Ausblick	97
5	ZUSAMMENFASSUNG	99
6	LITERATURVERZEICHNIS	101
7	ANHANG	114
7.1	STABW Inflammation CBA (Cytometric Bead Array)	114
7.2	Eidesstattliche Erklärung	120
7.3	Lebenslauf	121
7.4	Danksagung	123

Abkürzungsverzeichnis

μ	mikro
AB	Adultes Blut
APC	Antigenpräsentierende Zelle
Aqua dest.	<i>Aqua destillata</i>
CB	Nabelschnurblut (<i>Cord Blood</i>)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
cDNA	<i>complementary DNA</i>
Cp	<i>Crossing Point</i>
DC	Dendritische Zelle
DNA	Desoxyribonukleinsäure
et al.	<i>et alia</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i>
g	Gramm
HLA	<i>Human Leukocyte Antigen</i>
ICAM	Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1
IFIT	<i>Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats</i>
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IRF	Interferon Regulatorischer Faktor
KM	Kulturmedium
KU	Kilo Unit
l	Liter
m	milli
M	Mol
MACS	<i>Magnetic activated cell sorter</i>
mDC	myeloide DC
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>

min	Minute
moDC	monozytäre DC
MW	Mittelwert
n	nano
p	Signifikanzwert
p	pico
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i>
PCR	Polymerase Kettenreaktion
pDC	plasmazytoide DC
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
SEM	Standard error of the mean/ Standardfehler
STABW	Standardabweichung
STAT	<i>Signal Transducer and activator of transcription</i>
TCR	T-Zell-Rezeptor
Th	T-Helfer
TLR	<i>Toll like receptor</i>
U	<i>Unit</i>
WM	Waschmedium
x g	Vielfaches der mittleren Erdbeschleunigung

1 Einleitung

1.1 Das neonatale Immunsystem

Das Immunsystem Neugeborener arbeitet zunächst weniger effektiv als das Erwachsener. Aus diesem Grund ist zum einen die Anfälligkeit für Infektionskrankheiten bei Säuglingen bis weit ins Kleinkindalter hinein deutlich erhöht, zum anderen wird eine effektive Vakzinierung dieser Altersgruppe erschwert (Siegrist, 2001; Siegrist, 2007). Diese Tatsachen beruhen auf einer eingeschränkten Fähigkeit zur Generierung angeborener (Marodi, 2006; Kollmann et al., 2012) sowie adaptiver Immunantworten, welche bezüglich neonataler antigenpräsentierender dendritischer Zellen und T-Zellen eine Unreife aufweisen (Harris et al., 1992; Trivedi et al., 1997; Velilla et al., 2006). Neonatale DCs haben demnach eine verminderte Fähigkeit, naive T-Zellen zu aktivieren, also T-Zell-Hilfe zu leisten. Ein damit zusammenhängendes Phänomen der neonatalen Unreife stellt die nur schwach ausgeprägte T-Helfer1-Antwort (Th1-Antwort) dar (Adkins, 2000), was sich in einer erhöhten Anfälligkeit insbesondere für Infektionen äußert, welche durch intrazelluläre Erreger wie Parasiten und Viren ausgelöst werden (Cuenca et al., 2013). Diese Phänomene könnten jedoch eine Anpassung des neonatalen Immunsystems darstellen (Levy, 2007; Wood und Siegrist, 2011), da sonst aufgrund der zahllosen für das Neugeborene neuen Umwelteinflüsse die Gefahr schädlicher Immunreaktionen bestünde. Eine zusätzliche Erklärung für die gedämpften Th1-Antworten des Neugeborenen könnte die überwiegende Th2-Polarisierung der Mutter während der Schwangerschaft sein, die dazu beiträgt, dass der für sie genetisch zur Hälfte fremde Fötus nicht aufgrund von Th1-Antworten abgestoßen wird (Wegmann et al., 1993; Dealtry et al., 2000; Raghupathy et al., 2012). Dadurch ist auch das kindliche Immunsystem zunächst eher in Richtung von Th2-Antworten geprägt. Erst im Laufe der Kindheit entwickelt sich eine mit Adulten vergleichbare Kapazität zur Th1-Polarisierung.

1.2 Dendritische Zellen

1.2.1 Die Rolle dendritischer Zellen im Immunsystem

Dendritische Zellen erhielten ihren Namen aufgrund ihrer Morphologie mit den für sie typischen dendritenartigen Ausläufern (griech.: *Dendro* = Baum) (Steinman und Cohn, 1973). Langerhans hatte zuvor bereits die nach ihm bezeichneten Langerhans-Zellen in der Haut

beschrieben, jedoch ohne dass ihm deren Bedeutung für das Immunsystem bekannt gewesen wäre (Langerhans, 1868).

Dendritische Zellen sind professionelle antigenpräsentierende Zellen und vermitteln zwischen der angeborenen und der adaptiven Immunantwort. Nicht nur in der Haut, sondern überall in den Geweben des Körpers verteilt, befinden sich unreife DCs, die im Falle einer Infektion Fremdkörper durch Phagozytose oder Pinozytose aufnehmen. Diese werden dann im Endosom der Zelle in Peptide definierter Länge zerlegt und schließlich über MHC-Moleküle an der Zelloberfläche präsentiert. Die nunmehr reifen DCs zeigen eine gesteigerte Expression von MHC-Molekülen und kostimulatorischen Molekülen, während sie ihre Fähigkeit Antigene zu phagozytieren verlieren.

Sie migrieren in die lymphatischen Organe und treffen dort auf naive T-Zellen, die sie über Interaktion zu Antigen-spezifischen T-Zellantworten veranlassen können. Diese Zusammenhänge werden in Kapitel 1.4.2 ausführlicher besprochen.

1.2.2 Subtypen dendritischer Zellen

Humane dendritische Zellen werden in verschiedene Subtypen eingeteilt. Zum einen gibt es myeloide DCs (mDCs), die aus Stammzellen des Knochenmarks differenzieren, zum anderen plasmazytoide DCs (pDCs), die von lymphoiden Vorläufern abstammen. Diese beiden Zelltypen unterscheiden sich durch die Produktion unterschiedlicher Oberflächenmarker und Zytokine, und damit einhergehend einer abweichenden Funktionalität.

Bei den mDCs handelt es sich um die wichtigsten Vertreter professioneller antigenpräsentierender Zellen, die durch die Aufnahme, Prozessierung und anschließende Präsentation von Antigenen und nach Migration in die lymphatischen Organe die Aktivierung naiver, antigenspezifischer T-Helferzellen bewirken (Steinman, 1991; Cella et al., 1997; Banchereau und Steinman, 1998). Somit überbrücken mDCs den Übergang von der unspezifischen, angeborenen Immunantwort zu der spezifischen, adaptiven Immunantwort.

pDCs hingegen tragen vor allem zur Abwehr von Viren bei, deren Bestandteile über intrazelluläre TLR-Rezeptoren erkannt werden. pDCs sind als einziger Zelltyp in der Lage zeitnah große Mengen an antiviral wirkenden TypI-Interferonen (IFN) zu bilden. Jedoch wurde berichtet, dass auch pDCs antigenpräsentierende Funktionen besitzen (Villadangos und Young, 2008; Bao und Liu, 2013).

1.3 Angeborene Immunität

1.3.1 Mechanismen zur Pathogenabwehr

Der Mensch verfügt über eine Vielzahl an Mechanismen, die den Organismus schnell und zunächst wenig selektiv vor eindringenden Pathogenen schützen.

Für den Fall, dass die Barrierefunktionen der Haut oder der Schleimhäute das Eindringen von Erregern nicht verhindern können, kommt die zelluläre Abwehr zum Tragen. So können phagozytierende Zellen wie dendritische Zellen, Makrophagen oder die kurzlebigen neutrophilen Granulozyten Bakterien, die sogenannte „PAMPs“ (Pathogen associated molecular patterns) tragen, mittels Keimbahn-kodierter Rezeptoren wie z.B. den Toll-like-Rezeptoren (TLRs) erkennen, internalisieren und somit unschädlich machen (Akira und Takeda, 2004; Arancibia et al., 2007). Bei PAMPs handelt es sich um bei pathogenen Mikroorganismen vorkommende, repetitive molekulare Strukturen, wie beispielsweise das Lipopolysaccharid (LPS) als ein typischer Bestandteil der Bakterienzellwand Gram-negativer Bakterien.

Neben den oben genannten phagozytierenden Zellen sezernieren die natürlichen Killerzellen zytotoxische Granula zur Lyse von Zellen, die mit intrazellulären Erregern infiziert sind.

Der Vollständigkeit halber erwähnt werden sollen hier auch Akute-Phase-Proteine und das Komplementsystem. Akute-Phase-Proteine, z.B. das C-reaktive Protein, werden durch die Leber als Antwort auf bestimmte Zytokine (siehe Kapitel 1.2.3), genauer IL-1, IL-6 und TNF- α produziert, und aktivieren neben der Verbesserung der Phagozytose wiederum das Komplementsystem.

Letzteres besteht aus einer Gruppe von Plasmaproteinen, die der Abwehr extrazellulärer Pathogene dient. Dabei wird entweder durch Umschließen des Pathogens durch Komplementproteine dessen Phagozytose erleichtert oder dieses direkt mithilfe der Komplementproteine zerstört.

1.3.2 Zytokine und Chemokine: Botenstoffe des Immunsystems

Ein Wirkmechanismus der angeborenen Immunantwort ist die Inflammation. Charakteristisch für eine solche Entzündungsreaktion, die z.B. durch Verletzungen und Infektionen verursacht werden kann, ist die Ansammlung von Flüssigkeit, Plasmaproteinen und Leukozyten (Janeway et al., 2002). Werden Mikroorganismen über PAMPs erkannt und anschließend aufgenommen, reagieren die phagozytierenden Zellen mit der Sekretion proinflammatorischer Zytokine.

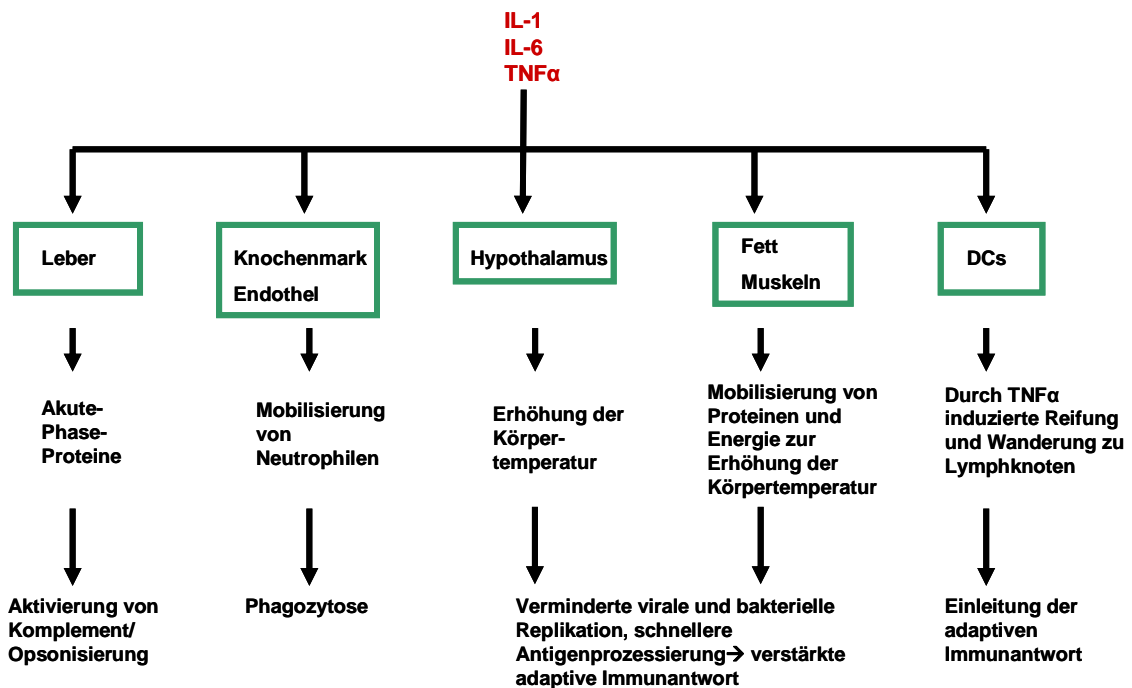


Abbildung 1.1: Überblick über die biologischen Wirkungen von IL-1, IL-6 und TNF- α (Tumor Nekrose-Faktor- α); nach Janeway et al., 2002, modifiziert.

Diese induzieren eine erhöhte Expression von Adhäsionsmolekülen durch das Endothel und ermöglichen somit ein Einwandern von Immunzellen in das betroffene Gewebe. Als systemische Reaktion kann Fieber auftreten (Abbildung 1.1). Zudem werden von den phagozytierenden Zellen Chemokine sezerniert, chemotaktisch wirkende Zytokine. Ausgehend von den produzierenden Zellen entsteht ein Chemokin-Konzentrationsgradient, entlang dessen weitere Immunzellen rekrutiert werden können, sofern sie den entsprechenden, G-Proteingekoppelten Chemokin-Rezeptor auf ihrer Oberfläche exprimieren. Es gibt unterschiedliche Chemokin-Gruppen, von denen im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei von Bedeutung sind (Abbildung 1.2): Zum einen die CC-Chemokine, welche zwei direkt aufeinander folgende Cysteinreste an ihrem Aminoende besitzen, und zum anderen die CXC-Chemokine, bei denen diese beiden N-terminalen Cysteinreste durch eine weitere Aminosäure voneinander getrennt vorliegen (Fernandez und Lolis, 2002).

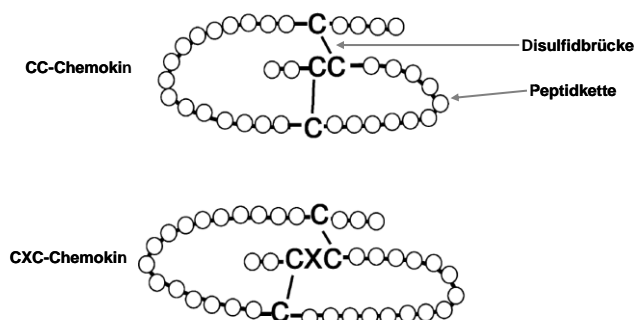


Abbildung 1.2: Der Aufbau von CC und CXC-Chemokinen im Vergleich. Aus Burke-Gaffney et al., 2002., modifiziert.

Im Folgenden sollen einige in der vorliegenden Arbeit untersuchten Zytokine und Chemokine vorgestellt werden:

IL-1 β ist ein inflammatorisches Zytokin aus der IL-1-Familie. Das zunächst produzierte Vorläuferprotein wird während der Prozessierung durch zelluläre Proteasen gespalten und anschließend sezerniert. Es induziert die Produktion von IL-6 und löst Fieber aus (Dinarello, 1996), darüber hinaus erhöht es die Durchlässigkeit des Endothels (Puhlmann et al., 2005).

IL-6 wiederum ist von Bedeutung beim Übergang von der angeborenen zu einer adaptiven Immunantwort. Im Rahmen der angeborenen Immunantwort hemmt IL-6 die Produktion von IL-8 und indirekt TNF- α (Tumor-Nekrose-Faktor- α) und IL-1. Zudem trägt IL-6 zur Ausbildung einer adaptiven Immunantwort bei, indem es die T-Zell-Polarisation beeinflusst und die Reifung und Aktivität von DCs steuert (Jones, 2005).

TNF- α verbessert die Durchlässigkeit des Endothels für Immunzellen durch eine gesteigerte Expression von Leukozyten-Adhäsionsmolekülen wie ICAM-1 (Interzelluläres Adhäsionsmolekül 1). Zudem begünstigt TNF- α die Freisetzung von Chemokinen wie IL-8 und CXCL10, die Leukozyten rekrutieren (Bradley, 2008).

Bei IL-8, das auch CXCL8 genannt wird, handelt es sich um ein inflammatorisches Zytokin und Chemokin aus der CXC-Familie. Die Expression von IL-8 wird durch die inflammatorischen Zytokine IL-1 und TNF- α induziert (Baggiolini und Clark-Lewis, 1992). IL-8 wirkt chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und T-Zellen und ist somit ein Mediator im Rahmen akuter Inflammationen (Larsen et al., 1989; Harada et al., 1994). Die Produktion von IL-6 wird durch IL-8 inhibiert (Jones, 2005).

IL-12 induziert die Produktion von Interferon γ (IFN γ) und fördert somit Th1-Immunantworten wie auch die Aktivierung von Natural Killer-Zellen (Chan et al., 1991; Trinchieri et al., 1992). Ein antiinflammatorisches Zytokin, das von fast allen Zellen des Immunsystems produziert wird und das eine Vielzahl von regulatorischen Funktionen aufweist, ist IL-10. Die zentrale Funktion von IL-10 ist es, Immunreaktionen einzugrenzen, insbesondere durch das Verhindern zu starker T-Zell-Antworten (Li und Flavell, 2008). Zudem beeinflusst IL-10 eine Vielzahl

wichtiger Funktionen von Monozyten, Makrophagen und DCs, indem es neben der Produktion von inflammatorischen Zytokinen phagozytotische, kostimulatorische und antigenpräsentierende Eigenschaften moduliert. Darüber hinaus kann IL-10 regulatorisch wirkende DCs induzieren (Banchereau et al., 2012).

Das CXC-Chemokin CXCL10 rekrutiert T-Zellen (Sallusto et al., 1998), Monozyten und Natural Killer-Zellen (Liu et al., 2011) und darüber hinaus begünstigt es die Entstehung von Th1-Antworten (Vasquez et al., 2008).

Die CC-Chemokine CCL7 und CCL8 wirken proinflammatorisch (Gong et al., 1997; Sozzani, 2005) und chemotaktisch auf DCs (de la Rosa et al., 2003).

CCL23, ebenfalls ein Chemokin aus der CC-Familie, rekrutiert moDCs, ruhende, nicht aktivierte T-Zellen sowie Monozyten (Patel et al., 1997).

Wie vielschichtig das Zusammenspiel der in der Regel multifunktional wirkenden Zytokine und Chemokine ist, wird allein anhand der hier beschriebenen Auswahl deutlich. Die gegenseitige Regulation verschiedener Faktoren, die unerwünschten, zu stark ausfallenden Reaktionen vorbeugen kann, ist hierbei ein wichtiger Aspekt. Die Erkenntnis über diese komplexen Interaktionen hat in jüngerer Vergangenheit zu der Entwicklung der Systembiologie geführt, die es sich zum Ziel gesetzt hat, die Gesamtheit der biologischen Vorgänge zu betrachten.

1.3.3 Antivirale Abwehr: IRFs und weitere durch IFN stimulierbare Gene

Im Rahmen der Abwehr viraler Infektionen spielen Interferon stimulierbare Gene (ISGs) eine bedeutende Rolle. Diese kodieren für eine Vielzahl an Proteinen, die hemmend in die virale Replikation eingreifen, und auch immunmodulierend wirken, indem sie Leukozyten rekrutieren und die adaptive Immunantwort einleiten können (Diamond und Farzan, 2013).

Sie sind Zielgene von Interferonen, welche bei Virus-Infektionen in hohem Maße gebildet werden (Schoggins und Rice, 2011). Zu den ISGs gehören Gene aus der IFIT (*IFN induced protein with tetratricopeptide repeats*)-Familie, aus der IFITM (*Interferon induced transmembrane protein*)-Familie und aus der Familie der IRFs (Interferon-regulatorische Faktoren). Sie alle besitzen eine gemeinsame Konsensus-DNA-Bindestelle, genannt ISRE (*Interferon stimulated response element*).

Bei den IRFs handelt sich um eine Familie von neun Transkriptionsfaktoren. Den IRFs gemeinsam ist eine konservierte, N-terminale DNA-Bindedomäne aus 120 AS, ein *Helix-Turn-Helix-Motiv*, das an das ISRE-Element der ISGs binden kann (Taniguchi et al., 2001). Sie sind an der Entwicklung und Funktion unterschiedlicher Zellen des Immunsystems, so auch von

dendritischen Zellen, beteiligt (Tamura et al., 2008). IRFs regulieren u.a. die Ausbildung einer Th1-Immunantwort sowie eine Immunantwort gegen Viren und intrazelluläre Bakterien, da zu ihren Zielgenen das Th1-Zytokin IL-12 und die antiviralen TypI Interferone IFN α und β gehören (Honda und Taniguchi, 2006).

Die IFIT-Genfamilie gehört zu den am stärksten durch IFN induzierten ISGs (Fensterl und Sen, 2011). Die Proteine, für die sie kodieren, inhibieren ebenfalls die Replikation von Viren (Zhou et al., 2013). Ebenso involviert in die antivirale Immunität, insbesondere in die Abwehr von Influenza A, sind die IFITM-Gene (Brass et al., 2009; Diamond und Farzan, 2013).

Die hohe Inzidenz insbesondere auch an viralen Infektionserkrankungen im Kindesalter steht im Zusammenhang mit dem entwicklungsstypisch spezialisierten Immunsystem des Neugeborenen. IL-27, das von neonatalen DCs in auffallend großer Menge produziert wird, wurde als ein antiviral wirkendes Zytokin beschrieben (Jankowski et al., 2010). Welchen Einfluss IL-27 auf antivirale Abwehrmechanismen bei DCs hat, wurde deshalb im Rahmen der vorliegenden Arbeit überprüft.

1.4 Adaptive Immunität

1.4.1 Charakteristika der spezifischen Immunantwort

Im Gegensatz zu der schnell einsetzenden angeborenen Immunantwort zeichnet sich die zweite Instanz der humanen Abwehrreaktion durch eine höhere Spezifität, damit einhergehend jedoch auch einer längeren Anlaufzeit, aus. Während die angeborene Immunantwort auf der Erkennung von Pathogenen durch vererbte Rezeptoren beruht, ist die adaptive Immunität theoretisch dazu in der Lage, jedes erdenkliche Antigen zu erkennen. Die dazu benötigten Rezeptoren auf den Lymphozyten, zu denen B-Zellen und T-Zellen zählen, werden zuvor durch die somatische Rekombination von Rezeptor-Gensegmenten gebildet. Aus diesem Repertoire heraus wird diejenige Rezeptor-Spezifität, die zu einem bestimmten Antigen passt, durch Proliferation der Rezeptor-exprimierenden Zelle selektiv vermehrt. Die Rekombination ist keimbahnunabhängig und die daraus hervorgehenden Rezeptorspezifitäten werden somit nicht vererbt (Janeway et al., 2002). Auf diesem Wege entstehen sowohl der T-Zell-Rezeptor (TCR), als auch die Immunglobuline bei B-Zellen, wobei letztere je nach Differenzierungsstatus der B-Zelle entweder als membranständige Rezeptoren oder als sezernierte Antikörper vorliegen. Während B-Zellen freie Antigene erkennen können, sind T-Zellen zu einer Erkennung nur in der Lage, wenn das Antigen über einen MHC-Komplex präsentiert wird. T-Zellen bedürfen also der Hilfe antigenpräsentierender Zellen, zu denen

neben B-Zellen und Makrophagen auch die DCs gehören. Handelt es sich bei den präsentierten Peptiden um körpereigene Antigene, entwickeln die T-Zellen eine Toleranz, so dass eine Autoimmunität verhindert wird. Werden sie hingegen durch das Erkennen körperfremder Antigene aktiviert, induzieren die T-Zellen wiederum die Entwicklung einer adaptiven Immunantwort, u.a. durch Induktion der Antikörper-Sekretion durch B-Zellen.

Ein weiterer wichtiger Aspekt der erworbenen Immunität ist die Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses. Aus einer adaptiven Immunantwort gehen Gedächtnis-Lymphozyten hervor, die bei einer erneuten Antigenerkennung schnell reagieren können. Darauf beruht das Prinzip der Immunisierung bei einer Vakzinierung gegen bestimmte Krankheitserreger.

1.4.2 Die Rolle der DCs bei der Einleitung der adaptiven Immunantwort

Dendritische Zellen gehören ebenfalls zu den phagozytierenden Zellen, jedoch haben sie eine besondere Stellung in der Immunantwort: Die mittels Phago- und Pinozytose internalisierten Pathogene und lösliche Antigene werden prozessiert und die so entstehenden Peptide werden anschließend als Antigene über MHC (Major Histocompatibility Complex)-Oberflächenmoleküle an der Zelloberfläche präsentiert (Banchereau und Steinman, 1998; Guermonprez et al., 2002).

Dabei wird zwischen einer Antigenpräsentation über den MHCI- und MHCII-Komplex unterschieden. Über den MHCI werden in der Regel intrazelluläre Antigene, z.B. virale Partikel, die in der Zelle repliziert wurden, aber auch körpereigene Peptide präsentiert, während über den MHCII extrazelluläre, von der Zelle aufgenommene Antigene präsentiert werden. Während fast alle Zelltypen MHCI-Moleküle auf ihrer Oberfläche zeigen, werden MHCII-Moleküle ausschließlich von professionellen Antigen-präsentierenden Zellen konstitutiv exprimiert, zu denen neben Makrophagen und B-Zellen auch DCs gehören.

Die Antigenaufnahme induziert die Reifung der DCs, und damit einhergehend eine erhöhte Migrationsneigung, so dass die DCs in die Lymphknoten gelangen. Treffen DCs dort auf naive T-Zellen, die spezifisch für das von ihnen präsentierte Antigen sind, kommt es zur T-Zell-Aktivierung (Abbildung 1.3). Von den DCs exprimierte kostimulatorische Moleküle und auch die von ihnen sezernierte Zytokine liefern weitere Signale für die Aktivierung der T-Zellen. Dadurch proliferieren und differenzieren die naiven T-Zellen schließlich zu Effektor-T-Zellen. Somit verbinden DCs die unspezifische, angeborene Immunantwort mit der aufgrund ihrer hohen Spezifität zeitlich verzögerten, angepassten Immunantwort.

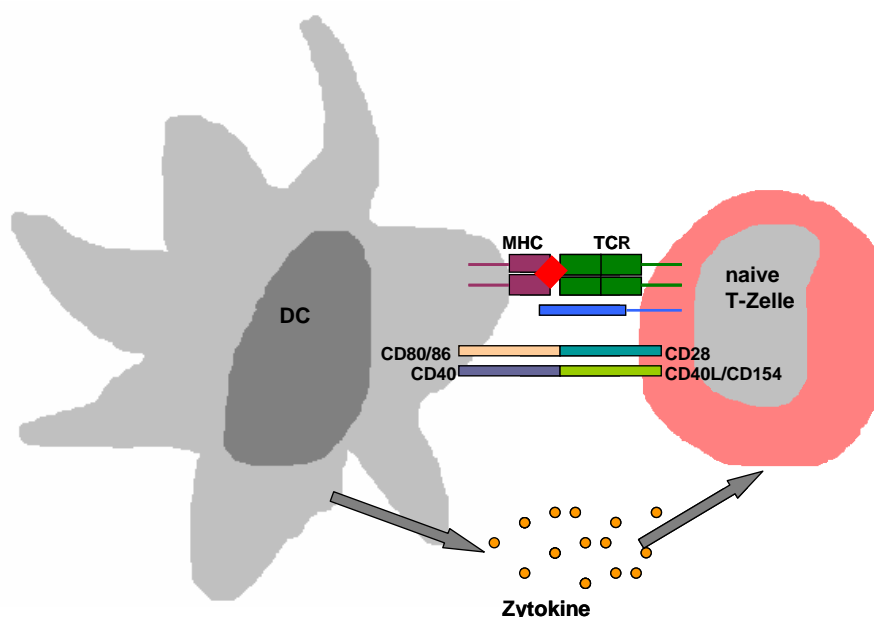


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der Interaktionen zwischen DC als professioneller Antigen-präsentierender Zelle und T-Zelle

Erkennt eine T-Zelle über ihren TCR die von DCs prozessierten und über deren MHC-Oberflächenmoleküle präsentierten Antigene als ein für sie spezifisches Peptid, wird die T-Zelle über mehrere Signale aktiviert: Zunächst wird das Signal des TCR über das an den Rezeptor angelagerte CD3 in die Zelle geleitet. Sofern es sich um körpereigene Antigene („Selbst“) handelt, entwickeln die T-Zellen eine Toleranz, so dass autoimmune Reaktionen in der Regel verhindert werden. Werden sie hingegen durch das Erkennen körperfremder Antigene aktiviert, induzieren die T-Zellen wiederum die Entwicklung einer adaptiven Immunantwort. Es bedarf jedoch weiterer Signale, um eine Aktivierung der T-Zelle zu gewährleisten. So werden auf der Oberfläche dendritischer Zellen kostimulatorische Moleküle exprimiert, die zusätzliche Aktivierungssignale liefern.

Auf den DCs gehören zu diesen Kostimulatoren die Oberflächenrezeptoren CD80 und CD86, die auf der T-Zelle an CD28 binden sowie CD40 auf DCs, das an seinen Rezeptor CD40L/CD154 auf T-Zellen bindet. Auch von den antigenpräsentierenden Zellen sezernierte Zytokine tragen zur Ausbildung einer entsprechenden T-Zellantwort bei. Bei T-Zellantworten wird zwischen einer T-Helfer 1-Antwort (Th1-Antwort) und einer T-Helfer 2-Antwort (Th2-Antwort) unterschieden. Während DCs, die IL-12 sezernieren, Th1-Antworten hervorrufen, sorgt von DCs sezerniertes IL-4 für eine Induktion von Th2-Antworten.

Th1-Antworten treten im Zusammenhang mit viralen und bakteriellen Infektionen auf, typische Zytokine hierbei sind IL-2 und $\text{IFN}\gamma$. $\text{IFN}\gamma$ aktiviert Makrophagen und induziert zusammen mit IL-12 die Differenzierung von Killer-T-Zellen. Th2-Antworten hingegen sind

wirksam bei der Bekämpfung intrazellulärer Parasiten indem sie Eosinophile aktivieren und B-Zell-Hilfe leisten, womit die Antikörperproduktion unterstützt wird (Banchereau und Steinman, 1998). Charakteristische Zytokine im Rahmen von Th2-Antworten sind IL-4, IL-5, IL-6 und IL-13.

Ein bekanntes Phänomen der neonatalen Unreife stellt die im Vergleich zur Immunantwort von Adulten nur schwach ausgeprägte Th1-Antwort dar. Ein Grund hierfür ist die überwiegende Th2-Immunität während der Schwangerschaft. Durch dieses Ungleichgewicht der T-Zell-Immunantworten zugunsten von Th2-Antworten wird verhindert, dass der Fötus aufgrund der für ihn schädlichen Th1-Antworten abgestoßen wird (Wegmann et al., 1993). Erst im Laufe der Kindheit entwickelt sich eine mit Adulten vergleichbare Th1-Immunität.

1.5 Die Bedeutung von IL-27 im Immunsystem

1.5.1 Struktur und Vorkommen von IL-27

Bei IL-27 handelt es sich um ein Zytokin der IL-6/ IL-12-Familie, die insbesondere Einfluss auf T-Zellantworten ausübt und gemeinsame Zytokin- und Rezeptorunterheiten aufweist (Jones und Vignali, 2011) (Abbildung 1.4).

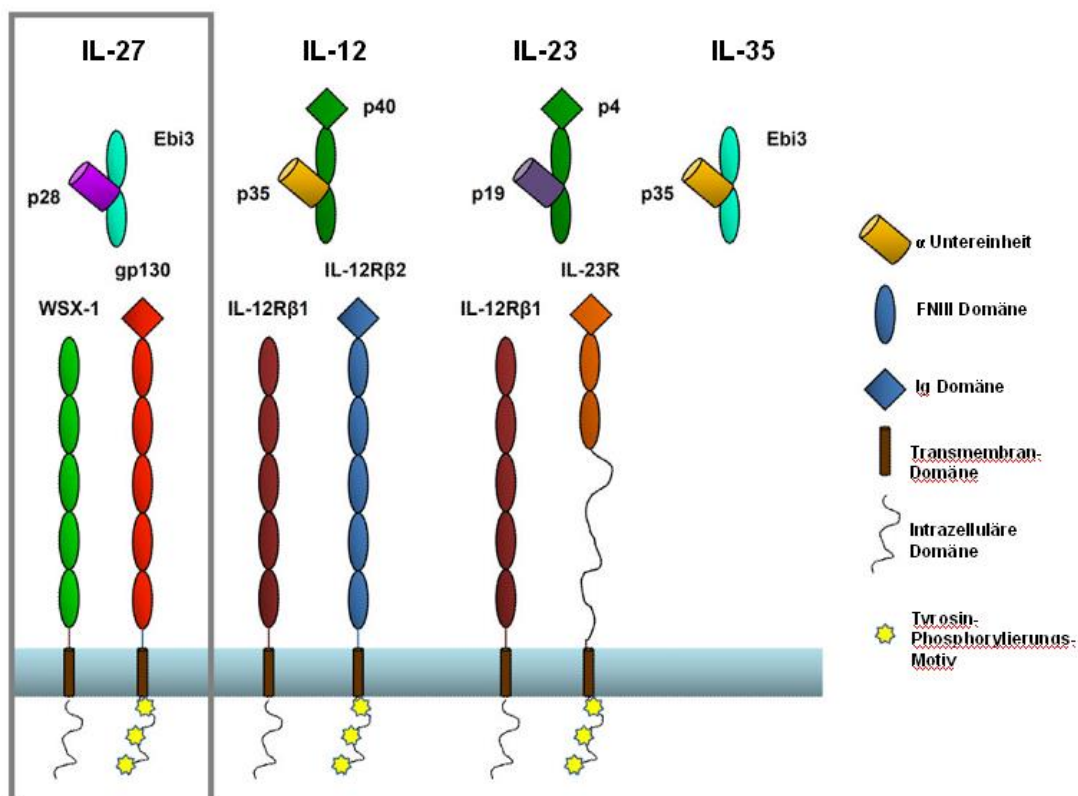


Abbildung 1.4: Die IL-6/IL-12-Zytokinfamilie und ihre Rezeptoren, aus Jones und Vignali, 2011 modifiziert.

IL-27 selbst besteht aus den beiden Untereinheiten EBI3 (Epstein-Barr Virus-induziertes Gen 3) und p28 (Pflanz et al., 2002). Während EBI3 auch eigenständig sezerniert werden kann, findet eine Sekretion von IL-27p28 nur in Verbindung mit EBI3 statt (Pflanz et al., 2002). Jedoch zeigt isoliertes IL-27p28 nichtsdestotrotz auch eine biologische Aktivität. So wurde nachgewiesen, dass p28 die Produktion von IL-17 durch T-Zellen inhibieren kann (Batten et al., 2006; Stumhofer et al., 2006). Außerdem wurde, allerdings ausschließlich in der Maus, gezeigt, dass p28 als Antagonist von gp130-vermittelten IL-6- und IL-27- Signalkaskaden wirken kann (Stumhofer et al., 2010).

IL-27 wird zeitnah nach der Aktivierung von antigenpräsentierenden Zellen wie DCs, Monozyten oder Makrophagen, z.B. mittels TLR-Ligation, produziert. Das Zytokin induziert die klonale Expansion von naiven CD4⁺ T-Zellen (Pflanz et al., 2002).

In der Zeitkinetik einer Th1-Antwort Adulter tritt zunächst IL-27 auf, während das etwas später gebildete IL-12 schließlich dominiert und IL-27 letztlich in seiner Funktion ablöst (Owaki et al., 2005). Während die Produktion von IL-12, das die Differenzierung zu Th1-Zellen fördert und zugleich die von Th2-Zellen hemmt, in neonatalen und kindlichen DCs verglichen mit adulten nur sehr schwach ausgeprägt ist (Goriely et al., 2001; Upham et al., 2002), liegt bei ihnen eine verstärkte Expression von IL-27 vor (Krumbiegel et al., 2008).

1.5.2 Rezeptor und Signalgebung

Der Rezeptor für IL-27 wurde erstmalig von der Arbeitsgruppe um Chen beschrieben (Chen et al., 2000) und besteht aus den beiden Untereinheiten WSX-1 und gp130 (Pflanz et al., 2004). WSX-1 ist ausschließlich als Teil des IL-27-Rezeptors bekannt, während gp130 auch Bestandteil von anderen Zytokinrezeptoren, wie z.B. dem IL-6-Rezeptor, ist. Neben NK-Zellen, Monozyten, Mastzellen, B- und T-Zellen exprimieren auch DCs sowohl WSX-1 als auch gp130.

Die Diversität der Zellen, die in der Lage sind auf IL-27 anzusprechen, verdeutlicht die Bedeutung des Zytokins sowohl im Rahmen angeborener, als auch adaptiver Immunantworten. IL-27 bewirkt bei seinen Zielzellen eine Phosphorylierung von STAT1 und STAT3 (Hibbert et al., 2003; Guzzo et al., 2010). Bei T-Zellen führt die Phosphorylierung von STAT1 während der IL-27 Signalkaskade zu einer Induktion des Th1-Transkriptionsfaktors T-bet (Takeda et al., 2003). In T-Zellen von WSX-1-Knockout-Mäusen wurde eine verminderte IFN γ -Produktion nachgewiesen (Chen et al., 2000; Yoshida et al., 2001), was ebenfalls die Bedeutung von IL-27 bei der Initiierung von Th1-Antworten zeigt.

Damit einhergehend wurde von einer durch die IL-27/WSX-1-Signalgebung induzierten Hemmung des Th2-Transkriptionsfaktors GATA-3 berichtet (Takeda et al., 2003).

Da wie weiter oben erwähnt auch DCs befähigt sind, selbst auf das von ihnen produzierte IL-27 zu reagieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit autokrine Effekte von IL-27 auf neonatale DCs im Vergleich zu adulten DCs untersucht.

1.5.3 IL-27 ist ein pleiotropes Zytokin

Bei IL-27 handelt es sich um ein pleiotropes, also ein multifunktionales Zytokin, d.h. es kann, je nach Kontext, unterschiedlich auf andere Immunzellen, insbesondere auf T-Zellen (Abbildung 1.5), wirken.

Zum einen wirkt IL-27 inflammatorisch, denn es ist wie bereits erwähnt dazu in der Lage, eine Th1-Antwort auszulösen, indem der Th1-zugeordnete Transkriptionsfaktor T-bet und somit die IFN γ -Produktion von naiven T-Zellen hochreguliert werden (Pflanz et al., 2002). Dies wiederum hat zur Folge, dass die so entstehenden Th1-Zellen Makrophagen und Eosinophile aktivieren können und somit die Inflammation voranschreitet.

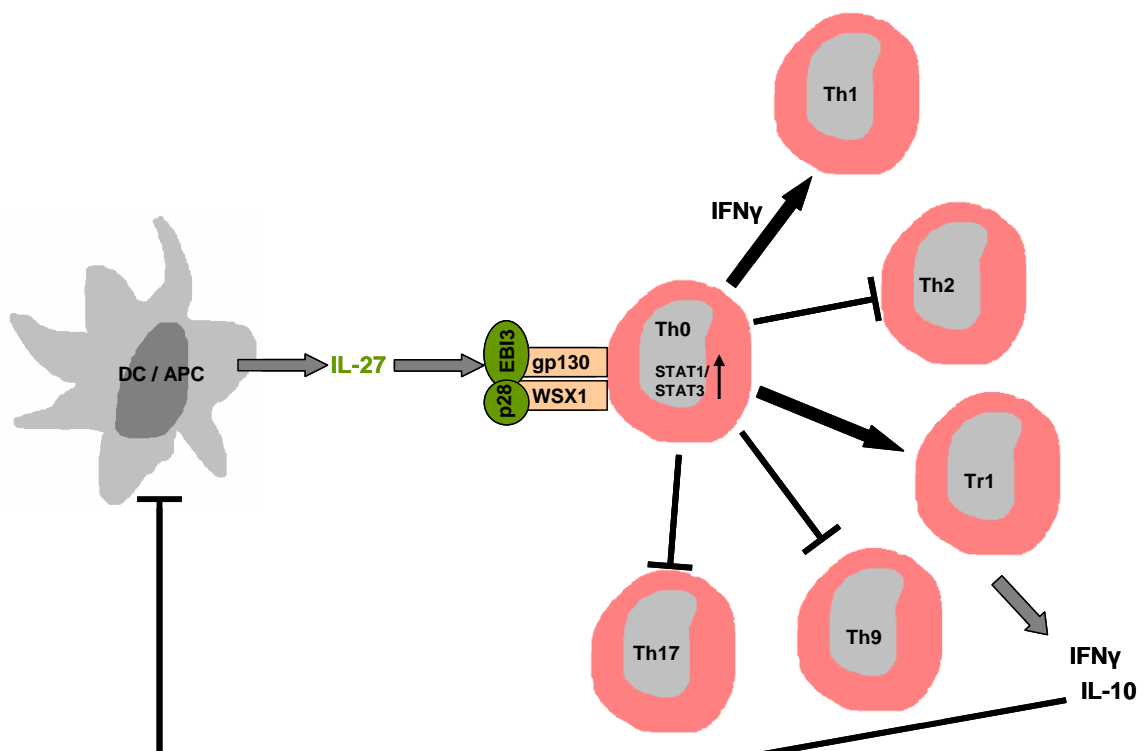


Abbildung 1.5: Effekt von IL-27 auf die Entwicklung von T-Zellantworten; in Anlehnung an Stumhofer und Hunter, 2008, Yoshida et al., 2009 und Vignali und Kuchroo, 2012.

Neben seiner Rolle bei der Induktion der als inflammatorisch geltenden Th1-Antworten werden IL-27 noch weitere Funktionen zugeschrieben. Es konnte gezeigt werden, dass die Expression der inflammatorischen Zytokine IL-1 β , TNF- α , IL-12p35 und IL-18 in humanen Monozyten nach Stimulation mit IL-27 erhöht wurde (Pflanz et al., 2004).

In Monozyten konnte zudem eine Verstärkung von LPS-induzierten inflammatorischen Effekten durch IL-27 nachgewiesen werden (Guzzo et al., 2012a).

Jedoch sind auch antiinflammatorische Eigenschaften von IL-27 beschrieben worden: In einem Mausmodell für Toxoplasmose, welches durch einen intrazellulären Erreger verursacht wird und somit Th1-Antworten hervorruft, inhibierte IL-27 die IL-2-Produktion von T-Zellen. Dadurch konnte die Entwicklung pathogener inflammatorischer Immunantworten abgeschwächt werden (Villarino et al., 2006).

IL-27 fördert die Differenzierung und Expansion von Tr1-Zellen, indem es IL-21 induziert (Awasthi et al., 2007; Pot et al., 2009).

IL-27 inhibiert außerdem die Differenzierung inflammatorischer Th17-Zellen (Batten et al., 2006; Stumhofer et al., 2006; Yoshimura et al., 2006). Das von Th17-Zellen produzierte IL-17 hält Entzündungsreaktionen aufrecht, indem es die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen induziert und somit andere Immunzellen, insbesondere Makrophagen und Neutrophile zum Ort des Geschehens rekrutiert. Das IL-17-inhibierende IL-27 ist demnach in der Lage, durch IL-17 induzierte pathologische Immunreaktionen wie Gewebeschädigungen abzuwenden (Batten und Ghilardi, 2007). Es wurde außerdem beschrieben, dass IL-27 bei mit Autoimmunität assoziierten Th9-Zellen inflammatorisches IL-9 supprimiert, während IL-10 und IFN γ induziert werden (Murugaiyan et al., 2012).

Darüber hinaus ist IL-27 befähigt, die IL-10-Produktion bei CD4⁺ und CD8⁺ Zellen zu fördern (Batten et al., 2008). Jedoch wurde über CD8⁺ Gedächtnis-T-Zellen berichtet, dass IL-27 aufgrund einer verringerten Expression der IL-27-Rezeptor-Untereinheit gp130 nicht länger IL-10 induzieren kann (Perona-Wright et al., 2012).

1.6 Fragestellung und Ziel der vorliegenden Arbeit

Neonatale Immunantworten unterscheiden sich in ihrer Qualität von adulten Immunantworten. Nebeneffekt dieser notwendigen Anpassung an die postnatale Umwelt ist eine erhöhte Infektionsanfälligkeit Neugeborener. Untersucht man neonatale und adulte dendritische Zellen, gibt es bezüglich der Expression des pleiotropen Zytokins IL-27 deutliche Unterschiede. IL-27 wird von neonatalen DCs im Vergleich zu adulten DCs vermehrt exprimiert. Aus diesem

Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht, welche Wirkungen das von neonatalen DCs verstärkt gebildete IL-27 auf die neonatale Immunität hat. Hierbei wurde der Fokus insbesondere auf potentielle autokrine Effekte von IL-27, d.h. Effekte auf die DCs selbst, gelegt.

Um DCs *in vitro* untersuchen zu können, wurde von einem gängigen Modellsystem Gebrauch gemacht: Aus Monozyten wurden mithilfe der Wachstumsfaktoren IL-4 und GM-CSF (Granulocyte Monocyte-Colony Stimulating Factor) unreife moDCs differenziert (Sallusto und Lanzavecchia, 1994), deren Phänotyp dem der mDCs nahe kommt. Auch *in vivo* sind Monozyten als Vorläuferzellen von mDCs bekannt.

Darüber hinaus wurden Vollblutkulturen durchgeführt, bei denen mDCs und pDCs direkt im Blut, ohne vorherige Isolation der einzelnen Zelltypen, untersucht wurden.

Ein Ziel war es dabei herauszufinden, inwieweit IL-27 seine eigene Produktion beeinflusst. Als weiterer Aspekt potentieller autokriner Mechanismen wurde die Wirkung von IL-27 auf die Expression des DC-ständigen IL-27-Rezeptors analysiert.

Da dendritische Zellen in ihrer Funktion als professionelle antigenpräsentierende Zellen die angeborene mit der adaptiven Immunantwort verknüpfen, wurde die diesbezügliche Expression kostimulatorischer Moleküle unter dem Einfluss von IL-27 analysiert.

IL-27 ist als Zytokin bekannt, welches sowohl pro-, als auch antiinflammatorische Charakteristika aufweist. Vor diesem Hintergrund wurde der Einfluss von IL-27 auf die Sekretion proinflammatorischer Zytokine im Vergleich zwischen neonatalen und adulten moDCs untersucht. Ziel war es, nicht nur die Wirkung unterschiedlicher IL-27-Konzentrationen zu analysieren, sondern auch die Wirkung von IL-27 im Zusammenspiel mit anderen Stimuli wie LPS, IFN γ oder IL-21 zu untersuchen.

Außerdem war es von Interesse möglichst umfassend zu überprüfen, inwieweit IL-27 die Expression von Interferon-stimulierbaren Genen beeinflusst, da diese mit antiviralen Immunantworten assoziiert sind.

Darüber hinaus wurde der Einfluss von IL-27 auf die Expression von Genen, die in die Antigenpräsentation involviert sind, analysiert.

Zusätzlich zu den Untersuchungen der direkten autokrinen Effekte war eine Fragestellung, welche Bedeutung neonatale DCs bei der Initiierung von T-Zell-Antworten haben. Dabei wurde insbesondere analysiert, inwiefern sich IL-27 und somit neonatale moDCs auf die Zytokinexpression von T-Zellen und auf deren Proliferationsneigung auswirken.

2 Material und Methoden

2.1 Probengewinnung und Zellisolation

2.1.1 Blutproben

Das verwendete Nabelschnurblut wurde aus dem Kreißsaal der Frauenklinik der Universitätsmedizin Mainz zur Verfügung gestellt. Nach Einholen einer schriftlichen Patienten-Erlaubnis durch die Frauenklinik wurde bei termingerechten, unkomplizierten Kaiserschnittgeburten (mindestens 35. Schwangerschaftswoche) Blut aus der Nabelschnurvene entnommen. Das Blut freiwilliger adulter Spender stammte aus in der Transfusionszentrale der Universitätsmedizin Mainz durchgeführten Leukapheresaten und Blutspenden.

Heparin Natrium-Spritzen für die Blutentnahme

- 1 ml Heparin Natrium (25000 IE, Ratiopharm)
- ad 25 ml PBS (Endkonzentration 200 IE)
- daraus jeweils 4 ml in 20 ml Spritze aufziehen für die Abnahme von 16 ml Nabelschnurblut

2.1.2 Isolierung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs)

Um PBMCs aus Vollblut zu isolieren, wurde dieses zunächst mit auf 37°C vorgewärmtem HBSS-Puffer im Verhältnis 3:4 (3 Teile Vollblut, 4 Teile HBSS) verdünnt und vorsichtig gemischt. Anschließend wurde jeweils Ficoll im gleichen Volumen wie das zu bearbeitende Blut in 50 ml PP-Röhrchen (Greiner BioOne) vorgelegt und anschließend vorsichtig mit dem Blut-HBSS-Gemisch überschichtet. Nach einer 20-minütigen Dichtegradienten-Zentrifugation bei 900xg (ohne Bremse) waren die PBMCs als Interbande deutlich erkennbar und konnten mit einer serologischen Pipette vorsichtig entnommen werden (Abbildung 2.1). Dabei wurde darauf geachtet, möglichst kein Ficoll mit zu überführen.

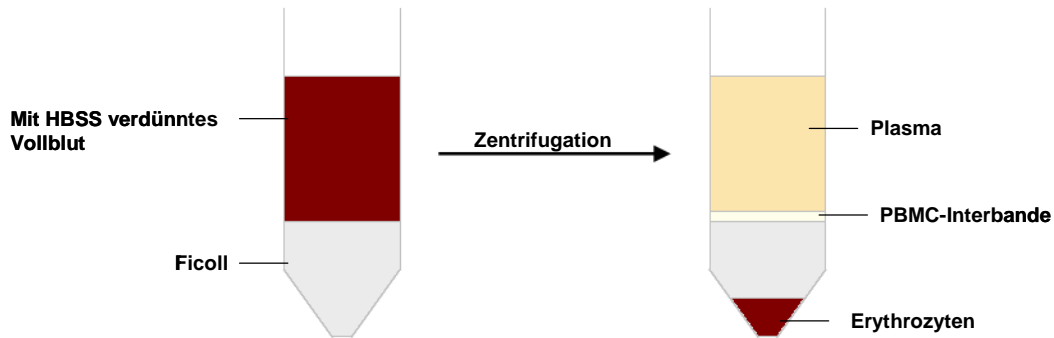


Abbildung 2.1: Dichtegradienten-Zentrifugation zur Isolierung von PBMCs aus Vollblut

Danach erfolgte zunächst ein Waschschrift, bei dem mit HBSS auf 50 ml aufgefüllt wurde, bevor schließlich bei den Nabelschnurblutzellen noch die überschüssigen Erythrozyten mithilfe von ACK-Lyse entfernt wurden. Hierbei ist der osmotische Wert der Erythrozyten geringfügig unter dem des Puffers, so dass diese platzen. Anschließend folgten zwei weitere Waschschrift mit 25 ml HBSS und die Zellzählung (siehe Kapitel 2.1.3).

ACK-Lyse-Puffer

- 4,145 g NH₄Cl
- 0,5 g KHCO₃
- 17,6 mg Na₂EDTA
- in 400 ml Aqua dest. lösen
- pH-Wert zwischen 7,2 und 7,4
- ad 500ml Aqua dest.
- Sterilfiltration durch Filter, Porengröße 0,2 µm

2.1.3 Zellzahlbestimmung

Die zu zählenden Zellen wurden nach vorangegangener Zentrifugation in 1 ml HBSS, MACS-Puffer oder Waschmedium (je nach Weiterverwendung) resuspendiert. Aus dieser Suspension wurden 20 µl entnommen, in ein Röhrchen mit 980 µl 1%iger Essigsäure überführt (=50-fache Verdünnung) und gründlich resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in eine vorbereitete Neubauerkammer pipettiert, so dass diese gerade vollständig gefüllt war. Anschließend wurden alle vier Quadrate der Kammer unter dem Mikroskop ausgezählt, wobei nur die Zellen gezählt wurden, die oben und links auf der Linie lagen, um Doppelzählungen zu vermeiden.

Nachfolgende Formel wurde für die Berechnung der Zellzahl eingesetzt:

$$(n/\text{Kammervolumen}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Suspensionsvolumen} = \text{Zellen}/1000\mu\text{l}$$

Das Kammervolumen der Neubauerkammer beträgt $0,1 \text{ mm}^3 (=0,1 \text{ }\mu\text{l})$. Bei Auszählen aller vier Großquadrate beläuft sich das Volumen demnach auf $0,4 \text{ }\mu\text{l}$. Bei einem Volumen der Ausgangssuspension von 1 ml ergibt sich folgende Rechnung:

$$(n/0,4\mu\text{l}) \times 50 \times 1000\mu\text{l} = \text{Zellen/ } 1000\mu\text{l}$$

2.1.4 Konservierung isolierter Zellen über einen längeren Zeitraum

Die entsprechend Kap. 2.1.2 isolierten PBMCs wurden in Einfriermedium aufgenommen (20-50 Mio/ ml) und in Einfrierröhrchen mit abgedichtetem Schraubverschluss überführt. Diese wurden in Einfrierboxen gestellt und zunächst bei -80°C aufbewahrt. Nach mindestens 24 h Verbleib bei -80°C wurden die Einfrierröhrchen entnommen und zügig in den Stickstofflagertank (ca. -165°C) überführt.

Einfriermedium

FCS (inaktiviert)
10% DMSO (Serva)

2.1.5 Auftauen der Zellen nach Lagerung in Stickstoff

Als erstes wurden in eine der Probanden entsprechende Anzahl beschrifteter 15 ml PP-Röhrchen (Greiner BioOne) 7 ml Waschmedium vorgelegt. Die Einfrierröhrchen mit den aufzutauenden PBMCs wurden aus dem Stickstoff in ein 37°C warmes Wasserbad überführt und dort gerade so lange belassen, bis nur noch ein kleiner Rest des Inhaltes gefroren war. Alle im Folgenden beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten steril. Der Inhalt der Röhrchen wurde zügig in die vorbereiteten Röhrchen überführt. Die Einfrierröhrchen wurden danach jeweils noch mit 1 ml Waschmedium ausgespült, um so viele Zellen wie möglich zu erhalten. Dann wurden die PBMCs für 10 min bei 360xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Der darauf folgende Waschschrift mit Benzonase-Endonuklease (Merck-Millipore) diente der Auflösung eventueller Verklumpungen der Zellen durch die freie DNA und RNA defekter Zellen. Dazu wurden zu jeweils 10 ml WM $2,5 \text{ }\mu\text{l}$ Benzonase gegeben und gemischt, ehe daraus je 5 ml zur Resuspension der Zellen entnommen wurden. Nach diesem Waschschrift mit anschließender Zentrifugation (400xg , 10 min , RT) wurden die Zellen für die weitere Verwendung gezählt.

Waschmedium (WM)

RPMI 1640
100 U/ ml Penicillin
100 µg/ ml Streptomycin

2.1.6 Analyse der Zell-Viabilität**2.1.6.1 TruCount™/Viability-Test**

Um zu testen, wie hoch der Anteil an toten Zellen und die Zellzahl nach dem Auftauen war, wurde eine Analyse mit TruCount™-Röhrchen (BD) durchgeführt. Dazu wurde jeweils in ein Röhrchen inklusive TruCount™-Beads 250 µl PBS pipettiert. Dazu wurden 20 µl aus der Zellsuspension (Zellen resuspendiert in 1 ml Kulturmedium) gegeben. Anschließend wurde jeweils 10 µl Propidium-Jodid-Gebrauchslösung zugegeben. Dieser Farbstoff wird nur von Zellen aufgenommen, deren Zellmembran nicht mehr intakt ist, also von toten und sterbenden Zellen. Die Zellen wurden für 10 min unter Ausschluss von Licht inkubiert. Bei der FACS-Analyse wurde der Anteil an Propidium-Jodid-positiven Zellen (PE-Kanal) an den Gesamtzellen erfasst und es konnte gleichzeitig die Zellzahl erfasst werden.

Propidium-Jodid-Stammlösung

25 mg Propidium-Jodid, MW= 668,4 g/ Mol (Sigma)
in 2,5 ml H₂O

Propidium-Jodid-Färbelösung

600 µl Propidium-Jodid-Stammlösung
in 50 ml PBS
→ 120 µg/ ml

2.1.6.2 Trypanblau-Färbung

Eine weitere angewandte Methode zur Bestimmung des Anteils toter Zellen ist die Färbung mit Trypanblau. Dieser Farbstoff wird nur von toten Zellen aufgenommen. Zu 90 µl aus der Trypanblau-Färbelösung wurden 10 µl der in 1 ml KM resuspendierten Zellen gegeben. Anschließend folgte die Zählung in der Neubauerkammer. Blau angefärbte Zellen wurden als tote Zellen gewertet.

Trypanblau-Färbelösung

0,1% Trypanblau
in PBS

2.1.7 Isolierung von Zellen mittels magnetischer Separation

2.1.7.1 Das Prinzip der magnetischen Zellseparation

Um auf eine bestimmte Zellpopulation zu selektieren, wurde in der vorliegenden Arbeit die magnetische Zellseparation nach dem MACS® -Prinzip (Magnetic Activated Cell Sorter, Miltenyi Biotech) durchgeführt. Hierbei wird die Tatsache ausgenutzt, dass unterschiedliche Populationen für sie spezifische Oberflächenstrukturen aufweisen. Magnetische Partikel, sogenannte *Microbeads*, gekoppelt an Antikörper gegen bestimmte Zell-Antigene, binden an die Zellen. Diese werden anschließend mithilfe der Säulen-Matrix innerhalb eines starken Magnetfeldes zurückgehalten. Mehrfaches Waschen mit Puffer sorgt dafür, dass die Reinheit der zurückgehaltenen Zellen steigt, indem möglichst viele nicht-markierte Zellen ausgespült werden. Ist die zurückgehaltene Zellfraktion von Interesse, wird diese im Anschluss an die Separation mit Druck aus der Säule gespült. Soll mit der nicht-markierten Zellfraktion weiter gearbeitet werden, welche die Säule passiert hat, wird stattdessen das Eluat verwendet.

2.1.7.2 Positivselektion von CD14+ Zellen

Nach der Zellzahlbestimmung wurde zu jeweils 1×10^7 Zellen 80 μl MACS-Puffer gegeben und die Zellen vorsichtig resuspendiert. Dazu wurden zu jeweils 1×10^7 Zellen 20 μl der CD14-Microbeads gegeben, resuspendiert und dann für 15 min dunkel bei 4°C inkubiert. Es folgte ein Waschschriff mit MACS-Puffer mit dem ca. 3-fachen Volumen der Markierungsreaktion und anschließender Zentrifugation (300xg, 10 min, 4°C). Die Zellen wurden danach in 500 μl 4°C -kaltem MACS-Puffer aufgenommen. Für bis zu 80 Mio PBMCs wurde eine MS-Säule (Miltenyi-Biotech) verwendet, für höhere Zellzahlen wurden zwei Säulen parallel eingesetzt. Die MS-Säulen wurden in die vorgesehene Halterung am MACS-Magneten (Miltenyi-Biotech) gegeben und zunächst mit 500 μl MS-Puffer äquilibriert. Sobald die Säule nicht mehr nachtropfte, wurden die in MACS-Puffer resuspendierten, markierten Zellen darauf pipettiert. Erst wenn die Suspension vollständig durch die Säule gelaufen war, wurde mit jeweils 500 μl MACS-Puffer gewaschen (insgesamt 3x). Der Durchlauf wurde ebenfalls aufgefangen (CD14 negative Fraktion). Um die nun in der Säule zurückgehaltene markierte CD14 positive Zellfraktion zu erhalten, wurde die Säule aus dem Magnet entnommen und auf ein 15 ml PP-Röhrchen (Greiner BioOne) gesetzt. Es wurde 1 ml MACS-Puffer auf die Säule pipettiert und sofort mit dem beiliegenden passenden Stempel durch die Säule gepresst, so dass die Zellen aus der Säule in das Röhrchen überführt wurden. Die Negativfraktion im Durchlauf wurde bei Bedarf erneut mit FCS/ 10% DMSO eingefroren zur späteren Verwendung.

2.1.7.3 Negativselektion von CD4⁺ Zellen

Nach dem Auftauen der Negativfraktion der CD14-Isolation sollten die CD4⁺ Zellen mittels T cell Isolation Kit II (Miltenyi-Biotech) selektiert werden. Dazu wurden zunächst jeweils 1×10^7 CD4⁺ Zellen mit 40 μ l MACS-Puffer resuspendiert und mit 10 μ l eines Gemisches aus Biotin-markierten Antikörpern unterschiedlicher Spezifitäten markiert. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei 4°C wurden 30 μ l MACS-Puffer und 20 μ l anti-Biotin Microbeads pro 1×10^7 Zellen zugegeben und resuspendiert. Erneut fand eine 15-minütige Inkubation bei 4°C statt, bevor die Zellen mit dem ca. 3-fachen Volumen des Reaktionsvolumens gewaschen und anschließend zentrifugiert (300xg, 10 min, 4°C) wurden. Danach wurden die Zellen in 500 μ l MACS-Puffer resuspendiert und auf die mit 500 μ l MACS-Puffer äquilibrierte MS-Säule im Magneten (Miltenyi-Biotech) gegeben. Es wurde dreimal mit 500 μ l MACS-Puffer gewaschen, wonach sich die gewünschte Zellpopulation im Durchlauf befand.

MACS-Puffer

0,5% BSA (Sigma-Aldrich)

2 mM EDTA (Serva)

in PBS

→ Sterilfiltration durch Filter, Porengröße 0,2 μ m

→ evtl. vorhandene Luftblasen durch Inkubation (30min) im Ultraschallbad entfernt

2.2 Zellkulturen

2.2.1 Generierung monozytärer dendritischer Zellen

Die CD14⁺ Zellen wurden in mit β -Mercaptoethanol angereichertem Kulturmedium aufgenommen (1 Mio/ ml) und je 1 Mio Zellen pro Well in eine 24-Well-Flachbodenplatte ausgesät. Um die Differenzierung der Monozyten in monozytäre DCs zu induzieren, wurden 100 ng/ml GM-CSF sowie 20 ng/ml IL-4 zugegeben. Nach drei Tagen Zellkultur wurde jeweils die Hälfte des Mediums je Well entnommen und neues Medium hinzugefügt. Erneut wurden β -Mercaptoethanol, GM-CSF und IL-4 zugegeben.

D4 moDCs wurden am 3. Tag, d7 moDCs wurden am 6. Tag der Kultur weiterführend stimuliert, jeweils nach dem Mediumwechsel. In der vorliegenden Arbeit wurde überwiegend eine Kulturdauer von 4 Tagen eingehalten. Mit Ausnahme der moDCs, die für FACS-Analysen zur IL-27 Expressionskapazität verwendet wurden: Hierbei wurden sowohl d4, als auch d7 moDCs analysiert. Eine Stimulation der Zellen fand stets ab d3 bzw. ab d6 statt, wobei für 24h oder stimuliert wurde. Die d4 moDCs, von denen Überstände für eine Zytokin-Analyse entnommen wurden, wurden zum Teil auch für 48h stimuliert. Sie werden hier der besseren

Übersichtlichkeit wegen jedoch auch als d4 moDCs bezeichnet, obwohl die Kulturdauer letztlich 5 Tage betrug.

Kulturmedium

RPMI 1640
100 U/ ml Penicillin
100 µg/ ml Streptomycin
1% MEM-Aminosäuren
1% Natrium-Pyruvat
1% L-Glutamin
10% FCS (Hitze-inaktiviert)

2.2.2 Kokulturen aus monozytären dendritischen Zellen und autologen CD4+ T-Zellen

Für die Kokulturen wurden zunächst die CD14+ Zellen wie oben beschrieben selektiert und kultiviert, wonach sie für 24 h mit einem Inflammations-Mix bestehend aus IL-6, TNF- α , IL-1 β und PGE₂ stimuliert wurden. Diese Methode wurde etabliert, um aus Monozyten schnell reife antigenpräsentierende Zellen zu generieren (Dauer et al., 2003). Nach der Kultur der moDCs wurden diese zwei Mal mit Waschpuffer gewaschen und die Zellzahl bestimmt. Aus den CD14 negativen Zellen desselben Probanden wurden wie in Kap. 2.1.7.3 beschrieben autologe CD4+ Zellen durch Negativselektion isoliert.

Für die Kokulturen wurden teilweise Transwell-Einsätze (Greiner BioOne) mit einer Porengröße von 0,4 µm benutzt. Das Prinzip der Kokultur mit Transwells ist, dass die verschiedenen Zelltypen keinen direkten Zell-Zell-Kontakt haben, sondern ausschließlich über von den Zellen sezernierte Zytokine, welche die Membran des Transwell-Einsatzes passieren können, miteinander kommunizieren können.

Die CD4+ T-Zellen wurden für die Kokulturen in mit anti-CD3 Antikörper beschichtete Wells ausgesät. Dazu wurde zuvor anti-CD3 im Verhältnis 1:100 mit Natriumhydrogencarbonat gemischt (2 µg/ ml). Davon wurden jeweils 300 µl in die Wells einer 24-Well-Flachbodenplatte gegeben, bevor die Platte für 1 h bei 37°C inkubiert wurde. Anschließend wurde die Lösung wieder vorsichtig abgesaugt und die Wells mit 300 µl PBS gespült, welches anschließend vorsichtig, aber gründlich wieder abgesaugt wurde.

Das DC-T-Zell-Verhältnis in der Kokultur sollte 1:10 sein, weshalb jeweils 1 Mio CD4+ in 1 ml Kulturmedium/ β -Mercaptoethanol pro Well ausgesät wurde. Danach wurde mit einer sterilen Pinzette vorsichtig jeweils ein Transwell-Einsatz in ein Well gesetzt. In diesen Einsatz wurden dann 1×10^5 moDCs, resuspendiert in 50 µl Kulturmedium/ β -Mercaptoethanol, gegeben. Als Negativkontrolle wurden T-Zellen ohne moDCs kultiviert, indem in den

Transwell-Einsatz ausschließlich das entsprechende Volumen Kulturmedium/ β -Mercaptoethanol pipettiert wurde.

Die autologe Kokultur wurde für 3 Tage inkubiert. An Tag 3 wurden die Überstände entnommen und bei -20°C asserviert, um zu einem späteren Zeitpunkt die darin enthaltenen Zytokine mittels Th1/Th2 CBA zu analysieren (siehe Kapitel 2.3.3).

2.2.3 Vollblut-Kulturen

Im Rahmen dieser Arbeit wurde aufgrund der besseren Verfügbarkeit in erster Linie das Modellsystem der monozytären DCs genutzt. Es sollten jedoch trotz der im Blut geringen Zellzahlen eine Analyse myeloider und plasmazytoider DCs stattfinden. Dazu wurden mDCs und pDCs direkt im Vollblut untersucht, ohne eine vorangehende Isolation. Hierzu wurden jeweils 200 μl Vollblut in die Wells einer 96-Well-Rundbodenplatte gegeben und mit den entsprechenden Stimulanzen versetzt. Die Gesamtkulturdauer betrug 24 h, wobei den Wells für die letzten 16-18 h GolgiPlugTM zugefügt wurde. Dies enthält den Protein-Transport-Inhibitor Brefeldin A, das den intrazellulären Proteintransport unterbindet. Auf diesem Weg werden produzierte Proteine nicht sezerniert und stattdessen im Golgi-Apparat zurückgehalten. Dadurch wird es ermöglicht, diese in der Zelle nachzuweisen.

Um nach der Kultur die adhärennten Zellen besser lösen zu können, wurde den Wells EDTA (2 mM) zugefügt. Anschließend wurde das Blut mit den darin enthaltenen Zellen in FACS-Probenröhrchen mit jeweils 1,4 ml vorgelegtem FACS-Lyse-Puffer überführt und kurz geschüttelt. Dieser Schritt diente der Lyse der im Vollblut befindlichen Erythrozyten. Wenn die Zellen nicht direkt weiterbearbeitet wurden, wurden sie in FACS-Röhrchen mit Deckel bei -80°C asserviert und bei Bedarf im 37°C Wasserbad für 1 h aufgetaut.

FACS-Lyse-Puffer

10x FACS-Lyse-Puffer
1:10 in H_2O

2.2.4 Stimulanzen für die Zellkultur

Stimulanz	Gebrauchsname	Hersteller	Endkonzentration
anti-human CD3	α -CD3	BD Biosciences; Heidelberg	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (für Plattenbeschichtung)
anti-human CD28	α -CD28	BD Biosciences; Heidelberg	2 $\mu\text{g}/\text{ml}$
Brefeldin A	Golgi Plug TM	BD Biosciences; Heidelberg	10 $\mu\text{g}/\text{ml}$

Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor	GM-CSF	Miltenyi Biotech GmbH; Bergisch-Gladbach	100 ng/ml
Interferon-Gamma	IFN γ	Peptotech; Hamburg	50 ng/ml
Interleukin-1 Beta	IL-1 β	Peptotech; Hamburg	10 ng/ml
Interleukin-21	IL-21	Peptotech; Hamburg	50 ng/ml
Interleukin-27	IL-27	R&D Systems; Wiesbaden-Nordenstadt	25-100 ng/ml
Interleukin-4	IL-4	Peptotech; Hamburg	20 ng/ml
Interleukin-6	IL-6	Peptotech; Hamburg	10 ng/ml
Lipopolysaccharid	LPS	InvivoGen; San Diego, Kalifornien/USA	100 ng/ml
5-Nitro-2-furaldehyd-p-hydroxybenzoylhydrazon	Nifuroxazid	Merck KGaA; Darmstadt	30 μ M
Polyinosine-polycytidylic acid	Poly IC	InvivoGen; San Diego, Kalifornien/USA	25 μ g/ml
Prostaglandin E2	PGE2	Sigma-Aldrich Chemie; München	1 μ M
Tumor-Nekrose Faktor Alpha	TNF- α	Peptotech; Hamburg	1000 U/ml

Tabelle 2.1: In Zellkulturen eingesetzte Stimulations-Reagenzien

2.3 Durchflusszytometrie / FACS-Analysen

2.3.1 Das Prinzip der Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie (engl.: *fluorescence activated cell sorting*, *FACS*) dient der Analyse von Zellpopulationen auf der Grundlage von Oberflächenmarkern bzw. intrazellulären Zytokinen.

Zellen in einer Suspension werden hierbei angesaugt und in einem laminaren Flüssigkeitsstrom im hier verwendeten LSRII (BD) einzeln an Laserstrahlen von drei verschiedenen Lasern (rot, blau und violett) vorbeigeleitet. Je nach Größe und Granularität der Zelle und oder der Markierung mit an bestimmte monoklonale Antikörper gekoppelten Fluorochromen, die spezifisch an eine Zellstruktur binden, wird der Laserstrahl von der Zelle abgelenkt. Dieses Signal wird im LSRII -FACS-Gerät (BD) durch verschiedene Filter geleitet und durch *Photomultiplier Tubes (PMT)* verstärkt. Die dadurch verstärkten Signale werden von *Oktagon* und *Trigon* Detektoren gesammelt und in elektronische Signale und schließlich in Daten

umgewandelt. Die Informationen können innerhalb der *FACSDiva* Analyse-Software (BD) in Form eines XY-Graphen („Dot Plot“) dargestellt werden, wobei jeder angezeigte Punkt eine einzelne Zelle repräsentiert.

2.3.2 Probenvorbereitung für die FACS-Analyse

2.3.2.1 Bestimmung der Reinheit separierter Zellfraktionen

Um zu überprüfen, ob die magnetische Separation erfolgreich gewesen ist, wurde ein kleiner Teil der Zellsuspension mit bis zu 1×10^5 Zellen entnommen und in ein FACS-Probenröhrchen überführt. Das Volumen der entnommenen Zellsuspension wurde mit PBS/FCS auf 100 μ l aufgefüllt und 5 μ l des entsprechenden FACS-Antikörpers (z.B. CD14 PE oder CD4 PE) zugegeben, gemischt und für 20 min im Dunkeln bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurden 500 μ l PBS/FCS zugegeben und bei 360xg für 5 min zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurde das Zellsediment in 250 μ l PBS/FCS aufgenommen und sofort im Durchflusszytometer gemessen.

PBS/FCS für FACS-Antikörper-Färbungen

10% FCS (inaktiviert)
in PBS

2.3.2.2 Nachweis von extra- und intrazellulären Antigenen

Mithilfe der durchflusszytometrischen Analyse wurden zum einen Oberflächenantigene, zum anderen intrazelluläre Proteine nachgewiesen.

Im Falle einer zusätzlichen intrazellulären Färbung wurde 16-18 h vor Ende der angestrebten Kulturdauer der Protein-Transport-Inhibitor Brefeldin A (GolgiPlug™) zu den kultivierten Zellen gegeben, um den intrazelluläre Proteintransport zu stören und gebildete Proteine im Golgi-Apparat zurückzuhalten.

Die Zellen (je 1 Mio/ Well ausgesäte Zellen) wurden nach der Inkubation durch gründliches Auf- und Abpittetieren geerntet und in FACS-Probenröhrchen überführt. Die Wells wurden zudem jeweils mit 1 ml PBS nachgespült, um möglichst den Verlust von adhären Zellen zu vermeiden. Die Probenröhrchen wurden zentrifugiert (360 x g, 5 min), ehe die Überstände vorsichtig mit einer Vakuumpumpe abgesaugt wurden.

Das Sediment wurde mit 50 μ l PBS und 50 μ l Sandoglobulin (10% in PBS) resuspendiert und für 5 Minuten inkubiert. Bei Sandoglobulin handelt es sich um humanes IgG, welches dem Blockieren von Fc-Rezeptoren und anderen potentiellen unspezifischen Bindungsstellen für die FACS-Antikörper auf der Zelloberfläche dient.

Anschließend wurden zunächst nur die Antikörper für die Oberflächenfärbung zugegeben. Nach 20 min Inkubation wurde zum Abbrechen der Färbereaktion jeweils 1 ml PBS/FCS zu den Proben gegeben und diese zentrifugiert (360 x g, 5 min).

Sollten nur Oberflächenmarker angefärbt werden, wurden die sedimentierten Zellen anschließend in 300 µl PBS/FCS resuspendiert und im FACS gemessen.

Bei zusätzlicher intrazellulärer Färbung wurde das Sediment stattdessen in 250 µl Cytotfix/Cytoperm aufgenommen und für 20 min dunkel inkubiert. Dieser Schritt diente der Permeabilisierung und Fixierung der Zellmembran. Anschließend wurden die Proben direkt zentrifugiert (360 x g, 5 min). Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen mit 250 µl Perm-Wash-Puffer gewaschen. Nach diesem Waschschrift wurden die Zellen in einem Volumen von 100 µl Perm-Wash-Puffer resuspendiert, ehe die Antikörper für die intrazelluläre Färbung zugegeben wurden. Nach 20 min Inkubation wurde zum Abbrechen der Färbereaktion jeweils 300 µl Perm-Wash-Puffer zu den Proben gegeben und diese zentrifugiert (360 x g, 5 min). Nach diesem letzten Waschschrift wurden jeweils 100 µl Perm-Wash-Puffer und 150 µl PBS/FCS zugegeben, bevor die Proben im FACS gemessen wurden.

Sandoglobulin

10% Sandoglobulin (CSL Behring)
in PBS

Perm-Wash-Puffer

Perm-Wash Puffer 10x
1:10 mit H₂O verdünnen

2.3.2.3 Färbungen zur FACS-Analyse von Vollblutproben

In Kapitel 2.2.4 wurde beschrieben, wie Vollblutproben bearbeitet wurden und schließlich in 350 µl FACS-Lyse-Puffer aufgenommen wurden.

Anschließend wurden die Proben zentrifugiert (5 Minuten, 360 x g), und zweimal mit jeweils 1 ml PBSAN gewaschen. Danach wurde das Zellsediment mit 50 µl PBSAN und 50 µl Sandoglobulin resuspendiert und für 5 Minuten inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen für die Analyse im FACS gefärbt (siehe Kapitel 2.3.2.2).

PBSAN

Natriumazid
ad. PBS

2.3.3 Nachweis sezernierter Zytokine in Zellkultur-Überständen (Cytometric Bead Array, CBA)

Um in den Überständen von Zellkulturen Zytokine nachzuweisen, wurden hier *Cytometric Bead Arrays* (CBA) durchgeführt. Es handelt sich dabei um eine Methode zum zeitgleichen Nachweis sechs unterschiedlicher Zytokine in einem vergleichsweise geringen Probenvolumen. Dazu werden sechs verschiedene Arten von Partikeln (Capture-Beads) verwendet, die jeweils mit Antikörpern beschichtet sind, welche spezifisch an eines der sechs zu untersuchenden Zytokine in den Überständen binden können (Abbildung 2.2). Diese *Capture-Beads* weisen jeweils eine voneinander klar zu unterscheidende Fluoreszenzhelligkeit auf, die es ermöglicht, im FACS unterschiedliche Bead-Populationen zu differenzieren.

Um die Quantifizierung der jeweiligen Proteinmengen in den Proben zu ermöglichen, wurde eine Standard-Verdünnungsreihe angesetzt. Der im Kit enthaltene lyophilisierte Standard wurde dazu zunächst mit 2 ml des *Assay Diluent* rekonstituiert und für 15 min äquilibriert. Danach wurden aus diesem *Top-Standard* (5000 pg/ml) 300 µl entnommen und in ein mit 300 µl *Assay Diluent* vorbereitetes Röhrchen gegeben. Mit der hergestellten 1:2-Verdünnung wurde ebenso verfahren um eine 1:4-Verdünnung zu erhalten; danach wurde in gleicher Weise die Verdünnungsreihe fortgeführt bis zu einer 1:1024-Verdünnung des Standards (5 pg/ml).

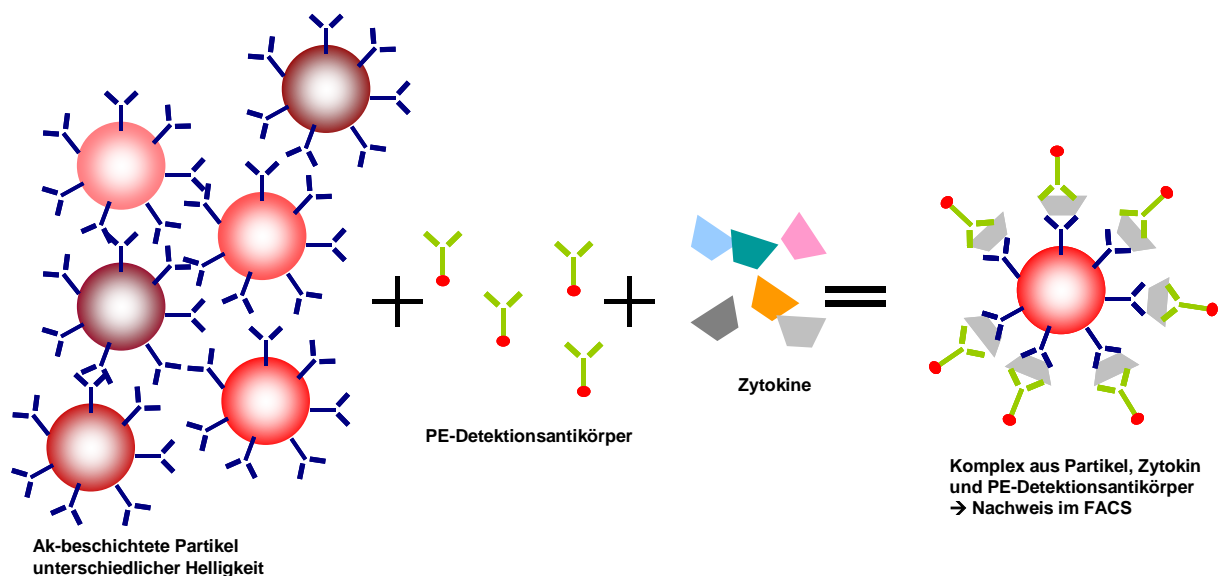


Abbildung 2.2: Das Prinzip des *Cytometric Bead Array* (CBA) zum Nachweis sezernerter Zytokine in Zellkultur-Überständen

Für einen Versuch wurde eine Reihe an FACS-Probenröhrchen vorbereitet, die der Probenzahl und Anzahl der Standardröhrchen entsprach.

Weiterhin wurde eine Mischung der sechs verschiedenen *Capture-Beads* angesetzt. Dazu wurden aus den einzelnen *Capture-Bead*-Suspensionen nach gründlichem Mischen jeweils 2,5 µl x der Anzahl (Proben + Standardröhrchen) eingesetzt. Die *Capture-Beads* wurden geschüttelt, ehe daraus für jedes Test-Röhrchen 12,5 µl entnommen wurden. In jedes Standard-Teströhrchen wurden nun zudem 12,5 µl aus der entsprechenden Standard-Verdünnung pipettiert, während in die Proben-Teströhrchen jeweils 12,5 µl des jeweiligen Zellkulturüberstandes gegeben wurde. Vorher wurden eventuell vorhandene Zellreste in den Überständen durch Zentrifugation sedimentiert. In alle Test-Röhrchen wurden schließlich 12,5 µl *PE Detection Reagent* pipettiert. Nach gründlichem Durchmischen des Inhaltes wurden die Röhrchen dunkel gestellt und für 3 h bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit 300µl *Wash Buffer*, wonach die Teströhrchen für 5 min bei 200xg (Raumtemperatur) zentrifugiert wurden. Nachdem der Überstand abgesaugt wurde, wurde das Pellet vor der durchflusszytometrischen Analyse in 250 µl *Wash Buffer* aufgenommen. Die Datenanalyse erfolgte mit der *FCAP*-Software (BD).

Human Inflammation Kit:

Capture Beads: Human IL-8, Human IL-1β, Human IL-6, Human IL-10, Human TNF-α, Human IL-12p70

Human Inflammation Standard (rekombinante Proteine: Human IL-8, Human IL-1β, Human IL-6, Human IL-10, Human TNF-α, Human IL-12p70)

Human Inflammation PE Detection Reagent (PE konjugierte Antikörper spezifisch für die nachzuweisenden Zytokine)

Human Th1/Th2 Kit:

Capture Beads: Human IL-2, Human IL-4, Human IL-5, Human IL-10, Human TNF-α, Human IFNγ

Human Th1/Th2 Standard (rekombinante Proteine: Human IL-2, Human IL-4, Human IL-5, Human IL-10, Human TNF-α, Human IFNγ)

Human Th1/Th2 PE Detection Reagent (PE konjugierte Antikörper spezifisch für die nachzuweisenden Zytokine)

2.3.4 Durchflusszytometrische Analyse der T-Zell-Proliferation

2.3.4.1 Das Prinzip des Proliferationsassays mit CFSE

Um den Einfluss von IL-27 auf die Proliferation zu testen, wurde der Farbstoff Carboxyfluorescein Diacetat Succinimidylester (CFSE) verwendet (Abbildung 2.3). CFSE diffundiert aufgrund seiner physikochemischen Eigenschaften in die Zellen.

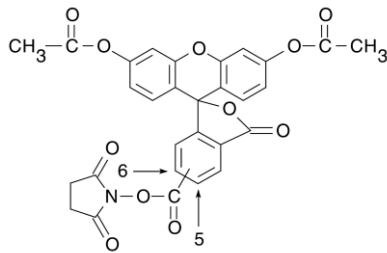


Abbildung 2.3: Strukturformel des Farbstoffes CFSE, der zum Nachweis der Proliferation dient. Quelle: Invitrogen Molecular probes <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp34554.pdf> (zitiert am 15.03.13)

Dort werden durch intrazelluläre Esterasen die Acetatketten entfernt, und das entstehende Carboxyfluorescein verbleibt länger in der Zelle. Die CFSE-Moleküle gehen kovalente Bindungen mit intrazellulären Aminen ein, so dass fluoreszierende Konjugate entstehen (Parish, 1999). Überschüssiges CFSE kann anschließend ausgewaschen werden.

2.3.4.2 Durchführung des CFSE- Proliferationsassays

Isolierte CD4⁺ T-Zellen wurden in vorgewärmtem PBS/BSA resuspendiert (1 Mio/ ml). Anschließend wurden pro 1 Mio Zellen 2 µl der CFSE-Färbelösung zugesetzt. Die Zellen wurden für 10 min bei 37°C mit dem Farbstoff inkubiert.

Die Reaktion wurde abgestoppt, indem die 5-fache Menge an eiskaltem KM zugegeben wurde und die Proben für 5 min auf Eis inkubiert wurden. Anschließend folgte ein Zentrifugationsschritt (360 x g; 10 min), wonach der Überstand dekantiert wurde. In der gleichen Weise wurden drei weitere Waschschrte mit eiskaltem KM durchgeführt. Schließlich wurden je Mio Zellen pro ml in Kulturmedium/ β-Mercaptoethanol aufgenommen und in eine zuvor mit jeweils 50 µl anti-CD3-Antikörper (10 µg/ ml in 0,1 M NaHCO₃) beschichtete Platte überführt (siehe Kap. 2.2.3). Um den Effekt von neonatalen DCs auf die T-Zellproliferation zu testen, wurden T-Zellen zum einen direkt für 4 Tage mit IL-27 stimuliert (zusammen mit 2 µg/ ml anti-CD28-Antikörper als Kostimulus), und zum anderen wurden T-Zellen mit vorstimulierten moDCs kokultiviert.

Für diese Kokulturen wurden keine Transwells benutzt, da hierfür Zellkontakt erwünscht war. Hierbei wurden als Kontrolle T-Zellen ohne DCs verwendet, zu denen kostimulatorisches anti-CD28 gegeben wurde. Zu den bereits ausgesäten Zellen wurden jeweils unstimulierte bzw. mit

IL-27 vorstimulierte moDCs (siehe Kap. 2.2.1/ 2.2.2) im Verhältnis 1:10 gegeben, die Inkubation erfolgte für 6 Tage. Alle Bedingungen wurden als Triplikate angesetzt.

PBS/BSA

10% BSA
in PBS

CFSE-Färbelösung (2,5 mM)

CFSE
in DMSO

2.3.5 Verwendete Reagenzien für die FACS-Analyse

2.3.5.1 Antikörper für die FACS-Analyse

Spezifität	Fluorochrom	Hersteller	Verdünnung
IL-27	Fluorescein	R&D Systems; Wiesbaden-Nordenstadt	1:10
HLA-DR	PerCp	BD Biosciences; Heidelberg	1:20
HLA-ABC	APC	BD Biosciences; Heidelberg	1:20
TNFalpha	PECy7	BD Biosciences; Heidelberg	1:20
IP-10 (=CXCL10)	PE	BD Biosciences; Heidelberg	1:20
CD11c	APC	BD Biosciences; Heidelberg	1:20
CD11c	V450	BD Biosciences; Heidelberg	1:20
CD123	PE	BD Biosciences; Heidelberg	1:20
CD40	PE	BD Biosciences; Heidelberg	1:20
CD80	PE	BD Biosciences; Heidelberg	1:20
CD86	PE	BD Biosciences; Heidelberg	1:20
CD209	APC	BD Biosciences; Heidelberg	1:20
CD14	APC	BD Biosciences; Heidelberg	1:20
CD14	PECy7	BD Biosciences; Heidelberg	1:50
CD4	PE	BD Biosciences; Heidelberg	1:20
CD4	APC	BD Biosciences; Heidelberg	1:20

Tabelle 2.2: Fluorochrom-konjugierte Antikörper für die FACS-Analyse

2.3.5.2 Sonstige benötigte Reagenzien für die FACS-Analyse

Name	Anwendung	Hersteller
Cytofix/Cytoperm	Permeabilisierung und Fixierung der Zellmembran	BD Biosciences; Heidelberg
FACSClean	Reinigen des Durchflusszytometers	BD Biosciences; Heidelberg

FACS-Lyse Buffer	Erythrozyten-Lyse (Vollblut-Proben)	BD Biosciences; Heidelberg
FACSRinse	Spülen des Durchflusszytometers	BD Biosciences; Heidelberg
Perm Wash Puffer (PWP)	Waschen bei intrazellulären Zytokinfärbungen	BD Biosciences; Heidelberg
Sandoglobulin	Blockieren von Fc-Rezeptoren und unspezifischen Bindungsstellen auf der Zelloberfläche	CSL Behring; Hattersheim am Main
CompBeads Mouse/Rat	Fluorochrom-Kompensation	BD Biosciences; Heidelberg

Tabelle 2.3: Reagenzien für die FACS-Analyse

2.4 Molekulargenetische Methoden

2.4.1 RNA-Isolation aus monozytären dendritischen Zellen

Die RNA aus moDCs wurde mithilfe des *High Pure RNA Isolation Kits* (Roche) isoliert. Dazu wurde nach Entnahme des Zellkultur-Überstandes PBS zu den Zellen in den Wells gegeben und die Kulturplatte für 10 min bei 37°C inkubiert. Durch gründliches Auf- und Abpipettieren wurden die adhärennten moDCs anschließend aus den Wells gelöst und in 15 ml PP-Röhrchen überführt. Nach Zentrifugation bei 360xg für 10 min bei Raumtemperatur wurde der Überstand dekantiert, danach wurden die Zellen (3-5 Mio) in 200 µl PBS aufgenommen und resuspendiert. Zu den Proben wurden jeweils 400 µl des Lyse-/Bindepuffers gegeben und gründlich gemischt. Die Proben im Lyse-/Bindepuffer wurden dann auf die im Kit beiliegenden Säulen aus Glasfaservlies pipettiert, die zuvor auf die beiliegenden Auffangröhrchen gesetzt wurden. Nukleinsäuren können in Anwesenheit des chaotropen Salzes Guanidiniumchlorid, welches im Lyse-/Bindepuffer enthalten ist, an den Filter binden. Nach einem 15-sekündigen Zentrifugationsschritt bei 10 000 Umdrehungen (U)/ min wurde das in den Röhrchen befindliche Eluat verworfen und die Säule erneut auf das Auffangröhrchen gesetzt. Danach wurde je Probe 10 µl DNase I mit 90 µl DNase Inkubationspuffer verdünnt und auf den Filter gegeben. Nach 15-minütiger Inkubation, die der Entfernung genomischer DNA diente, wurden 500 µl Waschpuffer I hinzugefügt und die Säulen im Auffangröhrchen für 15 sec bei 10 000 U/ min zentrifugiert. Nach erneutem Verwerfen des Eluates wurden jeweils 500 µl Waschpuffer II auf die Filter gegeben, und wiederum wie oben beschrieben zentrifugiert. Nach Entleeren des Durchlaufes wurden noch einmal 200 µl Waschpuffer II auf die Säulen gegeben und diesmal für 2 min bei 13 000 U/ min

zentrifugiert, um eventuelle Reste des Waschpuffers II gründlich zu entfernen. Nach diesem Schritt wurden die Auffangröhrchen entsorgt und die Filter stattdessen auf 1,5 ml Röhrchen (Eppendorf) gesetzt. Nun erfolgte die Elution der im ersten Schritt an den Filter gebundenen RNA, indem 50 µl Elutions-Puffer auf die Säule pipettiert und 1 min inkubiert wurde, ehe ein letzter Zentrifugationsschritt bei 8000 U/ min für 1 min durchgeführt wurde.

Die Konzentration und die Reinheit der eluierten RNA wurden mittels NanoDrop™ (Peqlab) photometrisch bestimmt. Die RNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -80°C aufbewahrt.

High Pure RNA Isolation Kit (Roche)

Lyse-/ Bindepuffer

4,5 M Guanidiniumchlorid
50 mM Tris-HCl
30% Triton X-100, pH 6,6

Waschpuffer I

nach Zugabe von 20 ml Ethanol:
5 M Guanidinhydrochlorid
20 mM Tris-HCl
pH 6,6

Waschpuffer II

nach Zugabe von 40 ml Ethanol:
20 mM NaCl
2 mM Tris-HCl
pH 7,5

DNase Inkubationspuffer

1 M NaCl
20 mM Tris-HCl
10 mM MnCl₂
pH 7

DNase I

10 KU in 550 µl Elutionspuffer rekonstituiert, in Aliquots bei -20°C aufbewahrt

Elutionspuffer

Aqua bidest. (nukleasefrei und steril)

2.4.2 Reverse Transkription

Um die RNA-Menge mittels Real Time PCR bestimmen zu können, muss auf der Grundlage der einzelsträngigen RNA zunächst die stabilere *complementary*-DNA (cDNA) hergestellt werden. Diese Reaktion wird als reverse Transkription (RT) bezeichnet. Als Enzym dient hierbei die Reverse Transkriptase, welche das Umschreiben von RNA in DNA katalysiert. Die eingesetzten Random Primer, bei denen es sich um Hexadeoxynukleotide mit zufälliger Sequenz handelt, lagern sich an die mRNA-Moleküle an und dienen somit als Ansatzstellen für die Reverse Transkriptase. Diese synthetisiert im ersten Schritt einen an die Matrizen-RNA angelagerten cDNA-Erststrang (DNA-Polymerase-Aktivität). Anschließend wird mithilfe der Exoribonuklease-Aktivität der RNA-Anteil des Hybridmoleküls abgebaut, wodurch letztendlich die für die relative Quantifizierung benötigte einzelsträngige cDNA vorliegt.

RT-Reaktionen wurden wie folgt angesetzt:

2 µl 10x Puffer
2 µl dNTPs (je 0,5 mM)
2 µl Random Primer (0,5 µg/ µl)
0,5µl RNase Inhibitor (20 U/ µl)
1 µl Reverse Transkriptase O (4U/ µl)
1 µg RNA
ad 20 µl H₂O (RNase frei)

→ Die Inkubation erfolgte für 1 h bei 37°C im Wasserbad. Danach wurden die cDNA-Proben entweder direkt in eine Real Time PCR Reaktion eingesetzt, oder sie wurden bei -20°C aufbewahrt.

2.4.3 Real Time PCR

2.4.3.1 Das Prinzip der Real Time PCR

Die Real Time PCR ist eine Methode zur quantitativen Erfassung der Genexpression. Sie basiert auf der Polymerase-Ketten-Reaktion, einer enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente (Mullis et al., 1986). Zu diesem Zweck werden Primer benötigt, 18-30 Basenpaare lange, einzelsträngige Oligonukleotide, die eine zur Matrizen-DNA komplementäre Sequenz aufweisen müssen. Das Enzym, die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase, setzt an den gebundenen Primern an und beginnt von hier ausgehend die Neusynthese eines DNA-Stranges aus den ihr zur Verfügung stehenden Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs). Eine PCR läuft prinzipiell in drei zyklisch wiederholten Schritten ab: Die Denaturierung der Matrizen-DNA in Einzelstrang-Moleküle,

die Anlagerung der Primer an ihre Zielsequenz (Annealing), und schließlich die Elongation der neusynthetisierten DNA-Stränge. Dadurch findet eine exponentielle Amplifikation der DNA statt.

Die Real Time PCR unterscheidet sich von einer konventionellen PCR dadurch, dass sie eine Quantifizierung des Ausgangstemplates (cDNA) aufgrund der während der Amplifikation gemessenen Fluoreszenz erlaubt. Dazu können Sonden verwendet werden, die spezifisch an ein PCR-Produkt binden. Diese kurzen TaqMan-Sonden besitzen an ihrem 5'-Ende einen Reporter- Fluoreszenzfarbstoff, an ihrem 3'-Ende einen Quencher. Befinden sich Reporter und Quencher in räumlicher Nähe zueinander, wird bei Anregung durch den Laser ein Teil der Energie des Reporters auf den Quencher übertragen. Dieses Phänomen bezeichnet man als Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET). Sobald die an den Einzelstrang der Matrizen-DNA gebundene Sonde durch die fortschreitende Taq-Polymerase hydrolysiert wird, werden Reporter und Quencher räumlich voneinander getrennt, was den FRET unterbindet. Aufgrund dessen wird das Signal des Reporters nun verstärkt. Je mehr Ausgangsmaterial in der Probe vorhanden war, desto eher überschreitet dieses Signal den zur Detektion notwendigen Schwellenwert (Threshold), zurückzuführen auf den exponentiellen Anstieg der Fluoreszenz. Als Cp-Wert wird der Zyklus bezeichnet, in dem dieser Anstieg erstmalig den Threshold überschreitet.

2.4.3.2 Durchführung der Real Time PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde eine relative Quantifizierung mittels des sondenbasierten TaqMan Mastermix (Roche) durchgeführt.

Alle nachfolgend beschriebenen Arbeitsschritte erfolgten auf Eis. Zunächst wurde der TaqMan Mastermix vorbereitet, indem 10 µl aus Lösung a (Enzym) in Lösung b (Puffer) pipettiert und vorsichtig gemischt wurden. Als feste Bezugsgröße für die relative Quantifizierung wurde ein Kalibrator in ausreichend großem Maßstab hergestellt, um für alle Experimente einer Versuchsreihe auszureichen. Dabei handelte es sich um die cDNA aus den PBMCs eines adulten Spenders, die mit 5 µg/ml PHA (Phythämagglutinin) stimuliert worden sind. PHA ist ein Mitogen, welches T-Zellen umfassend aktiviert. Die Zellen wurden nach 24 h geerntet, ihre RNA isoliert und diese anschließend in cDNA umgeschrieben (siehe 2.4.1 und 2.4.2).

Die *Mastermixe* wurden wie folgt angesetzt (x Anzahl Proben + Kalibrator + Negativkontrolle):

- 10,4 µl H₂O (PCR grade, Roche)
 - 0,2 µl left Primer (MWG Operon)
 - 0,2 µl right Primer (MWG Operon)
 - 0,2 µl UPL-Sonde (Roche)
 - 4 µl TaqMan Mastermix (Roche)
-
- =15 µl

Folgendes Beispiel dient der Veranschaulichung: Proben 1-12 sollen hinsichtlich der Expression von XY mRNA analysiert werden. Es wird jeweils ein Mastermix für Primer XY, als auch ein Mastermix für das Referenzgen TBP (TATA-Box binding protein) angesetzt. Da zusätzlich zu den 12 Proben außerdem jeweils noch der Kalibrator und eine Negativkontrolle (5 ml H₂O) mitgeführt werden soll, wird in diesem Beispiel die 14 fache Menge beider Mastermixe benötigt. Insgesamt werden 28 Kapillaren verwendet.

In jede Kapillare werden 15 µl des Mastermixes gegeben, dazu werden jeweils 5 µl der entsprechenden cDNA (Probe oder Kalibrator) gegeben. Alle Kapillaren werden kurz zentrifugiert, bevor sie in den Rotor des Light Cyclers gesetzt werden.

Folgendes Light Cycler™-Programm wurde generell für sondenbasierte Real Time PCR-Reaktionen verwendet:

	Analysis Mode	Cycles	Target Temperature	Hold Time	Aquisition Mode
<i>Pre- Incubation</i>	<i>none</i>	1	95°C	10 min	<i>none</i>
<i>Amplification</i>	<i>Quantification</i>	45	95°C (Denaturierung)	10 sec	<i>none</i>
			60°C (Annealing)	30 sec	<i>none</i>
			72°C (Elongation)	1 sec	<i>single</i>
<i>Cooling</i>	<i>none</i>	1	40°C	30 sec	<i>none</i>

Tabelle 2.4: Light Cycler™-Programm für die sondenbasierte Real Time PCR

Die ermittelten Cp-Werte wurden in die folgende Formel eingesetzt, um die relative Menge der cDNA (entspricht Ausgangs-mRNA-Menge) bezogen auf den Kalibrator zu berechnen:

$$2^{-(Cp \text{ Zielgen Kalibrator} - Cp \text{ Zielgen Probe})} \times 2^{-(Cp \text{ Referenzgen Probe} - Cp \text{ Referenzgen Kalibrator})}$$

2.4.3.3 Für die Real Time PCR Verwendete Primer und Sonden

Bezeichnung	Sequenz (5' nach 3')	UPL-Sonde #
TBP left	GCT GGC CCA TAG TGA TCT TT	3
TBP right	CTT CAC ACG CCA AGA AAC AGT	
WSX-1 left	CCC CCT CCG AGT TAC ACC	21
WSX-1 right	ACT GCC ACA GTC TGG GTT TT	
IL-27p28 left	GCC AGG AGT GAA CCT GTA C	51
IL-27p28 right	TGG TGG AGA TGA AGC AGA GA	
CCL23 left	CAC CAG GAG GAT GAA GGT CT	51
CCL23 right	TCA TGA ACT CTG TCT CTG CAT CT	
CCR1 left	TCT GAC TCT TGG CAC AGC AT	76
CCR1 right	GCC ACC ATT ACA TTC CCT CTC	
CXCL10 left	GAA AGC AGT TAG CAA GGA AAG GT	34
CXCL10 right	GAC ATA TAC TCC ATG TAG GGA AGT TA	
IRF8 left	GAG GTG GTC CAG GTC TTC G	20
IRF8 right	CGG CCC TGG CTG TTA TAG	
IRF2 left	GCT AGA CAT GGG TGG GAT GT	19
IRF2 right	CTC CTG GTT GAT GCT TTC CT	
IRF7 left	AGC TGT GCT GGC GAG AAG	13
IRF7 right	TGT GTG TGT GCC AGG AAT G	

Tabelle 2.5: Für die Real Time PCR verwendete Primer (alle von MWG Operon) und zugehörige *Universal Probe Library*-Sonden (alle von Roche)

2.4.4 PCR Arrays zur Gen-Expressionsanalyse

Um die Expression mehrerer Gene gleichzeitig zu analysieren, wurden *RT² Profiler PCR Arrays* (SABiosciences, Qiagen) verwendet (Abbildung 2.4). In der vorliegenden Arbeit wurden ein „*Dendritic and Antigen Presenting Cell*“ PCR Array und ein „*Interferon and Receptor*“ PCR Array durchgeführt. Jeder Array dient dem Nachweis von 84 Genen, gleichzeitig werden auch 5 Haushaltsgene erfasst. Zudem enthält die jeweils für eine Probe verwendete 96-Well PCR Array-Platte Kontrollen (wie z.B. RT-Effizienz, evtl. Verunreinigung mit genomischer RNA oder Reproduzierbarkeit). Es wurden jeweils drei Kontrollproben (unstimuliert) sowie jeweils drei mit 50 ng/ ml IL-27 stimulierte Proben (beides CB und AB) untersucht.

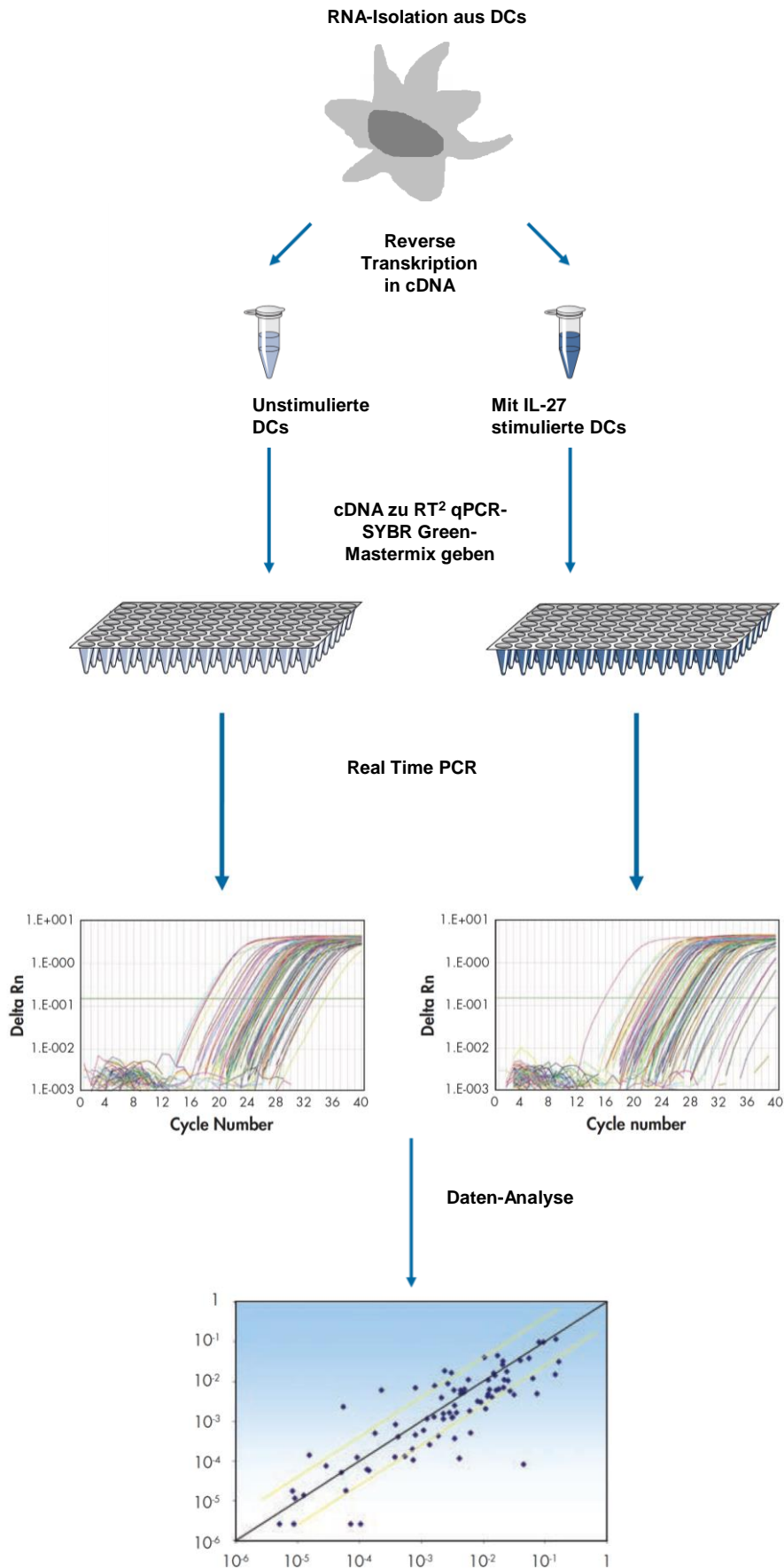


Abbildung 2.4: Überblick über die Durchführung der RT² Profiler PCR Arrays (SABiosciences, Qiagen);
 Quelle: <http://www.sabiosciences.com/pathwaymagazine/pcrhandbook-qiagen/pdfs/pcrarrayguide-qiagen.pdf>
 (zitiert am 27.06.13), modifiziert

Die Herstellung von cDNA durch reverse Transkription der isolierten RNA aus d4 moDCs erfolgte hierbei mit dem *RT² First Strand Kit* (Qiagen). Zunächst wurde wie folgt ein Puffer zur Entfernung genomischer DNA (gDNA) verwendet:

gDNA-Eliminationsmix

RNA (25 ng- 5 µg)
GE (5x gDNA Elimination Buffer)
ad 10 µl H₂O

→ Die Komponenten wurden vorsichtig, aber gründlich gemischt, gefolgt von einer kurzen Zentrifugation. Die Inkubation erfolgte bei 42°C für 5 min. Danach wurde die Probe mindestens für 1 min auf Eis abgekühlt. Der RT-Reaktion wurde folgendermaßen angesetzt (je Reaktion):

RT-Cocktail

4 µl BC3 (5x RT Puffer)
1 µl P2 (Primer & External Control Mix)
2 µl RE3 (RT Enzyme Mix 3)
3 µl H₂O

10 µl

→ Die Reagenzien wurden gründlich, aber vorsichtig gemischt, gefolgt von einem kurzen Zentrifugationsschritt. Anschließend wurden die Komponenten für die Erststrang-DNA-Synthesereaktion zusammengefügt:

Erststrang-cDNA-Synthese:

10 µl aus RT-Cocktail
10 µl aus gDNA-Eliminationsmix

→ Die Reagenzien wurden gründlich, aber vorsichtig gemischt, gefolgt von einer kurzen Zentrifugation. Die Inkubation erfolgte bei 42°C für 15 min, anschließend wurde die enzymatische Reaktion sofort durch 5-minütige Inkubation bei 95°C abgestoppt. Schließlich wurden 91 µl H₂O zugegeben und die Probe bis zur weiteren Verwendung auf Eis gestellt oder gegebenenfalls über Nacht bei -20°C aufbewahrt.

Ansatz für Real Time PCR-Array1350 µl 2x SABiosciences RT² qPCR Mastermix

102 µl verdünnte cDNA-Synthese-Reaktion

1248 µl H₂O

2700µl

→ daraus wurden nach Mischen der Komponenten jeweils 25 µl mit einer Mehrkanalpipette in jedes Well der 96-Well PCR-Array Platte gegeben. Die Platte wurde anschließend mit Folie versiegelt und kurz abzentrifugiert.

Die Messung erfolgte im plattenbasierten Light Cycler LC480 (Roche). Dabei wurde folgendes Programm verwendet:

Zyklen	Temperatur	Dauer
1	95°C	10 min
45	95°C	15 sec
	60°C	1 min

Tabelle 2.6: Light CyclerTM-Programm für die Real Time PCR-Arrays

Die gemessenen C_p-Werte wurden anhand der frei zugänglichen Software von SABiosciences ausgewertet und die Änderung der jeweiligen Expression im Bezug auf die unstimulierte Kontrolle („fold changes“) ermittelt. Die Auswertungssoftware ist im Internet zu finden:

<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php?target=upload>

(URL zitiert am 27.06.2013)

2.5 Statistische Analysen

Die Experimente wurden mehrfach wiederholt, so dass die Mittelwerte bzw. Mediane berechnet werden konnten. Zudem wurden Standardfehler bzw. Standardabweichungen berechnet. Zur Beurteilung möglicher Signifikanzen wurden t-Tests durchgeführt.

2.6 Geräte

Gerät	Name	Hersteller
Absauggerät	Vaccusafe	IBS Integra Biosciences; Fernwald, Deutschland
Analysenwaage	Kern 770	Kern & Sohn GmbH; Balingen
Brutschrank	HeraCell 240	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
Durchflusszytometer	LSRII	BD Biosciences; Heidelberg
Durchflusszytometer	FACSCanto	BD Biosciences; Heidelberg
elektrische Pipette	Multipette plus	Eppendorf; Hamburg
Gefrierschrank	Comfort	Liebherr; Kirchdorf an der Iller
Gefrierschrank (-80°C)	Herafreeze	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
Heizblock	/	Peqlab; Erlangen
Kühlschrank	/	Siemens; München
Laborschüttler	Reax2000	Heidolph Instruments; Schwabach
Magnet für Zellseparation	MiniMacs separator	Miltenyi Biotech; Bergisch Gladbach
Mehrkanalpipette	/	Eppendorf; Hamburg
Mikroskop	IX50	Olympus; Hamburg
Mikroskop	/	Zeiss; Oberkochen
pH-Meter	MultiCal pH538	WTW Wissenschaftlich- Technische Werkstätten GmbH; Weilheim
Photometer	Nanodrop	Peqlab; Erlangen
Pipette (max. 10 µl)	Research	Eppendorf; Hamburg
Pipette (max. 100 µl)	Reference	Eppendorf; Hamburg
Pipette (max. 20 µl)	Research	Eppendorf; Hamburg
Pipette (max. 200 µl)	Reference	Eppendorf; Hamburg
Pipette (max.1000 µl)	Reference	Eppendorf; Hamburg
Pipettierhilfe	Pipetus	Hirschmann Laborgeräte; Eberstadt
Real-Time PCR-Gerät (für Kapillaren)	Light-Cycler	Roche; Mannheim
Real-Time PCR-Gerät (für Platten)	Light-Cycler LC480	Roche; Mannheim
Rührer	MR 3002	Heidolph Instruments; Schwabach
Sterilwerkbank	HeraSafe	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
Stickstofflagertank	/	Cryoson GmbH; Kleinkahl
Stickstoffvorratsbehälter	/	Cryoson GmbH; Kleinkahl
Tischzentrifuge	MiniSpin	Eppendorf; Hamburg
Tischzentrifuge		Carl Roth; Karlsruhe
Tischzentrifuge	Heraeus Fresco17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific; Schwerte

Ultraschallbad	Sonorex Super RK103H	Bandelin; Berlin
Wasserbad	E100 Ecoline Star Edition	Lauda; Lauda-Königshofen
Zentrifuge	Heraeus Megafuge 1.0 RS	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
Zentrifuge	Heraeus Multifuge	Thermo Fisher Scientific; Schwerte

Tabelle 2.7: Verwendete Geräte

2.7 Verbrauchsmaterialien

2.7.1 Chemikalien und Reagenzien

Name	Summenformel oder Gebrauchsname	Hersteller
Ammoniumchlorid	NH ₄ Cl	Roth; Karlsruhe
Benzonase-Endonuklease	/	Merck KGaA; Darmstadt
Bovine Serum Albumine	BSA	Sigma-Aldrich; München
Dimethylsulfoxid	DMSO	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Essigsäure	CH ₃ COOH	Riedel de Haen; Seelze
Ethanol	EtOH	Carl Roth; Karlsruhe
Ethylendiamintetra-essigsäure	EDTA	Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg
Fetal Calf Serum	FCS	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
Hanks Buffered Salt Solution	HBSS	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Heparin Natrium-25000	/	Ratiopharm GmbH; Ulm
Kaliumhydrogencarbonat	KHCO ₃	Merck KGaA; Darmstadt
L-Glutamin	L-Gln	Invitrogen; Darmstadt
LSM 1077 Lymphocyte Separation Medium	Ficoll	PAA Laboratories GmbH, Cölbe
Minimal Essential Medium-Aminoacids	MEM-AA	Biochrom; Berlin
Natriumazid	NaN ₃	Carl Roth; Karlsruhe
Natrium-Ethylendiamintetraessigsäure	Na ₂ EDTA	Sigma-Aldrich Chemie; München
Natriumhydrogencarbonat	NaHCO ₃	Carl Roth; Karlsruhe
Natrium-Pyruvat		Invitrogen; Darmstadt

Penicillin/Streptomycin	Pen/Strep	Invitrogen; Darmstadt
Phosphate Buffered Saline	PBS	Invitrogen; Darmstadt
Propidium-Jodid	PI	Sigma-Aldrich Chemie; München
Random Primer	/	Promega; Mannheim
RNase Inhibitor	/	Ambion; Austin, Texas/USA
RPMI1640	/	Invitrogen; Darmstadt
Trypanblau	/	Invitrogen; Darmstadt
β -Mercaptoethanol	/	Invitrogen; Darmstadt

Tabelle 2.8: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

2.7.2 Kits

Kit	Hersteller
Human CD4 T cell isolation kit II	Miltenyi Biotech GmbH; Bergisch-Gladbach
Human CD14 Microbeads	Miltenyi Biotech GmbH; Bergisch-Gladbach
Human Th1/Th2-Cytometric Bead Array	BD Biosciences; Heidelberg
Human Inflammation Cytometric Bead Array	BD Biosciences; Heidelberg
CellTrace™ CFSE Cell Proliferation Kit (CFSE; DMSO)	Molecular Probes/ Invitrogen. Life Technologies; Darmstadt
High Pure RNA Isolation Kit	Roche; Mannheim
TaqMan Mastermix	Roche; Mannheim
RT2 qPCR PCR Arrays	Qiagen; Hilden

Tabelle 2.9: Verwendete Kits

2.7.3 Gebrauchs- und Einwegmaterialien

Produkt	Hersteller
1,5 ml und 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf; Hamburg
15 ml und 50 ml Röhren	Greiner BioOne, Frickenhausen
24-Well-Flachboden-Zellkulturplatten	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
Combi-Stopper	BD Biosciences; Heidelberg
Einfrierboxen	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
Einfrier-Röhren	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
FACS-Teströhren	BD Biosciences; Heidelberg

FACS-Teströhrchen mit Deckel	BD Biosciences; Heidelberg
Kanülen (Microlance)	BD Biosciences; Heidelberg
MS MACS-Säulen	Miltenyi Biotech GmbH; Bergisch-Gladbach
Pipettenspitzen	Starlab, Hamburg
Pipettenspitzen bis 10 µl	Eppendorf; Hamburg
Spritzen	BD Biosciences; Heidelberg
Sterilfilter	Thermo Fisher Scientific; Schwerte
Zellkultureinsätze <i>ThinCert</i> 0,4 µM	Greiner BioOne, Frickenhausen
Zellkulturplatten	Thermo Fisher Scientific; Schwerte

Tabelle 2.10: Verwendete Gebrauchs- und Einwegmaterialien

3 Ergebnisse

3.1 Die Differenzierung von Monozyten zu unreifen monozytären dendritischen Zellen

Da das als unreif bezüglich der Ausbildung von Immunantworten geltende neonatale Immunsystem untersucht wurde, standen die Eigenschaften der mDCs als professionelle antigenpräsentierende Zellen im Fokus. Im peripheren Blut befindet sich jedoch nur eine geringe Zahl an mDCs. Darüber hinaus ist das verwendete Untersuchungsmaterial, das Nabelschnurblut termingerecht durch Kaiserschnitt geborener Kinder, eine begrenzte Ressource. Aufgrund dessen wurden die hier beschriebenen Versuche hauptsächlich mit *in vitro* generierten moDCs durchgeführt. Diese weisen viele Eigenschaften von mDCs auf und dienen somit als ein vergleichbares *in vitro* Modellsystem. Aus zuvor asservierten PBMCs wurden mittels MACS die CD14⁺ Zellen isoliert (siehe Kap. 2.1.7.2). Zwei Qualitätskriterien galten für die isolierten Monozyten: Zum einen wurden die Population auf ihre Reinheit überprüft, welche mindestens 90% betrug (Abbildung 3.1), wobei die restlichen 10% vor allem aus Lymphozyten bestanden. Diese können vernachlässigt werden, da die weiterführenden Kulturbedingungen mit IL-4 und GM-CSF nicht für das Überleben von T-Zellen förderlich ist. Der Anteil der lebenden Zellen nach der magnetischen Separation betrug mindestens 80%.

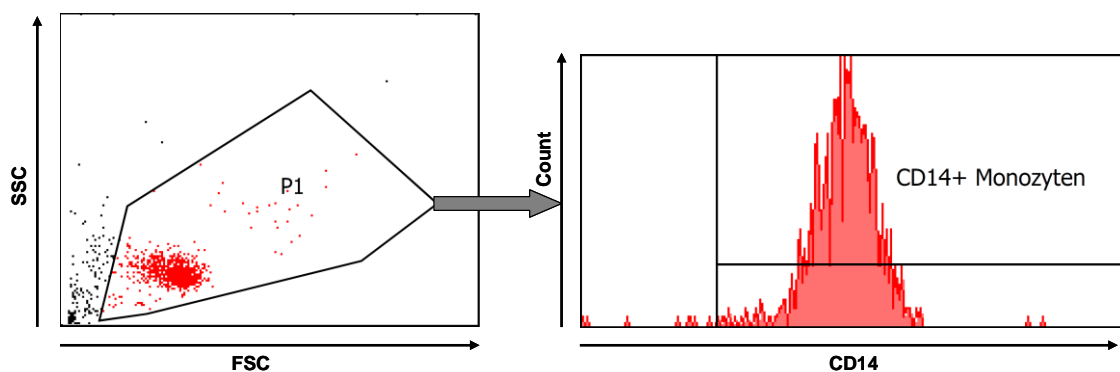


Abbildung 3.1: Messung der Reinheit der isolierten Zellen bezogen auf die Expression des Monozyten-Markers CD14. Im dargestellten Beispiel waren über 95% der Zellen CD14⁺.

Nach der Kultur wurden die unreifen moDCs (Abbildung 3.2), d.h. nicht über die Gabe von IL-4 und GM-CSF hinaus stimulierten Zellen, bezüglich der Expression des Oberflächenmoleküls CD209 untersucht, ein Marker für die erfolgreiche Differenzierung zu DCs.

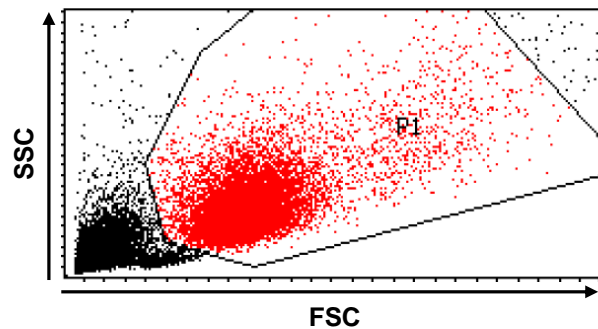


Abbildung 3.2: Bei den in rot angezeigten Zellen handelt es sich um monozytäre DCs (moDCs) nach der Differenzierung mittels IL-4 und GM-CSF aus Monozyten.

Es wurde festgestellt, dass der größte Teil der CD11c+, als moDCs bezeichneten Zellen nach der Kultur mit IL-4 und GM-CSF den Oberflächenmarker CD209 exprimierten, sowohl nach 4 Tagen (70-80%) als auch nach 7 Tagen (95%) Zellkultur (Abbildung 3.3).

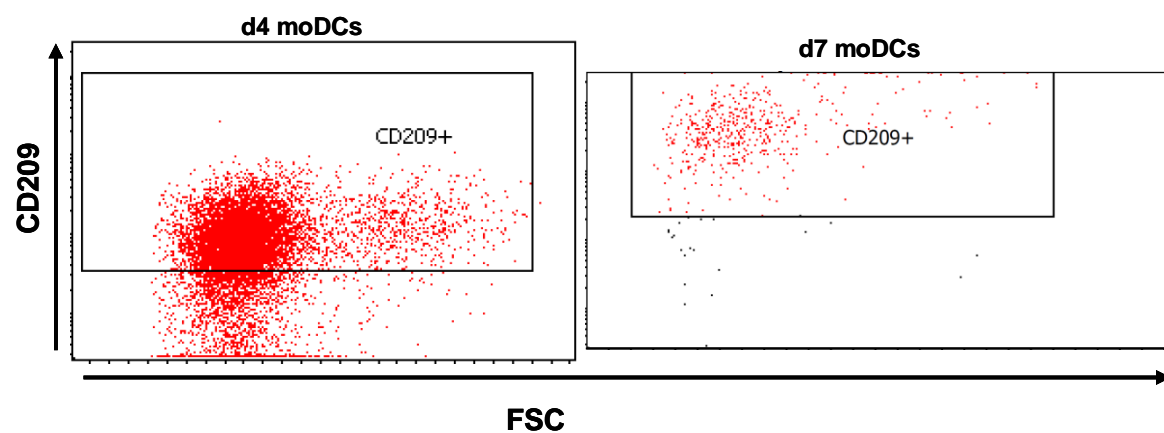


Abbildung 3.3: Die Expression von CD209, einem Marker für die erfolgreiche Differenzierung zu DCs, bei d4 und d7 moDCs. (nach der Zellkultur mit IL-4 und GM-CSF). CD209 wird von der Mehrzahl der Zellen auf der Oberfläche exprimiert.

3.2 Hinweise auf die autokrine Produktion von IL-27 in DCs

3.2.1 IL-27 modifiziert die eigene mRNA-Expression

Mittels Real Time PCR wurde eine relative Quantifizierung der Expression von IL-27p28 mRNA vorgenommen (Abbildung 3.4 A). Dabei wurden d4 moDCs nach 24h Stimulation mit oder ohne IL-27 (50 ng/ml) untersucht. Bereits die basale Expression von IL-27p28 erwies sich im Vergleich zu adulten moDCs bei neonatalen moDCs als erhöht. Nach der Stimulation mit 50 ng/ml IL-27 war die Expression sowohl in neonatalen, als auch in adulten Zellen im Vergleich zur unstimulierten Kontrolle erhöht, wobei die IL-27p28-Expression bei Neugeborenen weiterhin auf einem höheren Level als bei Erwachsenen war.

Des Weiteren wurde die Expression der IL-27-Rezeptoruntereinheit WSX-1 durch d4 moDCs nach 24h Stimulation mit IL-27 (50 ng/ml) oder LPS untersucht (Abbildung 3.4 B). Dabei konnte festgestellt werden, dass WSX-1 von neonatalen moDCs verstärkt exprimiert wurde. Die Stimulation mit IL-27 bewirkte eine leichte Abnahme der WSX-1 mRNA. Die Stimulation mit dem TLR4-Liganden LPS führte hingegen sogar zu einer signifikanten Reduktion der WSX-1 Expression ausschließlich in neonatalen moDCs.

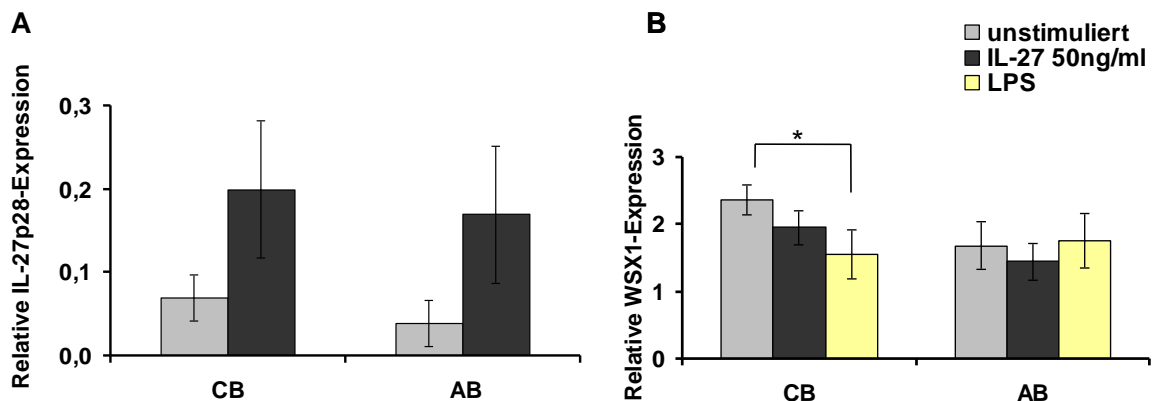


Abbildung 3.4: **A:** Relative Quantifizierung der Expression von IL-27p28-mRNA. IL-27p28 wurde von neonatalen Zellen im unstimulierten Zustand im Vergleich zu adulten Zellen verstärkt exprimiert. Sowohl bei neonatalen, als auch bei adulten Zellen wurde durch die Stimulation mit IL-27 eine Steigerung der IL-27p28 mRNA-Expression induziert. **B:** Relative Quantifizierung der Expression der IL-27-Rezeptor-Untereinheit WSX-1-mRNA. Nach IL-27-Stimulation wurde eine reduzierte Menge an WSX-1-mRNA detektiert. Die Stimulation mit LPS hatte bei neonatalen moDCs eine signifikante Reduktion der WSX-1-Expression zur Folge, während bei adulten Zellen keine Beeinflussung der Expression beobachtet wurde. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n=3-6

3.2.2 IL-27 beeinflusst auch die IL-27-Protein-Produktion

Die moDCs wurden durchflusszytometrisch hinsichtlich der Produktion des IL-27-Proteins analysiert (Abbildung 3.5). CB d4 moDCs, die für 24h stimuliert wurden, zeigten dabei eine signifikant höhere basale Produktion des Zytokins als entsprechende adulte Zellen. Darüber hinaus konnte in neonatalen d4 moDCs bei allen untersuchten Stimulationsbedingungen mehr IL-27 nachgewiesen werden als in adulten Zellen. Insgesamt wurden starke interindividuelle Schwankungen beobachtet. Dennoch wurde ersichtlich, dass 50 ng/ml IL-27 sowie 100 ng/ml IL-27 eine signifikante Steigerung der IL-27-Produktion neonataler Zellen im Vergleich zu unstimulierten Zellen bewirken konnten.

Abbildung 3.5: Durchflusszytometrische Analyse von d4 moDCs. Gezeigt wird jeweils ein repräsentativer neonataler und adulter Proband. Angegeben ist der prozentuale Anteil der IL-27 produzierenden moDCs.

3.2.3 Vergleich der IL-27-Produktion bei unterschiedlicher moDC-Kulturdauer

Die IL-27-Produktionskapazität unter verschiedenen Stimulationsbedingungen wurde sowohl bei d4, als auch bei d7 moDCs analysiert (Abbildung 3.6). Neonatale und adulte d7 moDCs produzierten im unstimulierten Zustand weniger IL-27 als d4 moDCs. Dies gilt auch für die Stimulation mit 50 ng/ml und 100 ng/ml IL-27. Wurde hingegen mit LPS stimuliert, war der Anteil an IL-27 positiven Zellen bei neonatalen und adulten d7 moDCs höher als bei den entsprechenden d4 moDCs.

Bei der kombinatorischen Stimulation mit LPS und IL-27 (50 ng/ml) produzierten neonatale d7 moDCs ebenfalls mehr IL-27 als neonatale d4 moDCs, während adulte moDCs nach der 4 Tage-Kultur mehr IL-27 produzierten als nach der längeren Kulturdauer von 7 Tagen.

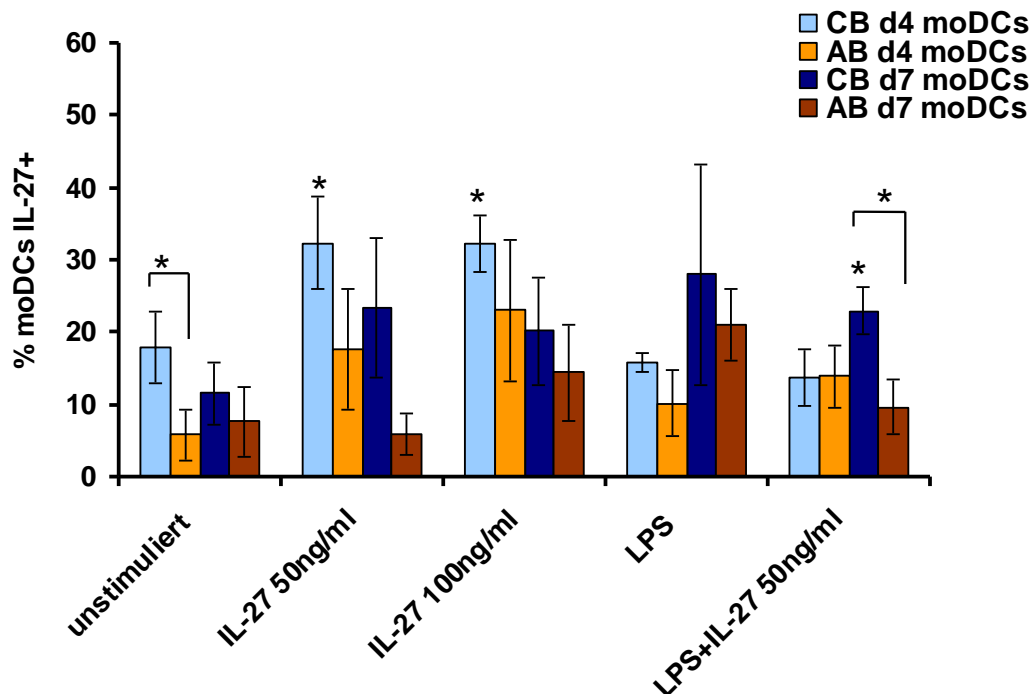


Abbildung 3.6: Vergleich der IL-27-Produktion durch moDCs nach unterschiedlicher Kulturdauer. Das Diagramm zeigt d4 moDCs im Vergleich zu d7 moDCs. Angegeben ist der prozentuale Anteil der IL-27+ moDCs (CD11c+). Bei neonatalen d4 moDCs wurde schon im unstimulierten Zustand signifikant mehr IL-27 produziert als bei adulten moDCs. Die Zugabe von IL-27 (50 oder 100 ng/ml) führte zu einer im Vergleich mit unstimulierten Zellen signifikanten Steigerung bei CB d4 moDCs, aber auch zu einer deutlichen, wenn auch nicht signifikanten Steigerung bei AB d4 moDCs. Während bei adulten Zellen diese Steigerung konzentrationsabhängig war, war dies bei neonatalen moDCs nicht der Fall.

Bei der Stimulation mit IL-27 in Kombination mit LPS konnte bei d4 moDCs kein Unterschied zwischen neonatalen und adulten Zellen festgestellt werden, während neonatale d7 moDCs unter dieser Bedingung signifikant mehr IL-27 produzierten, als adulte d7 moDCs.

Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n= 3-7

3.2.4 Einfluss des STAT-Inhibitors Nifuroxazid auf Faktoren, die IL-27 autokrin induzieren kann

Eine weitere Fragestellung war, in wie weit die von IL-27 induzierten Effekte von STAT1 bzw. STAT3 Signaltransduktion abhängen. Um diesen Zusammenhang zu testen, wurde der STAT1/3-Inhibitor Nifuroxazid in Zellkulturen eingesetzt. Bei neonatalen moDCs kam es durch Nifuroxazid zu einer deutlichen Reduktion der IL-27 Produktion im Vergleich zum unstimulierten Zustand (Abbildung 3.7 A). Verglichen mit der Stimulation mit IL-27 (50 oder 100 ng/ml) waren nach Gabe von Nifuroxazid signifikant weniger moDCs IL-27-positiv. Bei

adulten moDCs war dieser Effekt nicht signifikant. Auch die TNF- α -Produktion wurde, deutlicher bei CB als bei AB moDCs gehemmt (Abbildung 3.7 B). Das Chemokin CXCL10, dessen Produktion durch IL-27 induziert werden konnte, wurde ebenfalls durch den Einsatz des STAT-Inhibitors reduziert (Abbildung 3.7 C). Die Oberflächenexpression des Rezeptors von CXCL10, CXCR3, wurde deutlich bei neonatalen moDCs, jedoch nur leicht bei adulten moDCs durch Nifuroxazid gehemmt (Abbildung 3.7 D).

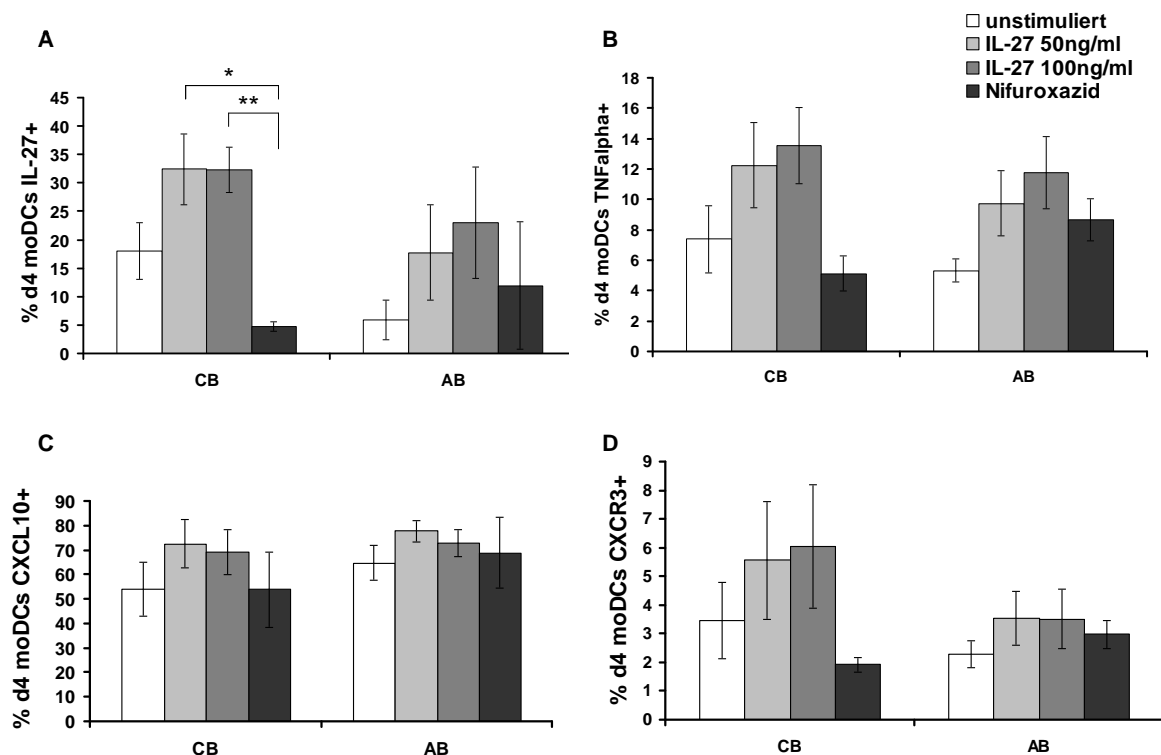


Abbildung 3.7: Einfluss des STAT1/3-Inhibitors Nifuroxazid auf die Produktion von IL-27, TNF- α , CXCL10 und CXCR3 durch neonatale moDCs im Vergleich zu unstimulierten bzw. mit IL-27 (50 oder 100 ng/ml) stimulierten Zellen. Bei adulten moDCs ist die Wirkung von Nifuroxazid weniger stark ausgeprägt als bei neonatalen Zellen. Gezeigt werden die Mittelwerte +/- SEM; n=2-7. * p= <0.05, ** p=<0,005

3.3 Nachweis der Sekretion inflammatorischer Zytokine bei moDCs

3.3.1 IL-27 und die Induktion inflammatorischer Zytokine

Die moDC-Zellkultur-Überstände wurden hinsichtlich sezernierter Zytokine untersucht. Hierbei wurden die Zytokine IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α und IL-12p70 analysiert, die eine Rolle im Inflammationsgeschehen spielen.

Bei neonatalen sowie adulten moDCs führte eine 25-stündige Stimulation mit IL-27 zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der IL-8-Produktion (Abbildung 3.8 A). Neonatale moDCs produzierten nach der Stimulation mit 100 ng/ml IL-27 signifikant mehr IL-8 als im unstimulierten Zustand. Bei adulten moDCs wurde indessen sowohl bei Stimulation mit 50 ng/ml, als auch mit 100 ng/ml nach 24h in etwa gleiche Mengen an IL-8 produziert. Nach einer Stimulationsdauer von 48h zeigte sich bei CB und AB moDCs ein ähnliches Muster wie nach 24h, jedoch kam es nach dieser längeren Inkubationsdauer zu keiner signifikanten Steigerung der durch IL-27 induzierten IL-8-Produktion mehr (Abbildung 3.9 A).

IL-27 führte nach 24h nur zu einer leichten Erhöhung von IL-1 β , jedoch wurde hier weder bei CB, noch bei AB moDCs eine signifikante Änderung der Zytokin-Produktion beobachtet (Abbildung 3.8 B). Nach 48h Stimulation hatte IL-27 keinen Einfluss mehr auf die ohnehin reduzierte Sekretion von IL-1 β (Abbildung 3.9 B).

IL-27 bewirkte bei adulten moDCs nur einen leichten Anstieg der IL-6-Konzentration im Zellkultur-Überstand (Abbildung 3.8 C). Hingegen führte bei neonatalen moDCs die Stimulation mit 100 ng/ml IL-27 zu einer signifikanten Zunahme der IL-6-Sekretion. Nach 48h zeigte sich sowohl bei mit 50 ng/ml, als auch bei mit 100 ng/ml IL-27-stimulierten moDCs eine deutlich gesteigerte Sekretion von IL-6 im Vergleich zu unstimulierten Zellen, (Abbildung 3.9 C). Bei adulten moDCs bewirkten 100 ng/ml einen Anstieg der IL-6-Konzentration.

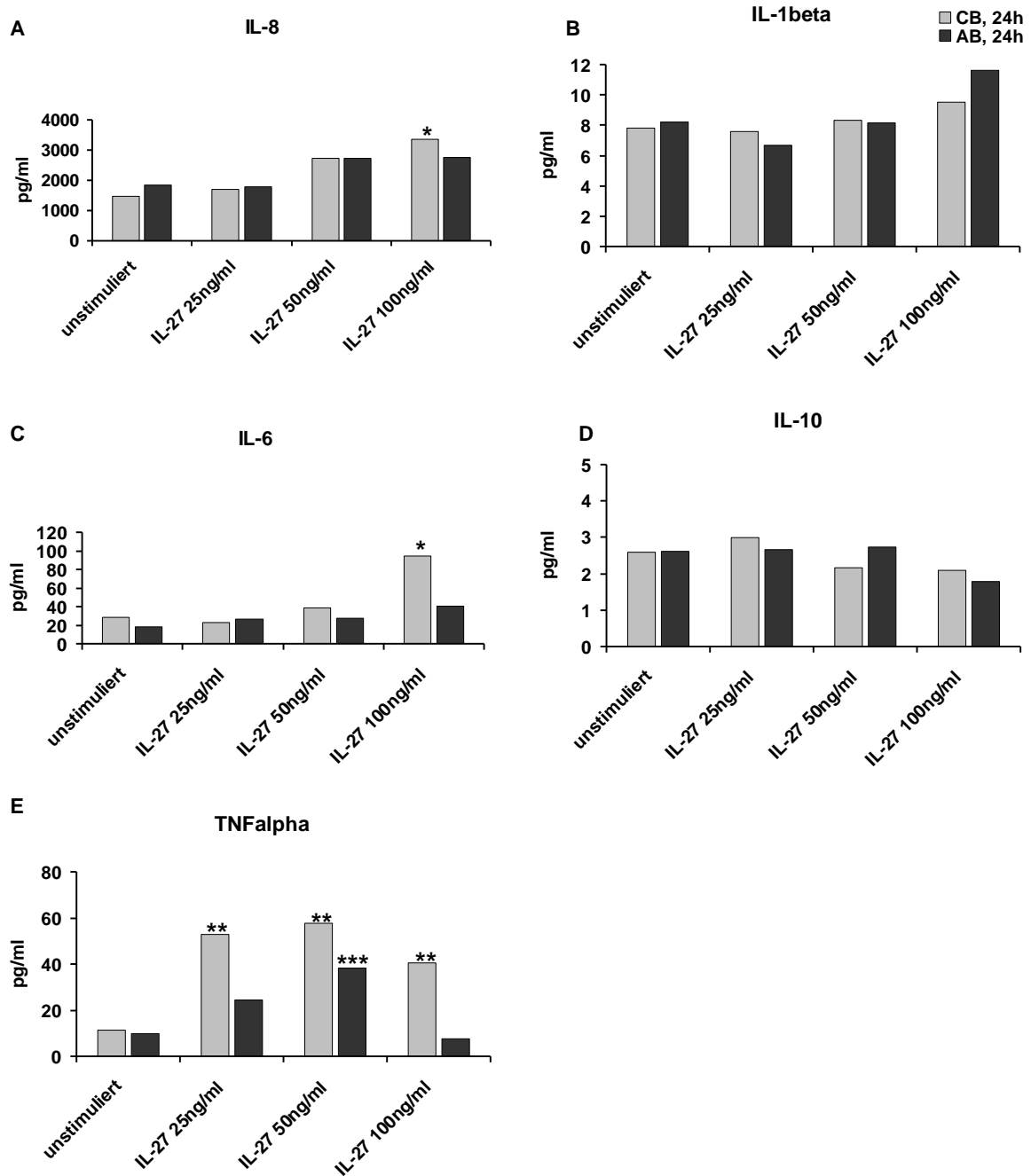


Abbildung 3.8: Nachweis sezerner inflammatorischer Zytokine in Zellkulturüberständen von neonatalen und adulten moDCs nach 24h Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-27. Dargestellt sind Mediane (STABW siehe Anhang). n=3-22. * $p < 0.05$, ** $p < 0,005$, *** $p < 0,001$

IL-10, ein als anti-inflammatorisch geltendes Zytokin, wurde bei CB- und AB- moDCs nur in sehr geringem Maße durch IL-27 beeinflusst. Bei neonatalen Zellen zeigte sich ab einer Konzentration von 50 ng/ml IL-27 nach 24h Stimulation eine leichte Reduktion der IL-10-Sekretion (Abbildung 3.8 D). Bei adulten moDCs konnte dieser tendenzielle Effekt erst bei

100 ng/ml IL-27 beobachtet werden. Nach 48 h hatte IL-27 jedoch keinen Effekt mehr auf die Produktion von IL-10 (Abbildung 3.9 D).

TNF- α wurde von neonatalen moDCs durch den Einfluss von IL-27 signifikant erhöht, wobei der Effekt bei den niedrigeren Konzentrationen (25 ng und 50 ng/ml) am deutlichsten war (Abbildung 3.8 E). Bei adulten moDCs stieg ebenfalls die Menge an sezerniertem TNF- α , jedoch nur bei 50 ng/ml IL-27 signifikant. Bei 100 ng/ml IL-27 fiel bei adulten moDCs die TNF- α -Konzentration im Überstand wieder ab, vergleichbar mit der im unstimulierten Zustand sezernierten Menge des Zytokins. Nach 48h Stimulation wurde von neonatalen und adulten moDCs insgesamt deutlich weniger an TNF- α produziert als nach 24h (Abbildung 3.9 E). Interessanterweise lag hier bei adulten Zellen eine signifikante Erhöhung des Zytokins verglichen mit unstimulierten Zellen bei 100 ng/ml eingesetztem IL-27 vor. Neonatale Zellen zeigten zwar ebenfalls einen deutlichen Anstieg der Sekretion, dieser war jedoch aufgrund der schwankenden TNF α -Konzentrationen zwischen den Probanden nicht als signifikant zu bewerten.

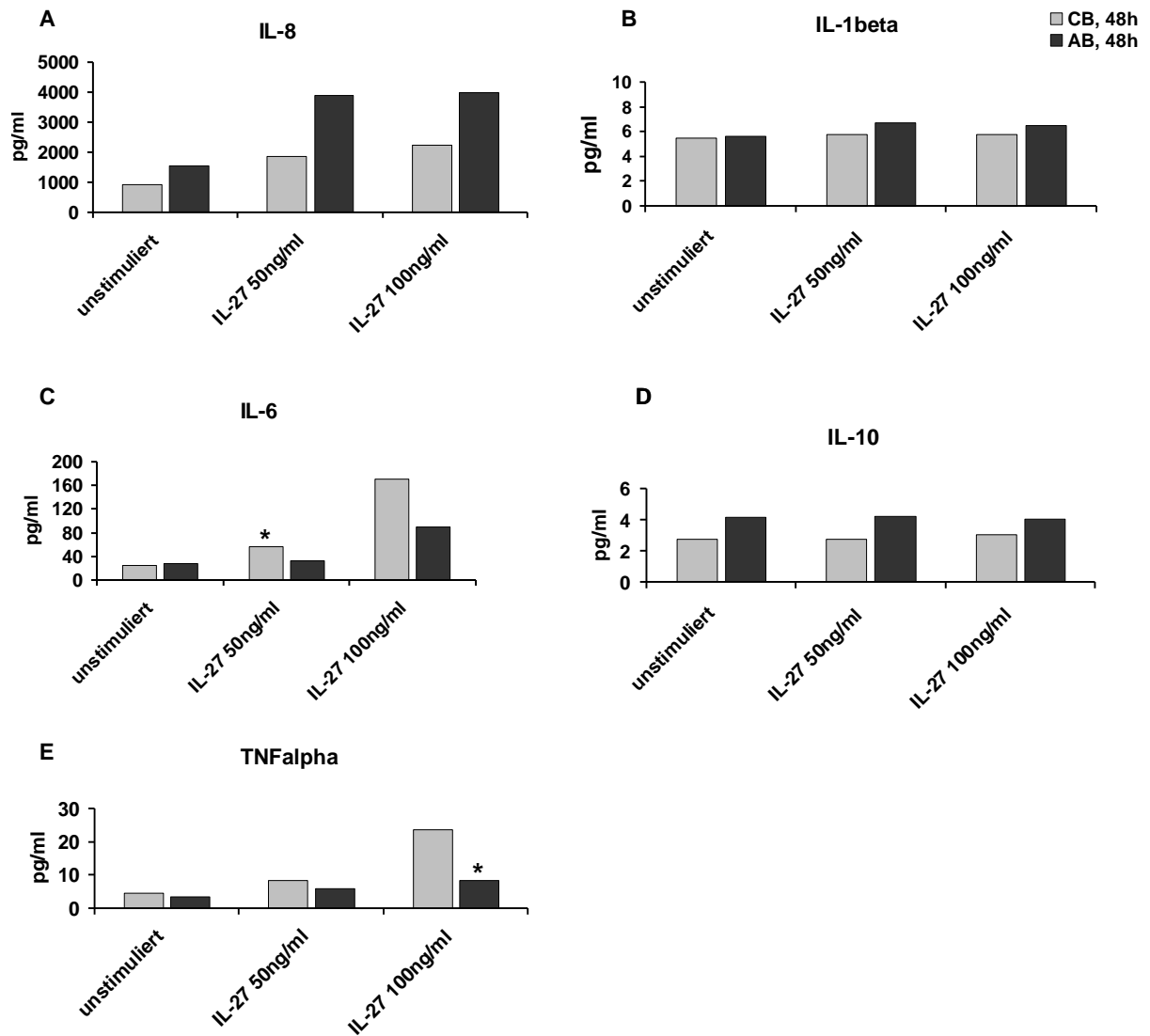


Abbildung 3.9: Sezernierte inflammatorische Zytokine in Zellkulturüberständen von neonatalen und adulten moDCs nach 48h Stimulation mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-27. Dargestellt sind Mediane (STABW siehe Anhang). n=2-8. * p < 0.05

Die durchflusszytometrische Analyse ergab sowohl in neonatalen, als auch in adulten Zellen bei beiden getesteten IL-27-Konzentrationen (50 und 100 ng/ml) eine deutliche Erhöhung von TNF- α . (Abbildung 3.10). Dies deckt sich nur zum Teil mit den Ergebnissen aus der Analyse der sezernierten Proteine.

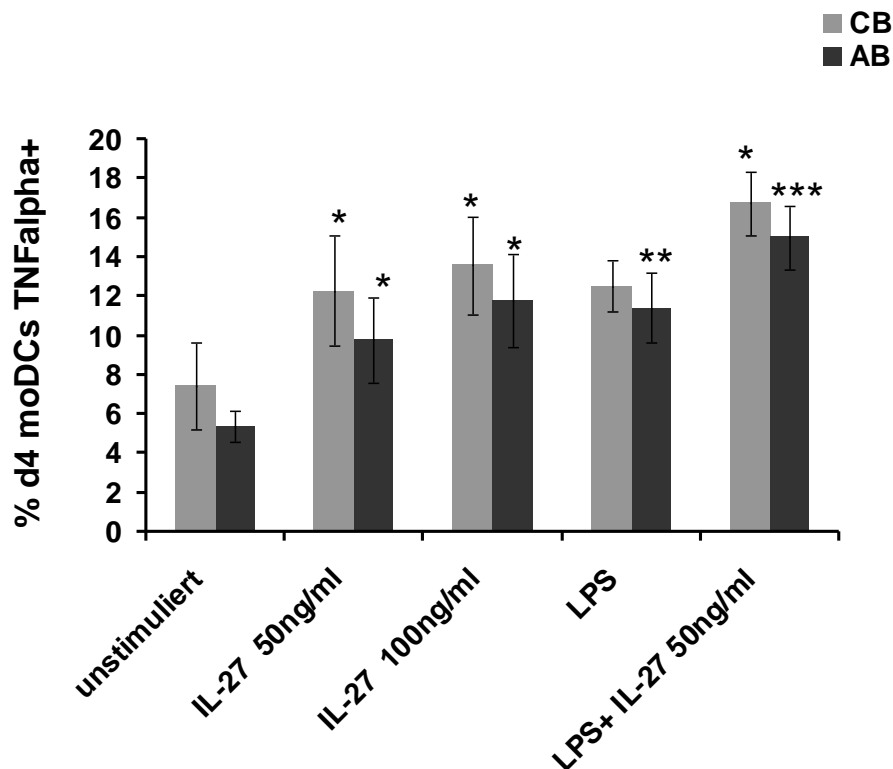


Abbildung 3.10: Anteil TNF- α positiver Zellen (Nachweis des intrazellulären Zytokins) an moDCs. Die Zellen wurden je 24h mit dem jeweiligen Stimulans inkubiert. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n=3-7. * p= <0.05, **p=<0,005, ***p=<0,001

Der Vollständigkeit erwähnt werden sollte, dass das Th1-Zytokin IL-12p70 im unstimulierten Zustand nicht nachgewiesen, und darüber hinaus auch nicht durch IL-27 induziert werden konnte.

3.3.2 Einfluss von IL-27 auf die Induktion inflammatorischer Zytokine durch LPS und IFN γ

IL-8 wurde nach 24h bei neonatalen und adulten moDCs als Antwort auf LPS signifikant erhöht (Abbildung 3.11 A). Wurde gleichzeitig IL-27 zugegeben, hatte dies keinen Einfluss auf die Menge an sezerniertem IL-8. Bei neonatalen moDCs, die mit IFN γ stimuliert wurden, wurde verglichen mit unstimulierten Zellen eine signifikante Erhöhung der IL-8-Produktion festgestellt. Bei gleichzeitiger Stimulation der Zellen mit IFN γ und IL-27 lag jedoch keine signifikante Steigerung der Zytokin-Menge verglichen mit unstimulierten Zellen vor.

IL-1 β wurde nach 24h bei neonatalen und adulten moDCs durch LPS vermehrt sezerniert (Abbildung 3.11 B). Wurde bei neonatalen Zellen zusätzlich mit IL-27 stimuliert, war die

Menge an sezerniertem IL-1 β jedoch nicht erhöht im Vergleich zu der ausschließlichen Gabe von LPS. Hingegen kam es bei adulten moDCs durch die Kombination von LPS und IL-27 zu einer signifikanten Erhöhung der IL-1 β -Sekretion im Vergleich zum unstimulierten Zustand.

Die Stimulation mit IFN γ führte nach 24h bei neonatalen Zellen zu einem signifikanten Anstieg der IL-1 β -Konzentration im Zellkultur-Überstand. Bei adulten Zellen wurde das Zytokin ebenfalls vermehrt sezerniert, jedoch nicht signifikant verglichen mit unstimulierten Zellen. Sowohl bei neonatalen, als auch bei adulten moDCs bewirkte die kombinatorische Stimulation mit IFN γ und IL-27 eine Abnahme der Sekretionsmenge von IL-1 β . Jedoch konnte dies aufgrund der geringen Probenanzahl der letztgenannten Stimulationsbedingung nicht statistisch abgesichert werden.

Die IL-6-Sekretion wurde bei neonatalen und adulten Probanden zum einen nach 24h Stimulation nur mit LPS, zum anderen mit LPS und IL-27 zusammen signifikant erhöht (Abbildung 3.11 C). IFN γ hingegen hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die IL-6-Ausschüttung der moDCs aus Nabelschnurblut oder aus adultem Blut.

Das regulatorische Zytokin IL-10 wurde bei neonatalen und adulten Zellen nach 24h durch LPS und durch die Kombination aus LPS und IL-27 verglichen zum Ausgangsniveau signifikant erhöht (Abbildung 3.11 D). IFN γ bewirkte sowohl bei neonatalen, als auch bei adulten moDCs nur eine sehr leichte Reduktion von IL-10, wobei die zusätzliche Anwesenheit von IL-27 keine Auswirkung darauf hatte.

LPS mit und ohne IL-27 führte nach 24h zu einer signifikanten Steigerung der Sekretion von TNF- α bei neonatalen und adulten moDCs (Abbildung 3.11 E). Wurde hingegen mit IFN γ stimuliert, hatte nur die gemeinsame Stimulation mit IL-27 einen signifikanten Anstieg an sezerniertem TNF- α verglichen mit unstimulierten Zellen zur Folge (Abbildung 3.11 F). Verglichen mit der ausschließlichen IFN γ -Stimulation, induzierte die kombinatorische Stimulation mit IFN γ und IL-27 eine deutliche Zunahme von TNF- α bei neonatalen Zellen und bei adulten Zellen.

LPS führte nach 24h zu einer signifikanten Erhöhung der IL-12p70-Ausschüttung bei neonatalen und adulten moDCs. Die zusätzliche Stimulation mit IL-27 bewirkte bei CB und AB moDCs wiederum eine signifikante Steigerung der IL-12p70-Sekretion verglichen mit der alleinigen LPS-Stimulation (Abbildung 3.11 G).

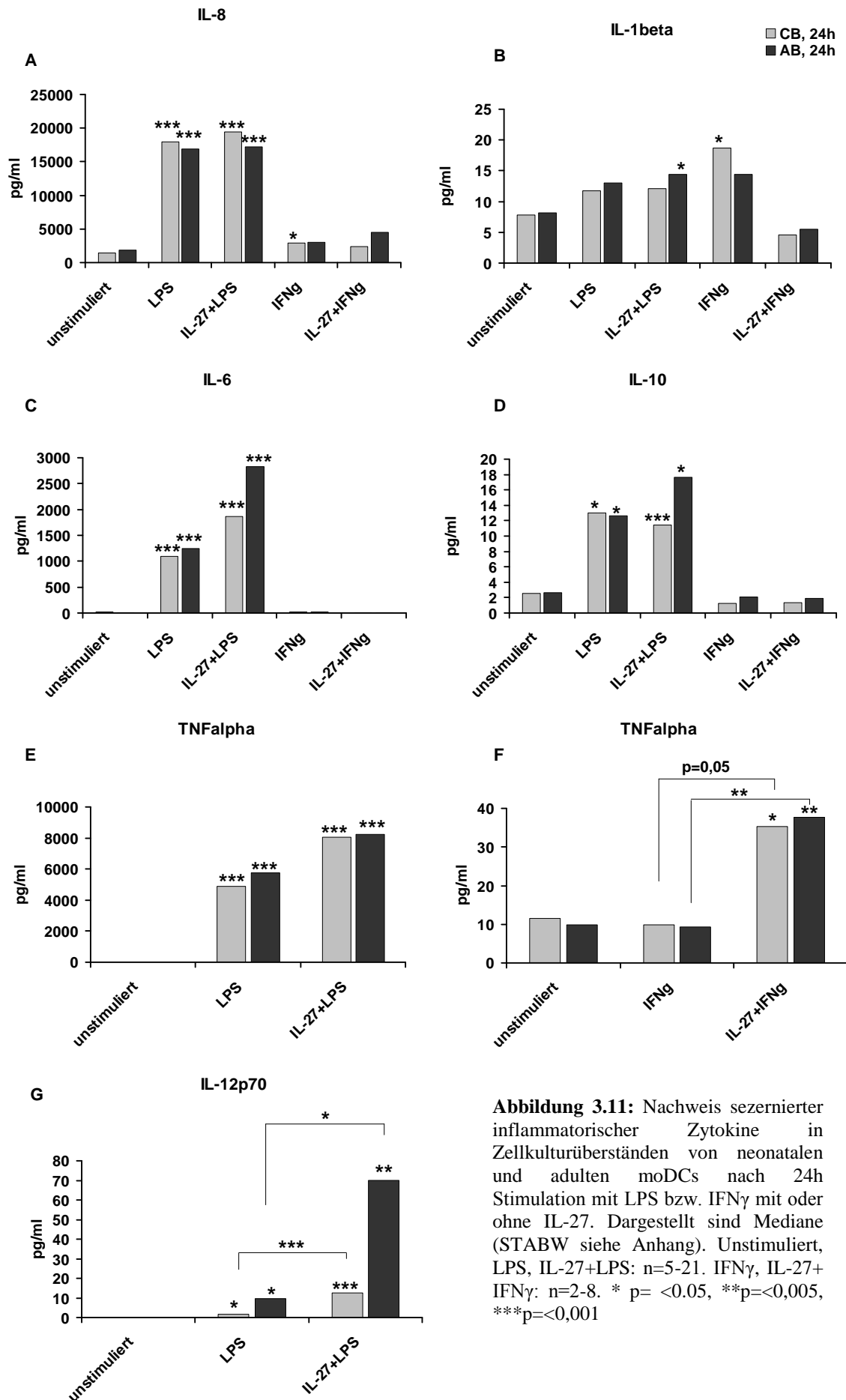


Abbildung 3.11: Nachweis sezernierter inflammatorischer Zytokine in Zellkulturüberständen von neonatalen und adulten moDCs nach 24h Stimulation mit LPS bzw. IFN γ mit oder ohne IL-27. Dargestellt sind Mediane (STABW siehe Anhang). Unstimuliert, LPS, IL-27+LPS: n=5-21. IFN γ , IL-27+IFN γ : n=2-8. * p= <0,05, **p=<0,005, ***p=<0,001

Nach 48h wurde die IL-8-Sekretion sowohl bei CB, als auch bei AB moDCs durch LPS und die Kombination aus LPS und IL-27 induziert. Bei adulten Zellen wurde IL-8 auch durch IFN γ in Kombination mit IL-27 erhöht, wobei dies statistisch aufgrund der geringen Probenzahl nicht abgesichert werden konnte (Abbildung 3.12 A).

Die Sekretion von IL-1 β wurde nach 48h ebenfalls bei neonatalen und adulten moDCs durch LPS induziert (Abbildung 3.12 B). Während die zusätzlich Gabe von IL-27 bei neonatalen Zellen zu einer Reduktion von IL-1 β führte, lag bei adulten Zellen im Gegensatz dazu eine Erhöhung der Sekretion vor, wobei diese Aussage auf nur einem Probanden beruht und daher als vorläufig zu bewerten ist. Ebenso beruhen die nach IFN γ gemessenen Sekretions-Werte auf Einzelmessungen und werden hier zwar beschrieben, aber sind nicht als gesichert anzusehen. 48h Stimulation mit IFN γ führte zu einer gesteigerten Sekretion von neonatalem IL-1 β , während bei adulten Zellen eine Reduktion der Sekretion beobachtet wurde. In Kombination mit IL-27 führte IFN γ bei neonatalen Zellen zu einer Abnahme von IL-1 β , während bei adulten Zellen im Vergleich zu IFN γ alleine eher eine größere Menge des Zytokins ausgeschüttet wurde.

IL-6 wurde nach 48h, genau wie nach 24h, durch LPS sowie durch LPS in Kombination mit IL-27 bei neonatalen und bei adulten Zellen induziert (Abbildung 3.12 C). Wiederum ist bei adulten Zellen der gemessene Wert von LPS+IL-27 ein Einzelwert und aufgrund dessen nicht statistisch abgesichert. IFN γ hatte hingegen auch nach 48h keinen nennenswerten Einfluss auf die IL-6-Sekretion von CB und AB moDCs (Abbildung 3.12 C).

Die Sekretion von IL-10 (Abbildung 3.12 D) wurde bei neonatalen und adulten Zellen nach 48h durch LPS und durch die Kombination aus LPS und IL-27 verglichen mit unstimulierten Zellen, induziert.

IFN γ zeigte keinen deutlichen Einfluss auf die Produktion von IL-10, weder allein noch zusammen mit IL-27.

TNF- α (Abbildung 3.12 E) wurde nach 48h bei CB und AB moDCs durch LPS und durch LPS+IL-27 erhöht, wobei die Konzentrationen des Zytokins insgesamt im Vergleich zu den 24h-Werten abgenommen hatten.

IFN γ hatte keinen nennenswerten Einfluss auf die TNF- α -Konzentration in den Zellkulturüberständen nach 48h Stimulation.

LPS führte nach 48h sowohl mit, als auch ohne IL-27 zu einer Erhöhung der IL-12p70-Ausschüttung bei adulten moDCs (Abbildung 3.12 F). Bei CB moDCs bewirkte hingegen nach 48h nur die kombinatorische Stimulation eine signifikante Steigerung der IL-12p70-Sekretion verglichen mit dem unstimulierten Zustand.

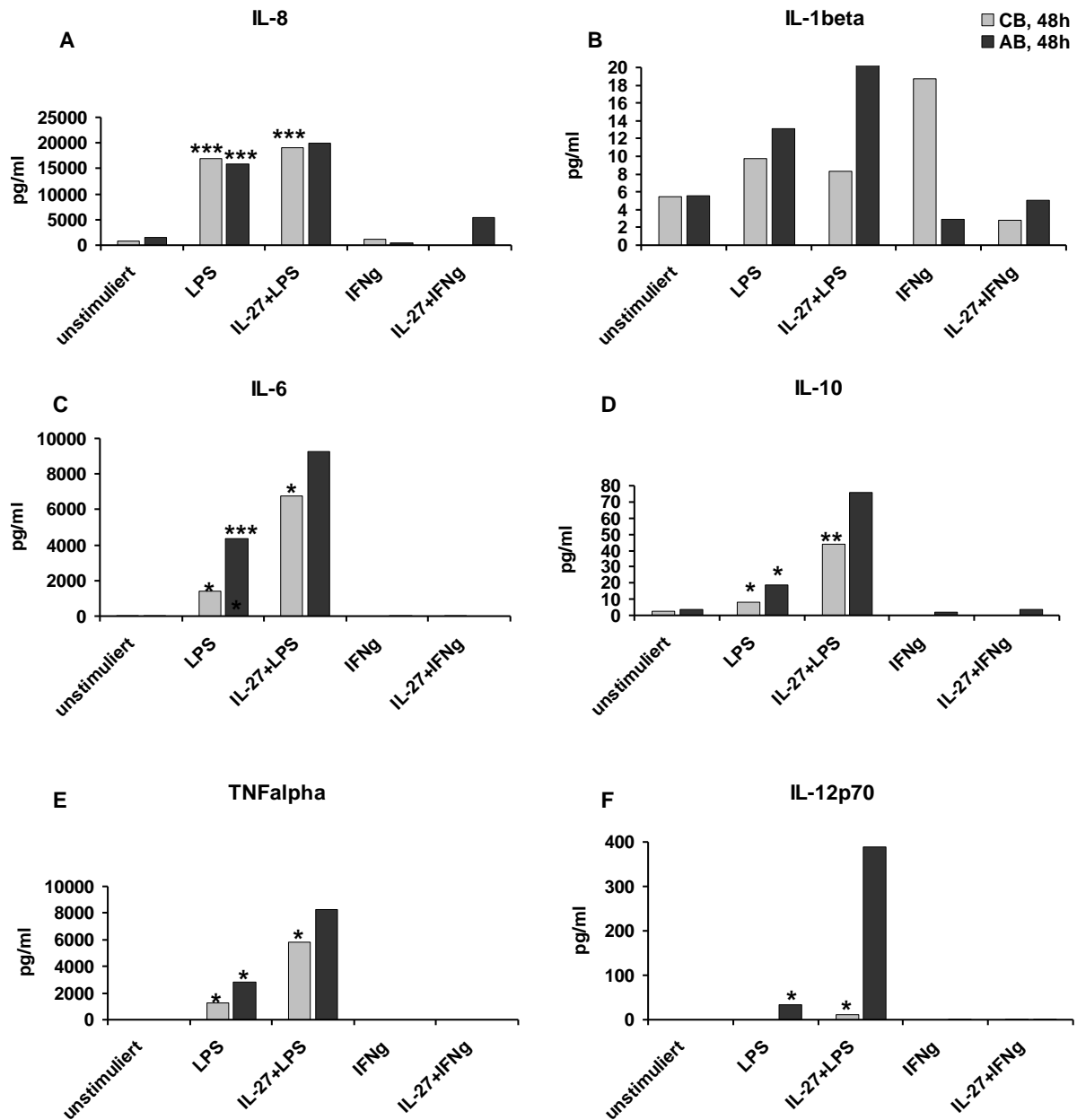


Abbildung 3.12: Nachweis sezernierter inflammatorischer Zytokine in Zellkulturüberständen von neonatalen und adulten moDCs nach 48h Stimulation mit LPS bzw. IFN γ mit oder ohne IL-27. Dargestellt sind Mediane (STABW siehe Anhang). n=3-8 für unstimuliert und LPS. n=1-6 für IL-27+LPS, IFN γ und IL-27+IFN γ , außer bei IL-10: keine Werte für IFN γ und IL-27+IFN γ (AB: n=1). * p= <0.05, **p=<0,005, ***p=<0,001

3.3.3 Induktion inflammatorischer Zytokine durch IL-27 in Kombination mit IL-21

Durch Stimulation mit IL-21 für 24h kam es bei adulten moDCs zu einem leichten Anstieg der Menge an sezerniertem IL-8 (Abbildung 3.13 A). Die gleichzeitige Gabe von IL-21 und IL-27 ließ die Konzentration von IL-8 im Zellkulturüberstand von adulten Zellen noch weiter ansteigen. Bei CB moDC hingegen hatte IL-21 alleine keinen Effekt. IL-21 reduzierte bei der gemeinsamen Gabe mit IL-27 die durch IL-27 induzierte IL-8-Sekretion.

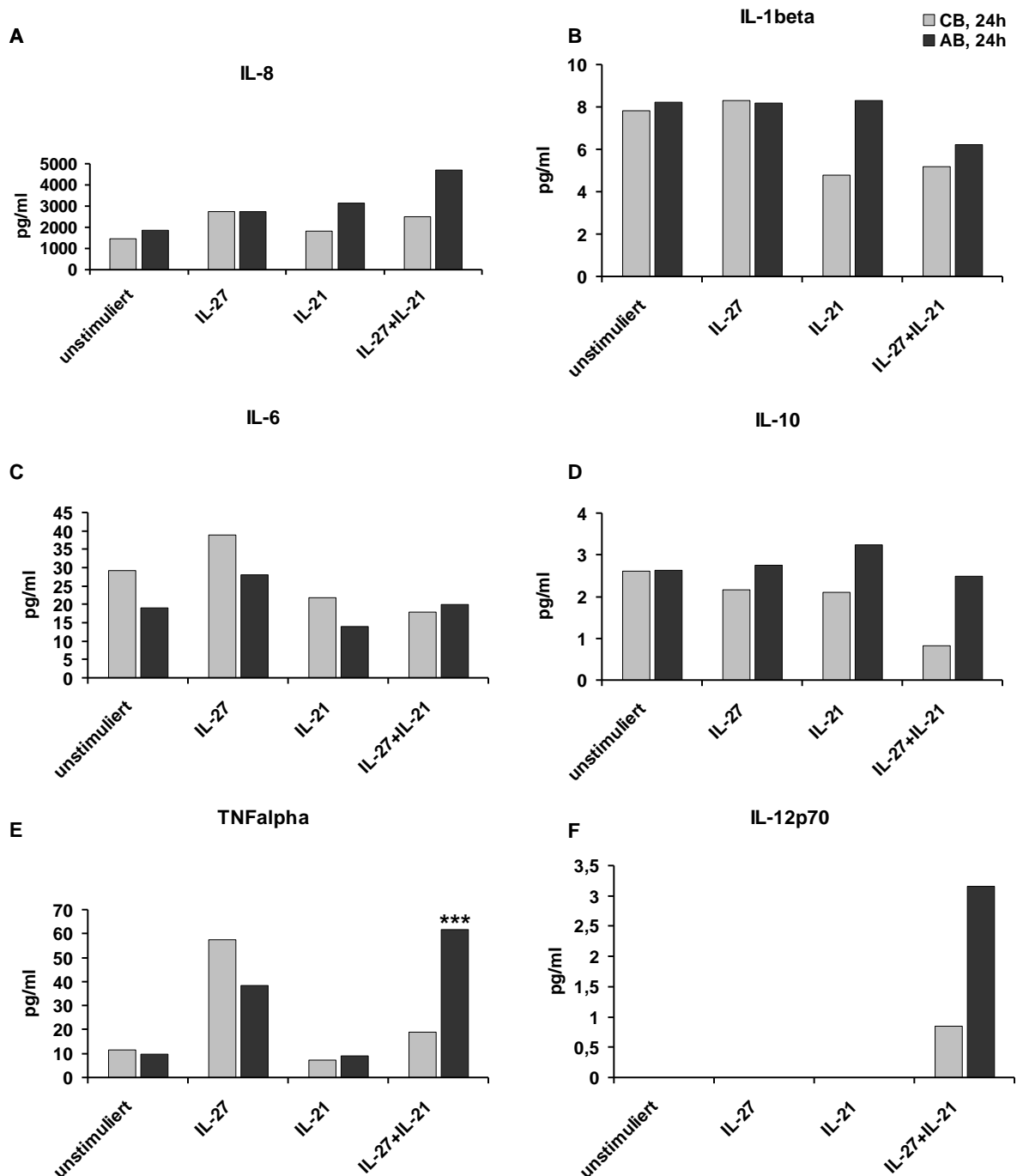


Abbildung 3.13: Nachweis sezernierter inflammatorischer Zytokine in Zellkulturüberständen von neonatalen und adulten moDCs nach 24h Stimulation mit IL-21 mit oder ohne IL-27. Dargestellt sind Mediane (STABW siehe Anhang). n=2-22. ***p<0,001

Nach 48h konnte im unstimulierten Zustand etwa die gleiche Konzentration an IL-8 im Zellkulturüberstand nachgewiesen werden, wie nach 24h (Abbildung 3.14 A). IL-21 hatte nach 48h keinen Effekt auf IL-8, während IL-21 zusammen mit IL-27 ebenso wie nach 24h die IL-8-Sekretion förderte.

IL-21 bewirkte nach 24h bei neonatalen moDCs eine leichte Abnahme von IL-1 β , während adulte Zellen hinsichtlich des Zytokins keine Reaktion zeigten (Abbildung 3.13 B). Wurde zeitgleich mit IL-21 und IL-27 stimuliert, wurde bei neonatalen Zellen ein mit der Einzelstimulation vergleichbarer Effekt induziert. Bei adulten Zellen wurde unter diesen Umständen ebenfalls die Ausschüttung von IL-1 β leicht gehemmt. Die 48-stündige Stimulation mit IL-21 hatte keinen Einfluss auf die IL-1 β -Sekretion, während die Stimulation mit der Kombination aus IL-21 und IL-27 bei neonatalen Zellen weiterhin eine leichte Abnahme des Zytokins bezogen auf unstimulierte Zellen verursachte (Abbildung 3.14 B). Bei adulten Zellen konnte die kombinatorische Stimulation nach 48h keinen hemmenden Effekt wie nach 24h bewirken.

IL-6 wurde nach 24h bei neonatalen moDCs durch IL-21 alleine, und noch stärker durch IL-21+IL-27 reduziert (Abbildung 3.13 C). Bei adulten Zellen zeigte sich nur durch IL-21 alleine ein leichter Rückgang der Sekretion, während IL-27 den Einfluss von IL-21 aufzuheben schien.

Nach 48h (Abbildung 3.14 C) stieg die IL-6-Ausschüttung bei neonatalen DCs durch den Einfluss von IL-21 leicht an, während gleichzeitige Stimulation mit IL-21 und IL-27 diesen Effekt nicht hervorriefen. Bei adulten Zellen bewirkte IL-21 übereinstimmend mit der 24-stündigen Stimulation eine leicht reduzierte Sekretion von IL-6, wobei hier durch IL-21+IL-27 eine vergleichbare Reduktion erzielt wurde.

Die Ausschüttung von IL-10 wurde bei Neonaten durch 24h Stimulation mit IL-21 leicht, durch IL-21 zusammen mit IL-27 stärker reduziert (Abbildung 3.13 D). Bei Adulten jedoch zeigte sich nach der Stimulation mit IL-21 ein leichter Anstieg von IL-10, während auch hier IL-27 den Effekt von IL-21 wieder aufzuheben schien.

48h Stimulation mit IL-21 bewirkte bei CB moDCs einen leichten Anstieg und bei AB moDCs tendenziell einen Rückgang der IL-10-Ausschüttung (Abbildung 3.14 D). Diese Effekte stehen im Gegensatz zu den nach 24h gemachten Beobachtungen. Jedoch konnte, wie auch nach 24h, bei neonatalen Zellen eine durch die gemeinsame Gabe von IL-21 und IL-27 induzierte Reduktion von IL-10 gemessen werden. Diese war nach 48h als statistisch signifikant zu bewerten. Bei adulten moDCs wurde durch die Kombination der beiden Zytokine nach 48h eine Zunahme von IL-10 induziert, was wiederum im Gegensatz zu den Ergebnissen nach 24-stündiger Stimulation stand.

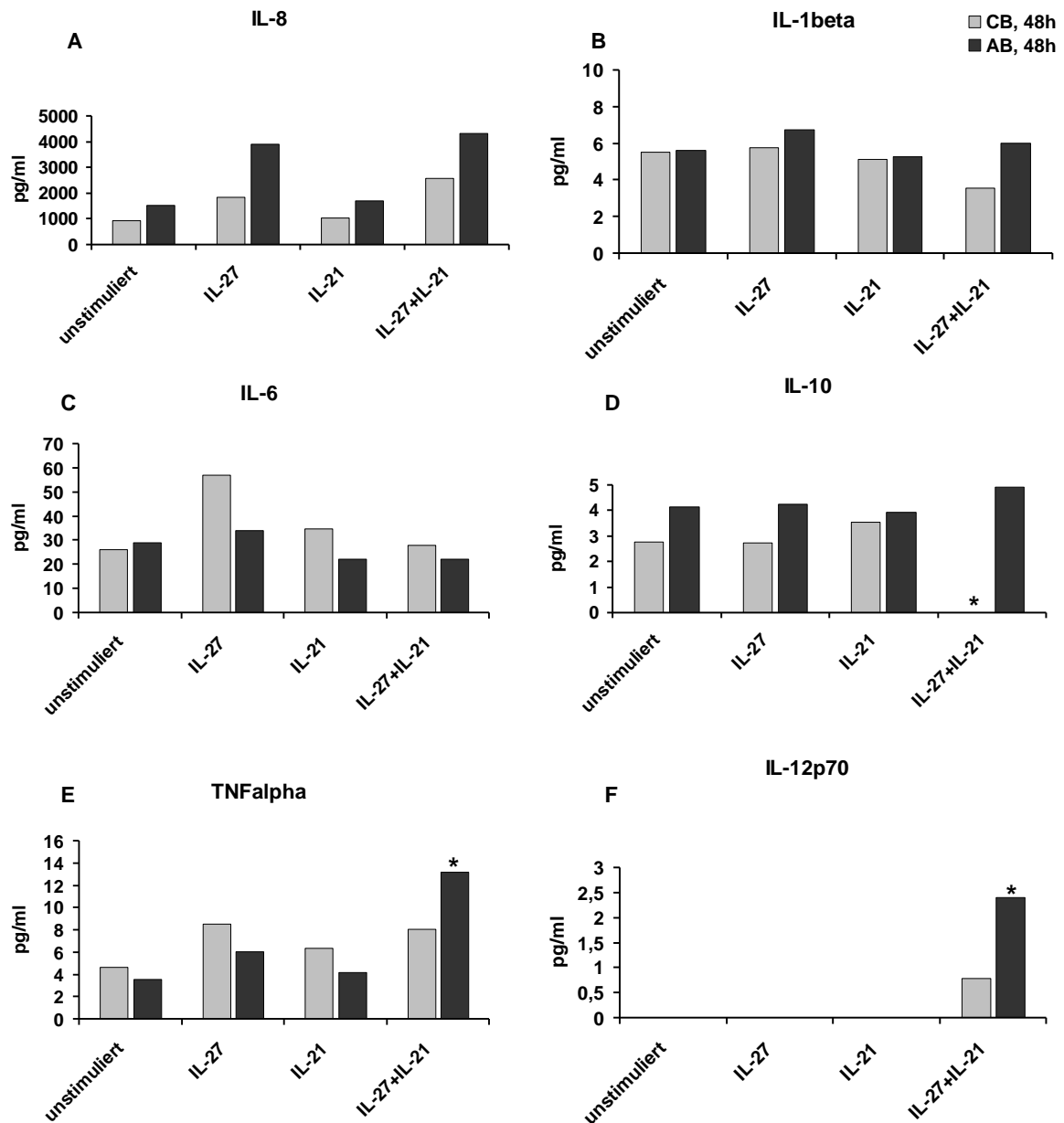


Abbildung 3.14: Sezernierte inflammatorische Zytokine in Zellkulturüberständen von neonatalen und adulten moDCs nach 24h Stimulation mit IL-21 mit oder ohne IL-27. Gezeigt werden Mediane (STABW siehe Anhang). n=5-8 für unstimuliert, IL-27 und IL-21. n=2 für IL-27+IL-21; * $p = < 0.05$

IL-21 allein zeigte nach 24h keinen nennenswerten Einfluss auf die Sekretion von TNF- α (Abbildung 3.13 E). Bei gleichzeitiger Stimulation mit IL-21 und IL-27 wurde TNF- α bei CB moDCs leicht erhöht. Eine signifikante Steigerung der TNF- α -Produktion fand unter dieser Bedingung bei adulten moDCs statt.

Nach 48h zeigte sich insgesamt ein niedrigeres Niveau von TNF- α (Abbildung 3.14 E). Durch IL-21 wurde bei neonatalen und adulten Zellen TNF- α kaum merklich erhöht. Ausgeprägter war der positive Einfluss auf TNF- α , wenn mit IL-21 und IL-27 zusammen für 48h stimuliert

wurde, was in etwa auch der Wirkung nach 24h entsprach. Ein signifikanter Anstieg lag nur bei adulten moDCs signifikant verglichen mit unstimulierten Kontrollzellen vor.

IL-12p70 wurde nach 24h ebenso wie nach 48h im unstimulierten Zustand wie auch nach IL-21-Stimulation nicht sezerniert (Abbildung 3.13 F; Abbildung 3.14 F). Durch 24h Stimulation mit IL-21 zusammen mit IL-27 konnte bei CB und AB moDCs eine sehr geringe Steigerung der Produktion induziert werden. Nach 48h Inkubation mit IL-21 in Kombination mit IL-27 war ein Anstieg der IL-12p70-Sekretion bei neonatalen und bei adulten Zellen zu beobachten.

3.4 Einfluss von IL-27 auf kostimulatorische Moleküle und Reifungsmarker

Mittels Durchflusszytometrie wurde der Einfluss von IL-27 auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle und Reifungsmarker CD80, CD86 und CD40 untersucht. Bei diesen handelt es sich um von DCs exprimierte Oberflächenmoleküle, die im Zusammenhang mit Antigenaufnahme, -Präsentation und schließlich mit der Aktivierung von T-Zellen stehen (Chen et al., 1994; June et al., 1994; Peach et al., 1995; Cella et al., 1996). Die Expression von CD80 wurde durch IL-27 fast nicht beeinflusst (Abbildung 3.15 A). IL-27 bewirkte jedoch eine leichte Steigerung der Oberflächenexpression von CD86 (Abbildung 3.15 B). Obwohl der beobachtete Effekt etwas deutlicher in Zellen aus Nabelschnurblut zu sein schien, konnte hier aufgrund der starken interindividuellen Schwankungen kein signifikanter Unterschied festgestellt werden. Die Oberflächenexpression von CD40 nahm hingegen in neonatalen und adulten Zellen signifikant unter dem Einfluss von IL-27 zu (Abbildung 3.15 C). Insgesamt hatte IL-27 also einen positiven Einfluss auf kostimulatorische Moleküle, sowohl auf CB, als auch auf AB DCs.

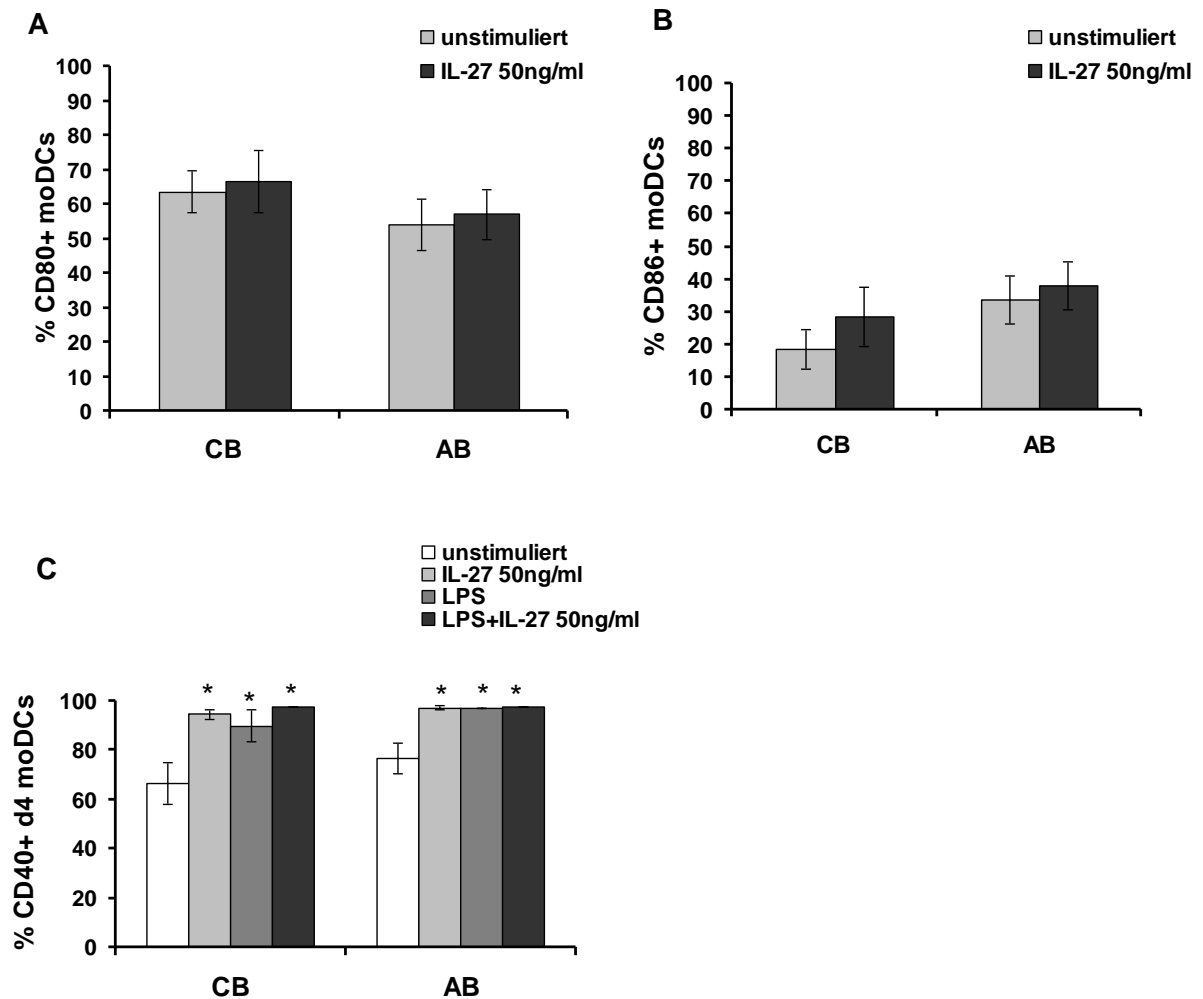


Abbildung 3.15: **A:** Wirkung von IL-27 auf die Oberflächenexpression des kostimulatorischen Moleküls CD80 im Vergleich zwischen neonatalen und adulten moDCs. Gezeigt werden Mittelwerte mit SEM. n=12-18 **B:** Wirkung von IL-27 auf die Oberflächenexpression des kostimulatorischen Moleküls CD86 bei neonatalen und adulten moDCs. Gezeigt werden Mittelwerte mit SEM. n=12-18. **C:** Wirkung von IL-27 auf die Oberflächenexpression des kostimulatorischen Moleküls CD40 bei neonatalen und adulten moDCs. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM; n=2-4; * p= <0.05

3.5 Einfluss von IL-27 auf die Antigenpräsentations-Kapazität

Um mehrere Gene zeitgleich bezüglich ihrer Expression zu untersuchen, wurden PCR Array Analysen durchgeführt. Der hierzu verwendete Array ermöglichte den quantitativen Nachweis der mRNA von Genen, die an der Antigenpräsentation dendritischer Zellen beteiligt sind.

IL-27 bewirkte in neonatalen Zellen eine Steigerung der Expression von HLA-A, das für die MHC I assoziierte α -Kette kodiert (Marsh et al., 2005) sowie der Expression von HLA-DOA und -DMA, die beide an der Peptidbeladung von MHCII-Molekülen beteiligt sind (Kropshofer et al., 1998; Kropshofer et al., 1999; Busch et al., 2005) (Abbildung 3.16).

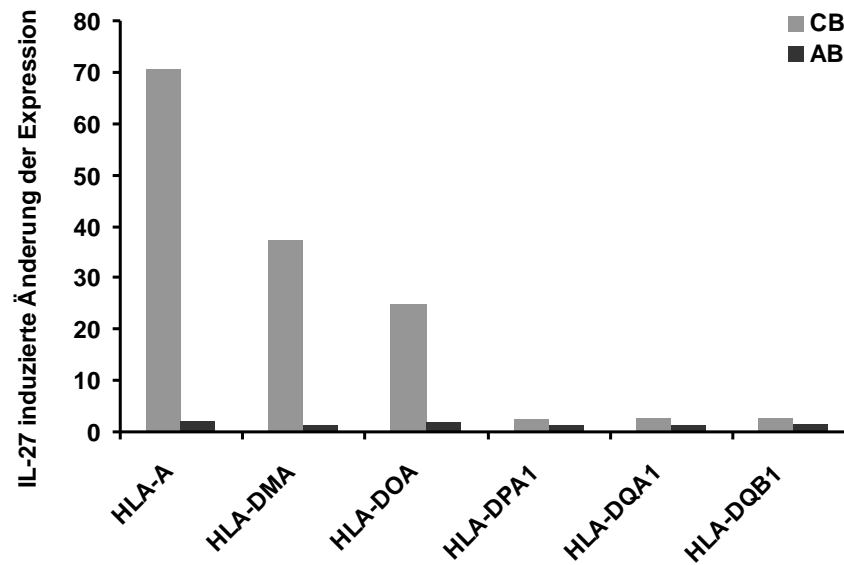


Abbildung 3.16: Einfluss von IL-27 auf die Expression von verschiedenen HLA-Genen. Gezeigt werden *fold changes*, d.h. um das Wievielfache die Expression des entsprechenden Gens nach IL-27-Stimulation verglichen mit dem unstimulierten Zustand verändert war. n=3

Im Gegensatz zu dem Effekt von IL-27 auf die Expression von HLA-A, HLA-DOA und HLA-DMA konnte kein Einfluss des Zytokins auf die Oberflächenexpression von HLA-DR (bei d7 moDCs, Abbildung 3.17 A) und HLA-ABC (bei d4 moDCs, Abbildung 3.17 B) festgestellt werden.

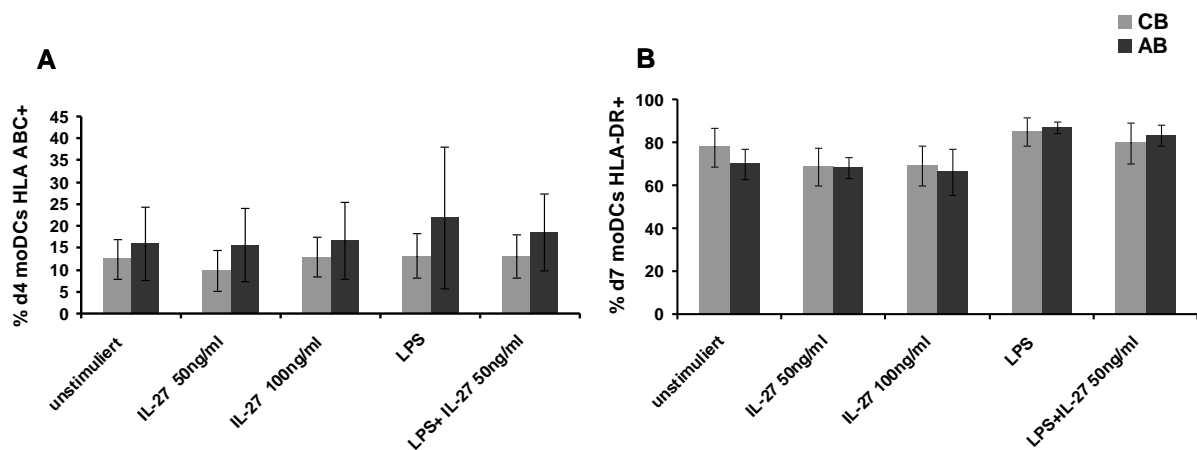


Abbildung 3.17: A: Anteil von HLA-ABC positiven Zellen an d4 moDCs im Vergleich zwischen neonatalen und adulten moDCs. **B:** Anteil von HLA-DR positiven Zellen an d7 moDCs im Vergleich zwischen neonatalen und adulten moDCs. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM. n=3-7

3.6 Die Wirkung von IL-27 auf die Expression antiviraler Gene

3.6.1 IL-27 induziert Expression von IFIT-Genen

Auch IFIT (Interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats) 1, 2 und 3, durch Interferone und virale Infektionen induzierbare Gene (Guo et al., 2000; Fensterl und Sen, 2011), wurden mittels PCR-Arrays erfasst. Zudem wurden Gene der IFITM-Familie (IFN-induced transmembrane protein) untersucht. Die IFIT- und IFITM-Proteine spielen eine Rolle bei der Inhibition der Replikation von Viren (Diamond und Farzan, 2013). In neonatalen moDCs konnte bei den mit IL-27 stimulierten moDCs eine deutliche Expressionssteigerung von IFIT2 und IFIT3 beobachtet werden, wobei die Expression von IFIT3 auch bei Adulten nach IL-27-Stimulation hochreguliert wurde (Abbildung 3.18).

Sowohl IFITM1, als auch IFITM2 wurden durch IL-27 induziert. Letzteres ausschließlich bei neonatalen moDCs (Abbildung 3.18).

Demnach beeinflusst IL-27 auch Mechanismen der angeborenen Immunantwort bezüglich antiviraler Abwehr, insbesondere bei Neonaten.

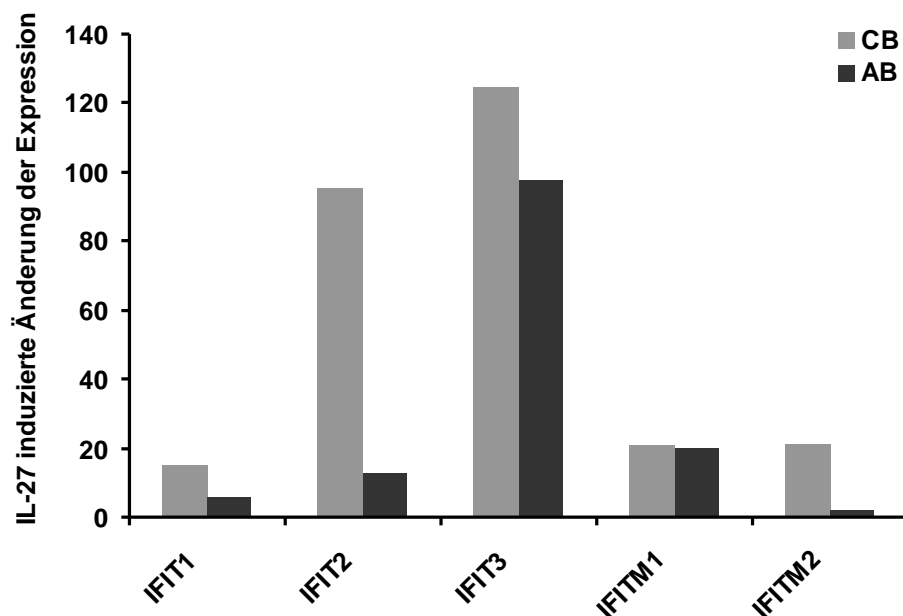


Abbildung 3.18: Einfluss von IL-27 auf die Expression der IFIT-Genfamilie, die eine Rolle bei der angeborenen Immunantwort spielen. Gezeigt werden *fold regulations*, d.h. um wie vielfach die Expression des entsprechenden Gens nach IL-27-Stimulation (50 ng/ml) verglichen mit dem unstimulierten Zustand nach oben oder unten reguliert wurde. IFIT1, 2: n=3. IFIT3: n=6

3.6.2 IL-27 induziert die Expression von Interferon-Regulatorischen-Faktoren (IRFs)

Ein PCR-Array diente dem Nachweis der Expression von Genen, die mit Interferon-Signalwegen assoziiert sind (Abbildung 3.19). Dabei wurde in neonatalen moDCs ein deutlicher Einfluss von IL-27 auf die Expression von IRF2 und IRF7 festgestellt. IRF2 ist bei der Induktion von Th1-Immunantworten von Bedeutung, während IRF7 ein wichtiger Regulator Typ1-Interferon-abhängiger Immunantworten ist (Honda et al., 2005).

In adulten moDCs hingegen wirkte sich die Gabe von IL-27 vor allem auf IRF1 und IRF3 aus, die beide eine Rolle bei der Induktion von antibakteriellen und antiviralen Immunantworten spielen. IRF1 ist zudem an der Initiierung von Th1-Antworten beteiligt (Honda et al., 2005).

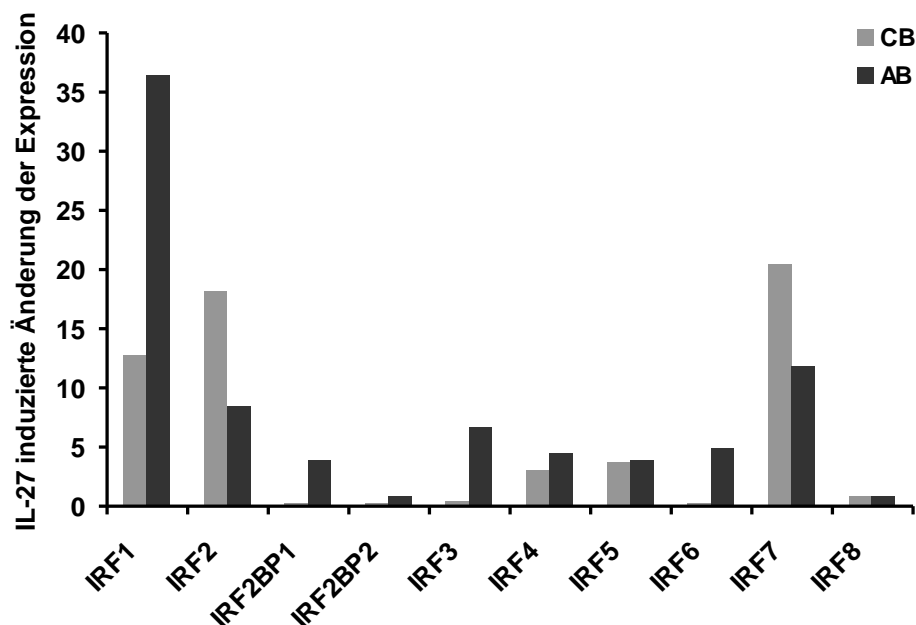


Abbildung 3.19: Einfluss von IL-27 auf die Expression von Interferon Regulatorischen Faktoren (IRFs). Gezeigt werden *fold regulations*, d.h. um wie vielfach die Expression des entsprechenden Gens nach IL-27-Stimulation verglichen mit dem unstimulierten Zustand nach oben oder unten reguliert wurde. n=3

Die Expression der Interferon-regulatorischen Faktoren IRF2 und IRF8, die in Th1-Immunantworten involviert sind (Elser et al., 2002; Honda und Taniguchi, 2006) sowie von IRF7, waren von besonderem Interesse und wurden deshalb zusätzlich mithilfe von Real Time PCR-Analysen untersucht. Dabei konnte nachgewiesen werden, dass IL-27 die Expression von IRF8 in neonatalen moDCs signifikant erhöht (Abbildung 3.20 A). Im PCR-Array konnte dieser Unterschied nicht aufgeschlüsselt werden, da die *fold regulations* dieses Gens insgesamt

auf einem niedrigen Level lagen. IRF8 ist auch an der Regulation der IL-27-Transkription beteiligt (Zhang et al., 2010). Die IRF2- und IRF7-Expression wurde hingegen durch den Einfluss von IL-27 sowohl bei neonatalen, als auch bei adulten moDCs in vergleichbarer Weise erhöht (Abbildung 3.20 B und C).

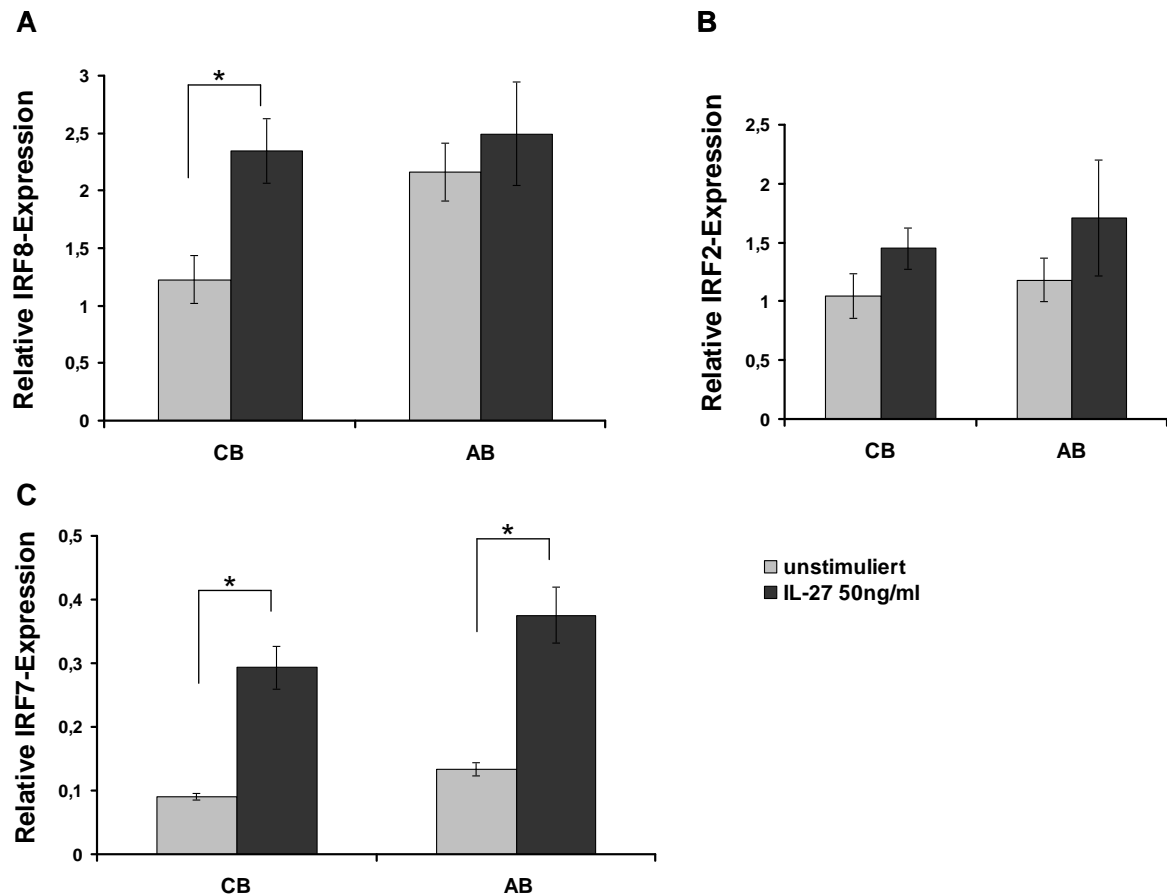


Abbildung 3.20: Expression von IRF8 (n=4-7), IRF2 (n=2-5) und IRF7 (n=2-3) mRNA bei unstimulierten und mit IL-27 stimulierten Zellen. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM; * p < 0.05

3.7 IL-27 moduliert die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren

Ein weiterer PCR-Array (Dendritic and Antigen presenting cells) zeigte den Einfluss von IL-27 auf Chemokine und Chemokinrezeptoren (Abbildung 3.21). Es wurde beobachtet, dass in CB moDCs die Chemokine CCL7 und CCL8 stärker hochreguliert wurden als in adulten Zellen. CCL7 und CCL8 können CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen anlocken (Van Damme et al., 1992; Loetscher et al., 1994).

Zudem konnte in neonatalen moDCs eine signifikante Erhöhung des Chemokins CXCL10 (auch bekannt als IP-10, IFN γ induzierbares Protein 10) durch die Stimulation mit IL-27 beobachtet werden. Dies konnte in einer Einzel-Real-Time PCR bestätigt werden (Abbildung 3.22 A).

CCR1 wurde sowohl in Nabelschnur-, als auch in adulten moDCs durch IL-27 erhöht (Abbildung 3.22 B). Im PCR Array jedoch trat die Hochregulation bei neonatalen moDCs deutlicher zu Tage, als bei adulten (Abbildung 3.21).

Die Expression eines der Liganden von CCR1, CCL23 (Nardelli et al., 1999b), war in unstimulierten adulten moDCs signifikant höher als in neonatalen (Abbildung 3.22 C). Die Gabe von IL-27 inhibierte bei beiden die CCL23-Expression.

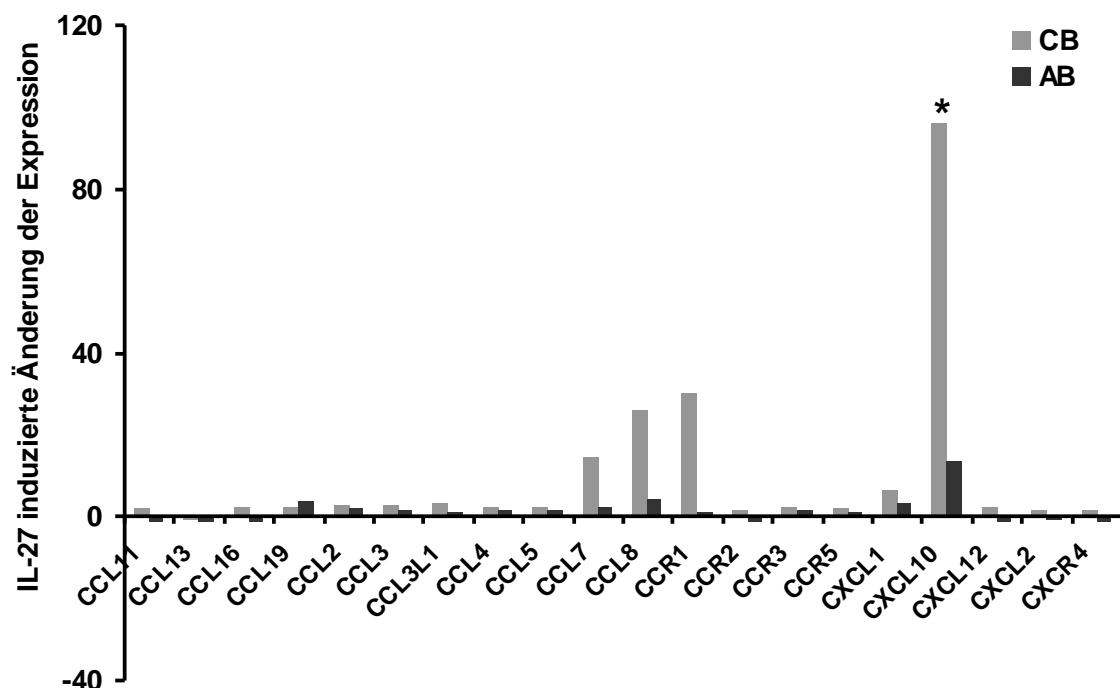


Abbildung 3.21: Einfluss von IL-27 auf die Expression von Chemokinen und Chemokinrezeptoren. Gezeigt werden *fold regulations*, d.h. um wie vielfach die Expression des entsprechenden Gens nach IL-27-Stimulation verglichen mit dem unstimulierten Zustand nach oben oder unten reguliert wurde. n=3 ; * p=<0.05.

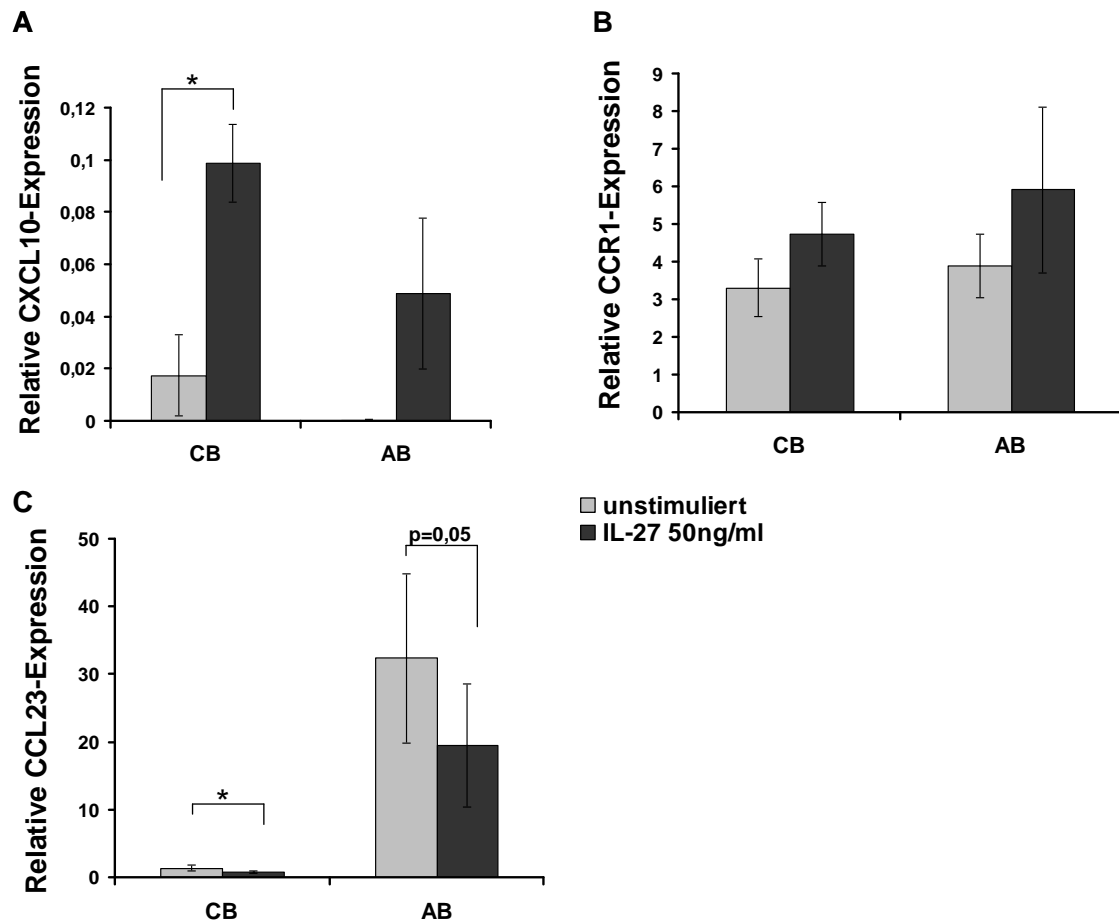


Abbildung 3.22: Expression von CXCL10, CCR1 und CCL23 mRNA bei unstimulierten bzw. mit IL-27 stimulierten Zellen. n= 3-6. Dargestellt sind Mittelwerte +/- SEM; * p= <0.05

Bei der ausschließlichen Stimulation mit IL-27 zeigte sich eine leichte Erhöhung auf die Oberflächenexpression des CXCL10-Rezeptors CXCR3, verglichen mit unstimulierten Zellen (Abbildung 3.23). Bei neonatalen moDCs bewirkte nur eine kombinatorische Stimulation mit LPS und IL-27 einen signifikanten Anstieg von CXCR3 auf der Zelloberfläche, während bei adulten auch LPS alleine eine signifikante Expressionssteigerung induzierte.

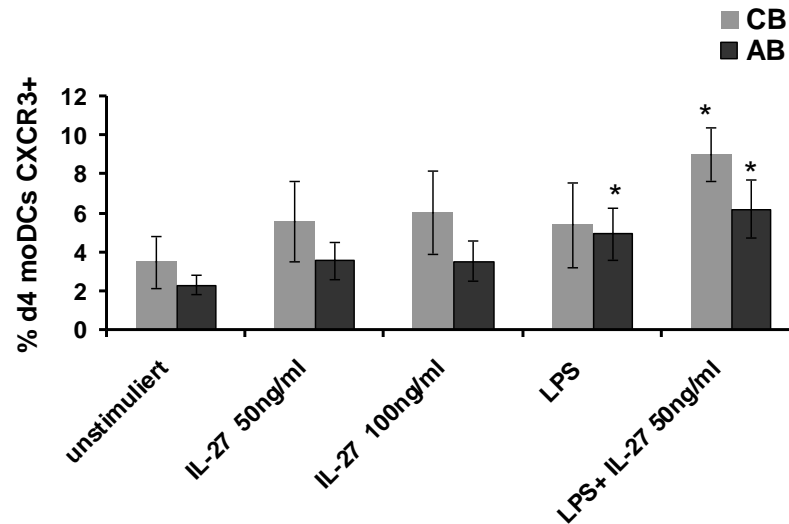


Abbildung 3.23: Anteil der CXCR3 positiven Zellen an d4 moDCs nach 24h Stimulation im Vergleich zwischen CB und AB Zellen. n=2-5. Gezeigt werden Mittelwerte +/- SEM; * p= <0.05.

3.8 Einfluss von IL-27 auf DC-Subpopulationen: mDCs und pDCs

Im Blut finden sich nur sehr geringe Zellzahlen myeloider DCs (mDCs, CD11c+) und plasmazytoider DCs (pDCs, CD123+). Aus diesem Grund wurden diese DC-Subgruppen, anstatt sie zu isolieren und dann in Kultur zu nehmen, direkt im Vollblut analysiert.

3.8.1 Nachweis von intrazellulärem IL-27 bei DC-Subpopulationen

Das Gating zur durchflusszytometrischen Analyse von intrazellulärem IL-27 (Abbildung 3.24) wurde in Anlehnung (Jansen et al., 2008) durchgeführt. Zunächst wurden die CD14-HLA-DR+ Zellen eingegrenzt, um Monozyten und Lymphozyten auszugrenzen. Danach wurden innerhalb dieser Population mDCs mithilfe des von ihnen exprimierten Oberflächenmoleküls CD11c, pDCs mithilfe von CD123 identifiziert.

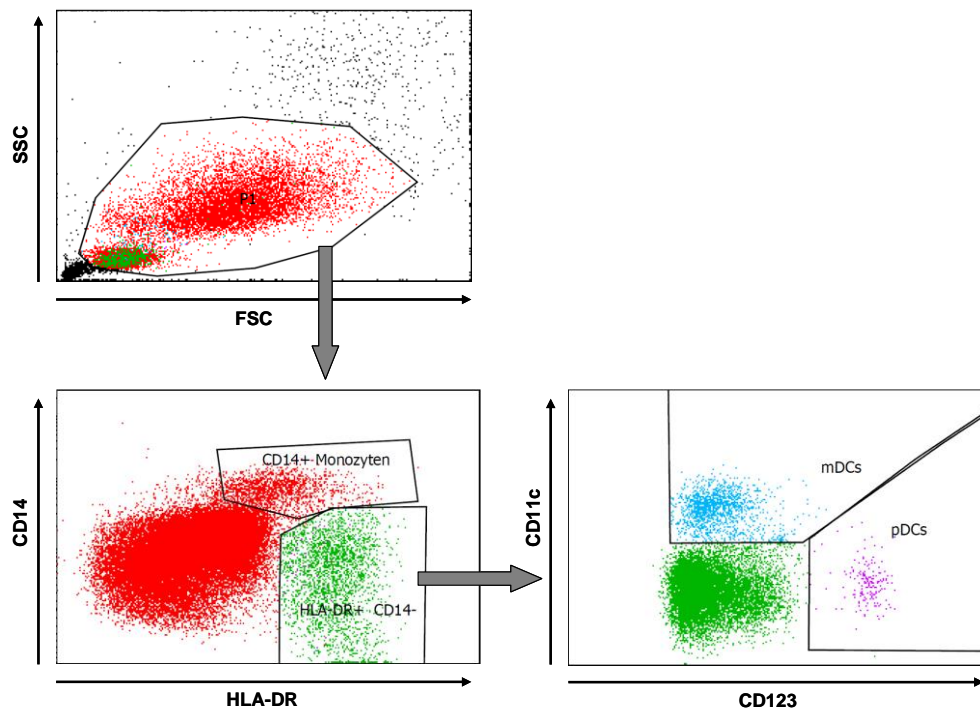


Abbildung 3.24: Gating-Strategie bei Vollblutanalyse von IL-27 bei mDCs und pDCs in Vollblut

Im Vollblut konnte aufgrund starker interindividueller Schwankungen kein signifikanter Einfluss von IL-27 auf seine eigene Expression bei mDCs nachgewiesen werden, obwohl eine Tendenz zur erhöhten Expression erkennbar gewesen ist. Bei adulten mDCs war dieser Effekt jedoch nur bei 50 ng/ml IL-27 erkennbar (Abbildung 3.25 A).

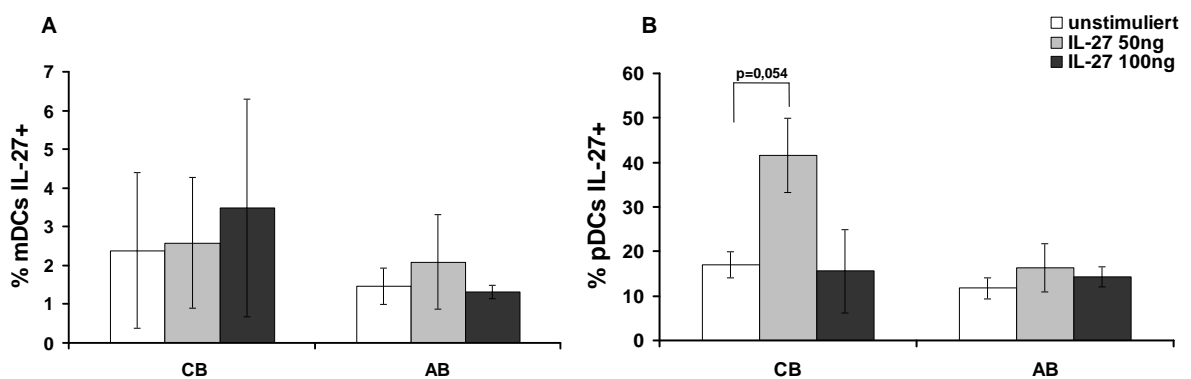


Abbildung 3.25: **A:** Anteil der IL-27 positiven Zellen an mDCs und **B:** Anteil der IL-27 positiven Zellen an pDCs aus Vollblutkulturen nach Stimulation mit 50 bzw. 100 ng/ml IL-27 im Vergleich zwischen CB und AB Zellen. Mittelwerte +/- SEM; n=2-5

Neonatale pDCs wiesen hingegen eine signifikante Expressionssteigerung von IL-27 nach der Stimulation mit 50 ng/ml IL-27 auf (Abbildung 3.25 B). Adulte pDCs zeigten wiederum ausschließlich eine leichte Tendenz zu einer erhöhten IL-27-Produktion nach Stimulation mit

50 ng/ml IL-27. Sowohl neonatale, als auch adulte pDCs zeigten jedoch keine Reaktion auf die Stimulation mit 100 ng/ml IL-27.

3.8.2 Einfluss von IL-27 auf die Expression von Kostimulatoren bei DC-Subpopulationen

Darüber hinaus wurde analysiert, ob und inwiefern IL-27 und/oder LPS und PolyIC die Oberflächenexpression der Kostimulatoren CD86 und CD40 und des MHCII-Moleküls HLA-DR beeinflussen kann.

Bei neonatalen mDCs konnte beobachtet werden, dass CD80 im Vergleich zu adulten mDCs insgesamt auf einem höheren Niveau exprimiert wurde (Abbildung 3.26 A).

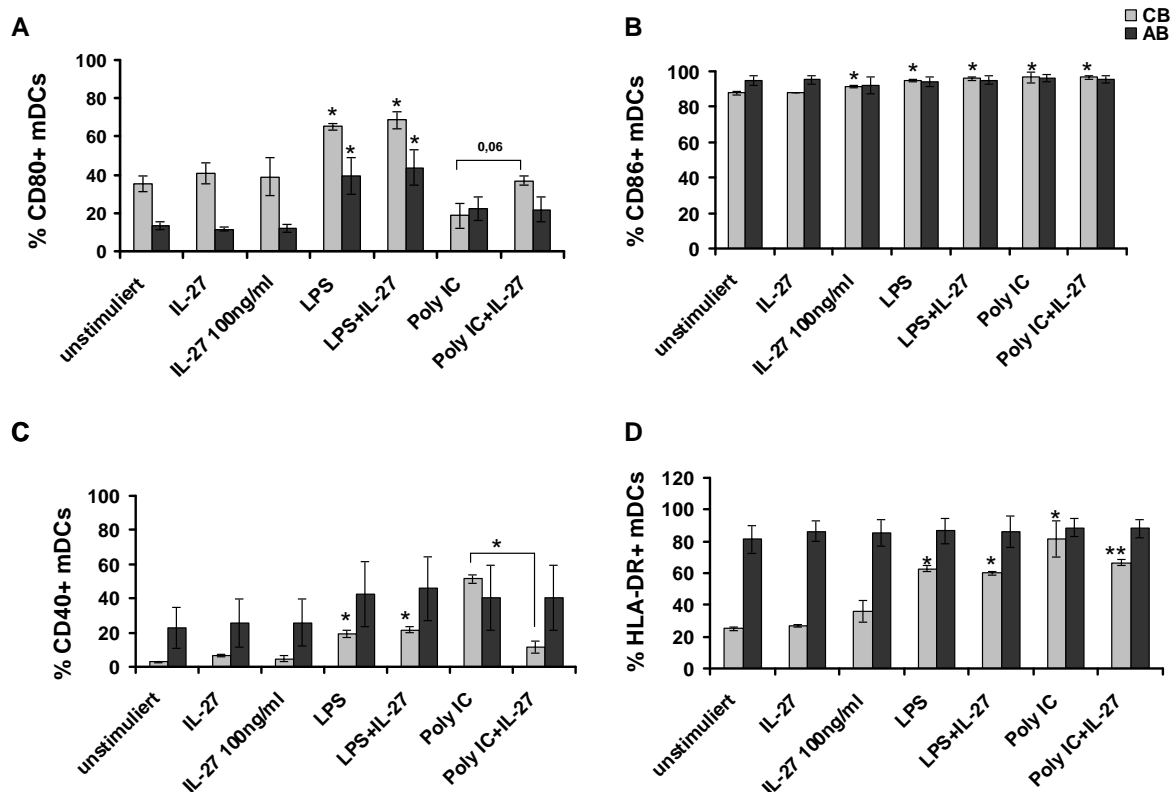


Abbildung 3.26: Anteil der CD80, CD86, CD40 und HLA-DR positiven Zellen an mDCs aus Vollblutkulturen nach Stimulation mit 50 bzw. 100 ng/ml IL-27 im Vergleich zwischen CB und AB Zellen. Mittelwerte +/- SEM; n=2-3; * p= <0.05, **p=<0.005.

Durch IL-27 (50 ng/ml) wurde bei Neonaten die Oberflächenexpression von CD80 nur leicht erhöht. Bei adulten Zellen war kein Effekt erkennbar. Eine deutliche Erhöhung trat bei beiden erwartungsgemäß nach Zugabe des TLR4-Liganden LPS auf. Bei CB mDCs konnte dieser

Effekt durch eine gleichzeitige Stimulation mit IL-27 sogar noch leicht gesteigert werden. Im Gegensatz dazu wurde durch PolyIC, ein TLR3-Ligand, bei Neonaten CD80 gehemmt. Wurde jedoch gleichzeitig mit IL-27 stimuliert, wurde eben dieser Effekt der CD80-Hemmung wieder aufgehoben. Bei Adulten hingegen fand bereits eine CD80-Erhöhung bei der ausschließlichen Gabe von PolyIC statt. Hier hatte die zusätzliche Gabe von IL-27 keinen Effekt.

Die Oberflächenexpression von CD86 wurde ebenfalls analysiert (Abbildung 3.26 B). Dabei zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Expression bei neonatalen mDCs nach der Zugabe von 100 ng/ml IL-27, LPS sowie LPS+IL-27 und PolyIC wie auch PolyIC+IL-27.

CD40, ein weiteres kostimulatorisches Molekül, wurde insgesamt in neonatalen mDCs in geringerem Maße -verglichen mit den adulten Zellen- exprimiert (Abbildung 3.26 C). Bei neonatalen mDCs führte IL-27 zu einer leichten Steigerung der CD40-Expression. Dies entspricht den Ergebnissen, die mit moDCs erzielt wurden. Auffällig erhöht wurde CD40 jedoch nur unter dem Einfluss von LPS und noch stärker unter dem von PolyIC.

Wurde mit LPS und IL-27 zusammen stimuliert, gab es keinen Unterschied zu dem Effekt von LPS allein. Jedoch trat in neonatalen mDCs eine deutliche Reduktion der CD40-Expression auf, wenn zusätzlich zu PolyIC IL-27 gegeben wurde. Dies konnte bei adulten mDCs nicht beobachtet werden.

Die Expression von HLA-DR wurde in neonatalen mDCs durch IL-27 in einer Konzentration von 100 ng/ml leicht erhöht (Abbildung 3.26 D). LPS oder PolyIC führten hier zu einer deutlichen Steigerung von HLA-DR auf der Zelloberfläche. Gleichzeitige Stimulation von LPS oder PolyIC mit IL-27 führte jeweils zu einer Abschwächung des Effektes der TLR-Liganden allein. All dies traf nur auf neonatale, nicht auf adulte mDCs zu. Demnach tritt der Einfluss von IL-27 auf die von PolyIC induzierte Oberflächenexpression von Reifungsmarkern bei neonatalen mDCs deutlicher zu Tage, als bei adulten.

Es wurde beschrieben, dass pDCs ebenfalls kostimulatorische Moleküle auf ihrer Oberfläche tragen, bzw. diese bei Stimulation hochregulieren können (McKenna et al., 2005; Iparraguirre et al., 2008). Aus diesem Grund wurde auch die Subpopulation der CD123+ pDCs bezüglich des Einflusses von IL-27 auf ihre Oberflächenmarker-Expression analysiert. Bei neonatalen pDCs zeigte sich eine im Vergleich zu adulten mDCs insgesamt stärkere Expression von CD80 (Abbildung 3.27 A). Durch IL-27 wurde bei neonatalen pDCs die Oberflächenexpression von CD80 konzentrationsabhängig noch leicht erhöht. LPS als ausschließlicher Stimulus bewirkte ebenfalls eine leicht erhöhte Produktion von CD80, in Kombination mit IL-27 wurde diese jedoch reduziert. Bei Stimulation mit PolyIC war im Gegensatz dazu durch alleinige Stimulation eine CD80-Reduktion erkennbar. Wurde jedoch gleichzeitig IL-27 gegeben, stieg der Anteil an CD80 positiven pDCs an. Adulte pDCs zeigten bezüglich ihrer CD80-Oberflächenexpression keine Reaktion auf 50 ng/ml IL-27, und tendenziell konnte eine

Steigerung bei 100 ng/ml IL-27, LPS und PolyIC verglichen mit unstimulierten Proben beobachtet werden.

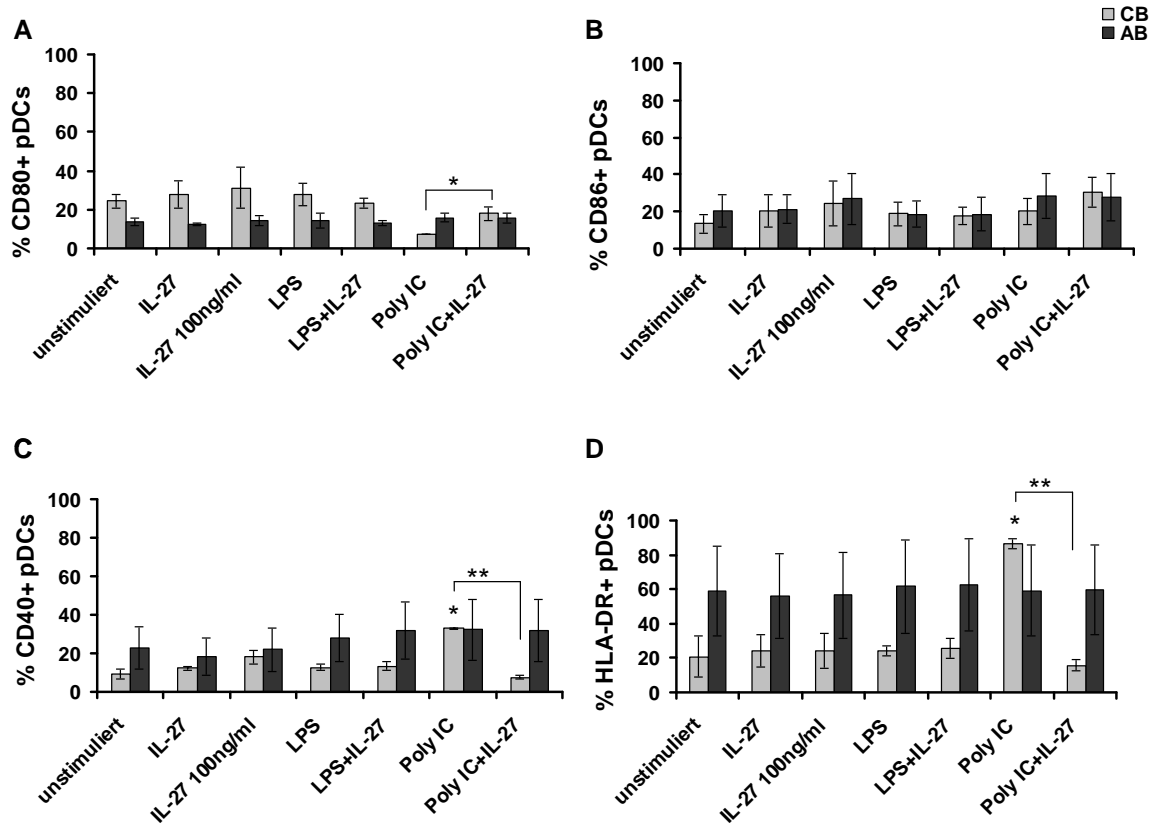


Abbildung 3.27: Anteil der CD80, CD86, CD40 und HLA-DR positiven Zellen an pDCs aus Vollblutkulturen nach Stimulation mit 50 bzw. 100 ng/ml IL-27 im Vergleich zwischen CB und AB Zellen. Mittelwerte +/- SEM; n=2-3. * p= <0.05, **p=<0,005.

Das kostimulatorische Molekül CD86 wurde bei neonatalen und adulten pDCs durch IL-27 leicht erhöht (Abbildung 3.27 B). Die Kombination aus PolyIC und IL-27 führte zu einer erhöhten CD86-Oberflächenexpression sowohl bei adulten, als auch bei neonatalen pDCs.

CD40 wurde bei adulten pDCs insgesamt stärker als bei neonatalen pDCs exprimiert (Abbildung 3.27 C). Bei neonatalen pDCs führte PolyIC zu einem signifikanten Anstieg von CD40. Bei gleichzeitiger Stimulation mit PolyIC und IL-27 fand im Vergleich zur ausschließlichen PolyIC-Stimulation eine signifikante Reduktion von CD40 statt.

HLA-DR wurde bei adulten pDCs stärker als bei neonatalen pDCs exprimiert, mit Ausnahme nach der Gabe von PolyIC, welches bei neonatalen pDCs zu einem signifikanten Anstieg von HLA-DR führte (Abbildung 3.27 D). Wurden PolyIC und IL-27 zusammen appliziert, fand im Vergleich zur ausschließlichen PolyIC-Stimulation eine signifikante Abnahme von HLA-DR statt.

3.9 Wirkung von moDCs auf CD4+ T-Zellen

3.9.1 Sezernierte Zytokine in autologen Kokulturen

Um die indirekte Wirkung von IL-27 im Zusammenhang mit T-Zellinteraktionen zu charakterisieren, wurden CD4+ T-Zellen mit autologen moDCs kokultiviert. Nach drei Tagen wurden die Überstände bezüglich sezernerter Zytokine analysiert.

IL-2, IL-4 und IL-5 konnten hierbei nicht detektiert werden. Des Weiteren wurden die Zytokine IL-10, TNF- α und IFN γ untersucht. Auffällig war, dass generell die Sekretion dieser Zytokine bei neonatalen CD4+ Kontrollzellen höher als bei den kokultivierten Zellen war (Abbildung 3.28). Bei adulten Zellen hingegen war die Konzentration der von den Kontrollzellen sezernierten Zytokinen niedriger, wenn diese nicht zusammen mit moDCs kultiviert worden waren.

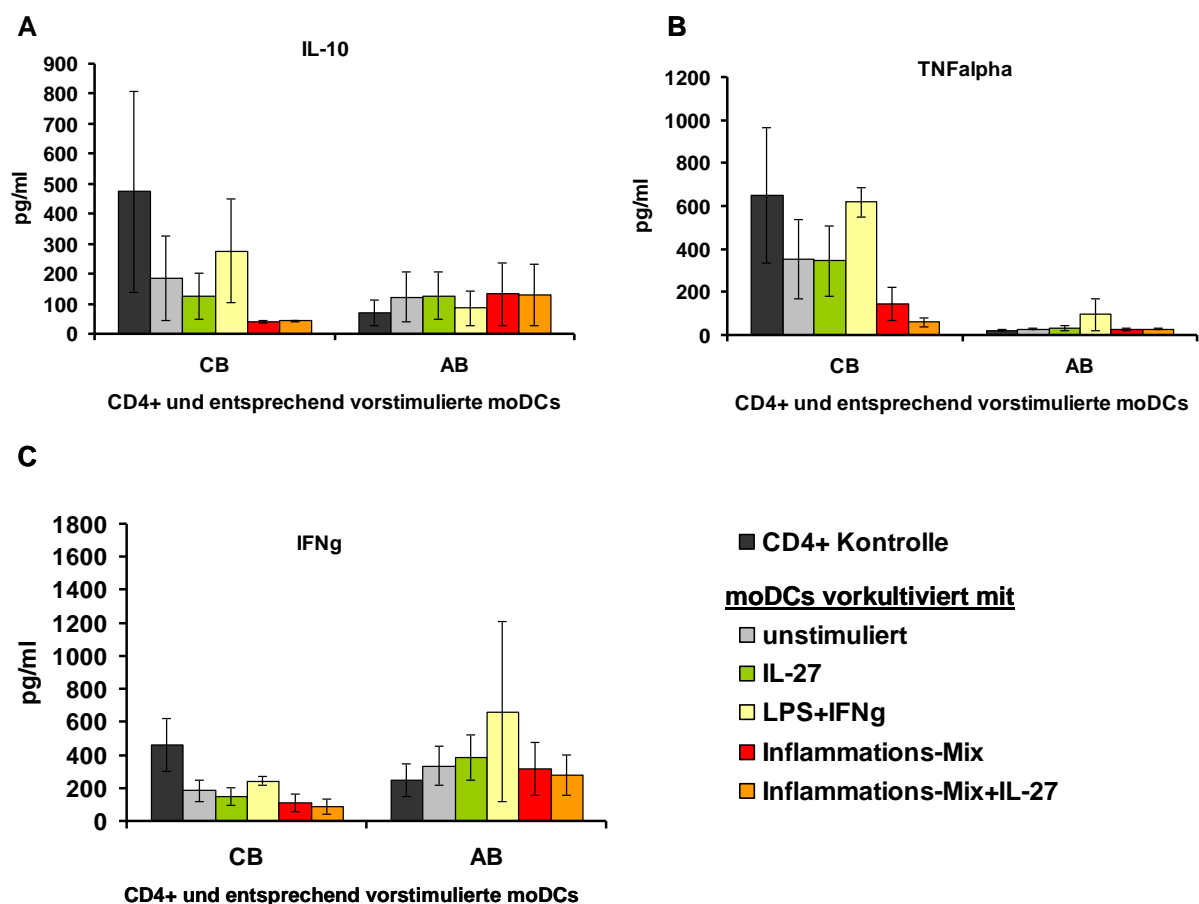


Abbildung 3.28: Nachweis der Zytokine IL-10, TNF- α und IFN γ in Überständen von autologen Kokulturen (d4 moDCs und CD4+ T-Zellen). Die sezernierten Zytokine wurden mittels CBA nachgewiesen. Dargestellt sind Mittelwerte \pm SEM; n=2-5

IL-10 wurde von adulten Zellen bei allen getesteten Bedingungen auf gleich bleibendem Niveau sezerniert (Abbildung 3.28 A). Von neonatalen CD4⁺Zellen wurde, verglichen mit den mit unstimulierten moDCs kokultivierten T-Zellen, weniger IL-10 produziert, wenn die moDCs zuvor mit dem Inflammations-Mix aus TNF- α , IL-6, PGE₂ und IL-1 β bzw. dem Inflammations-Mix zusammen mit IL-27 stimuliert worden waren. Eine gestiegene IL-10-Sekretion in den Kokultur-Überständen konnte jedoch gemessen werden, wenn die CD4⁺Zellen zusammen mit LPS+IFN γ -vorstimulierten moDCs kultiviert wurden.

TNF- α wurde sowohl bei neonatalen, als auch bei adulten Kokulturen verstärkt sezerniert, sofern die eingesetzten moDCs mit der Kombination aus LPS+IFN γ vorstimuliert worden waren (Abbildung 3.28 B).

IFN γ wurde ebenfalls sowohl bei CB, als auch bei AB Kokulturen vermehrt produziert, wenn mit LPS+IFN γ vorstimulierte moDCs mit den CD4⁺ Zellen kokultiviert wurden (Abbildung 3.28 C).

3.9.2 Wirkung von IL-27 auf die Proliferation von neonatalen CD4⁺ T-Zellen

Eine weitere Fragestellung war, wie sich das insbesondere von neonatalen DCs verstärkt produzierte Zytokin IL-27 auf die Proliferation von neonatalen CD4⁺ T-Zellen auswirkt.

Dazu wurden CFSE-markierte CD4⁺ Zellen mit anti-CD3, anti-CD28 und zusätzlich mit unterschiedlichen Konzentrationen von IL-27 stimuliert. Bei der nachfolgenden Messung im FACS wurde eine von der IL-27-Konzentration abhängige Steigerung der T-Zellproliferation beobachtet. Die meisten durch Proliferation gebildeten Tochterzellen lagen vor, wenn mit 50 ng/ml IL-27 stimuliert wurde (Abbildung 3.29).

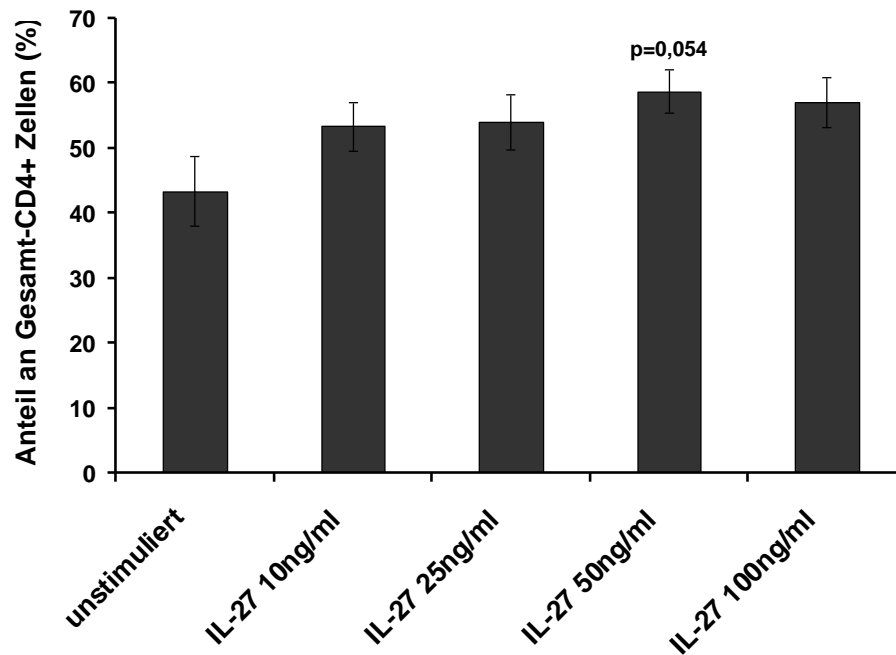


Abbildung 3.29: Proliferation von neonatalen T-Zellen unter dem Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von IL-27. Dargestellt ist jeweils der Anteil aller Tochterzellen (durch Proliferation bzw. Zellteilung entstanden) an den Gesamtzellen. Versuchsansatz jeweils als Triplikate, n=4. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM.

In Generation 1 wurde der deutlichste Einfluss von IL-27 beobachtet (Abbildung 3.30 B). Hier konnte IL-27-konzentrationsabhängig ein signifikanter Anstieg der Anzahl der Tochterzellen festgestellt werden. Am deutlichsten proliferierten die Zellen bei 50 bzw. 100 ng/ml IL-27, jedoch fand auch schon bei den geringeren Konzentrationen ein Anstieg der Proliferationsrate, verglichen mit den Kontrollzellen (nur anti-CD28), statt.

Auch in Generation 6 war ein deutlicher Anstieg der durch IL-27 induzierten Proliferation zu erkennen (Abbildung 3.30 B). Nach Stimulation mit 10, 50 und 100 ng/ml IL-27 war dieser Anstieg als signifikant zu bewerten.

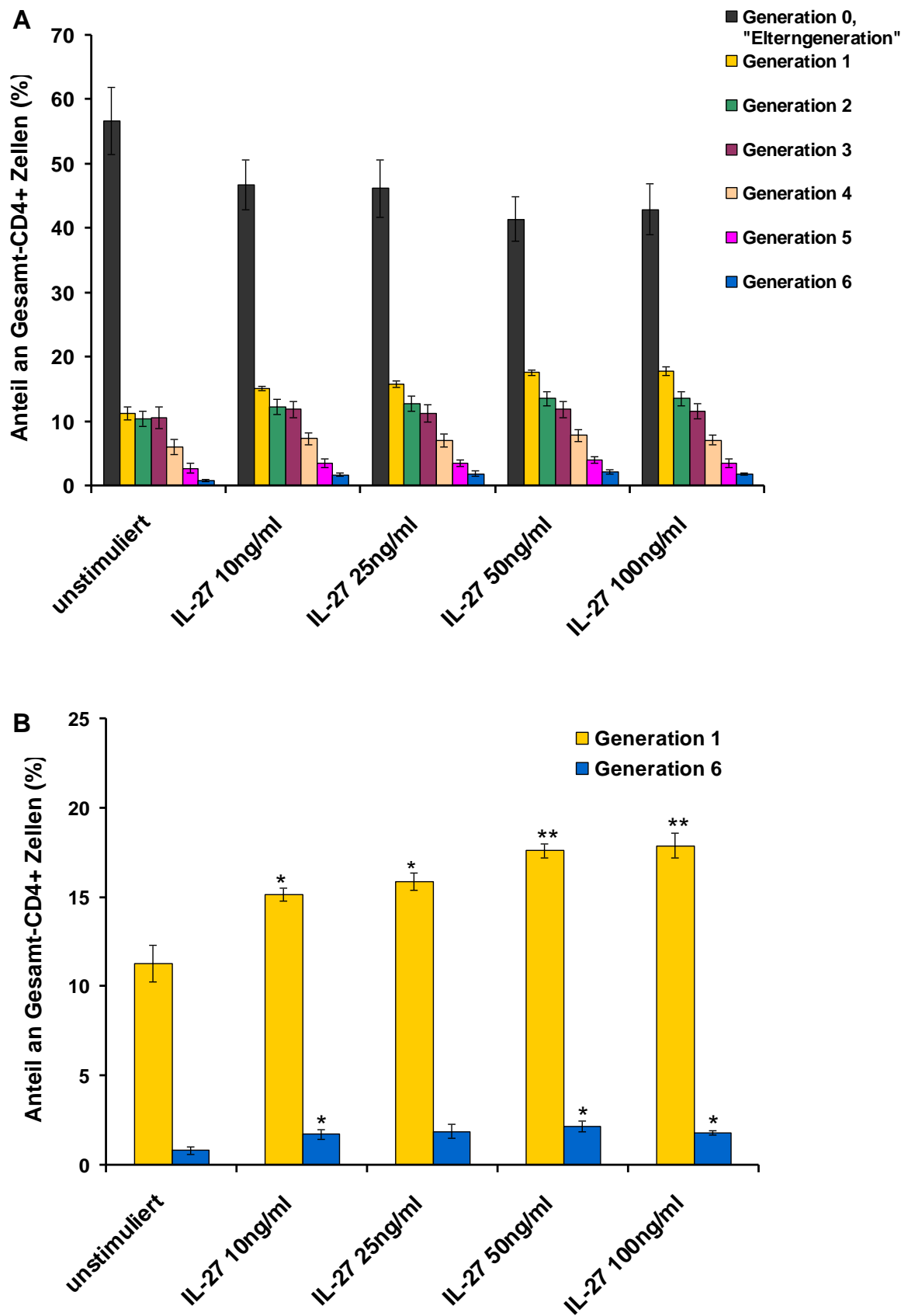


Abbildung 3.30: Proliferation von neonatalen T-Zellen unter dem Einfluss unterschiedlicher Konzentrationen von IL-27. **A:** Überblick über die Verteilung der CD4+ Zellen in Elterngeneration und die einzelnen Tochterpopulationen Generation 1 bis Generation 6. **B:** Separat dargestellt werden hier die Tochterzellen der Generation 1, d.h. aus der ersten Zellteilung, bzw. der Generation 6, an den Gesamtzellen. Versuchsansatz jeweils als Triplikat, n=4. Gezeigt werden Mittelwerte \pm SEM; * p = <0.05, **p=<0,005.

3.9.3 Proliferation von CD4⁺ T-Zellen in autologen Kokulturen mit moDCs

Des Weiteren wurde analysiert, wie sich durch IL-27-Stimulation beeinflusste moDCs auf die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen auswirken.

Dazu wurden CFSE-markierte CD4⁺ T-Zellen mit autologen moDCs kokultiviert. Anschließend wurde die Proliferation der CD4⁺ Zellen im FACS gemessen.

Bei neonatalen T-Zellen konnte eine Steigerung der Proliferation beobachtet werden, wenn diese mit IL-27-vorstimulierten moDCs kokultiviert wurden (Abbildung 3.31). Bei adulten Zellen konnte dieser Effekt nicht nachgewiesen werden.

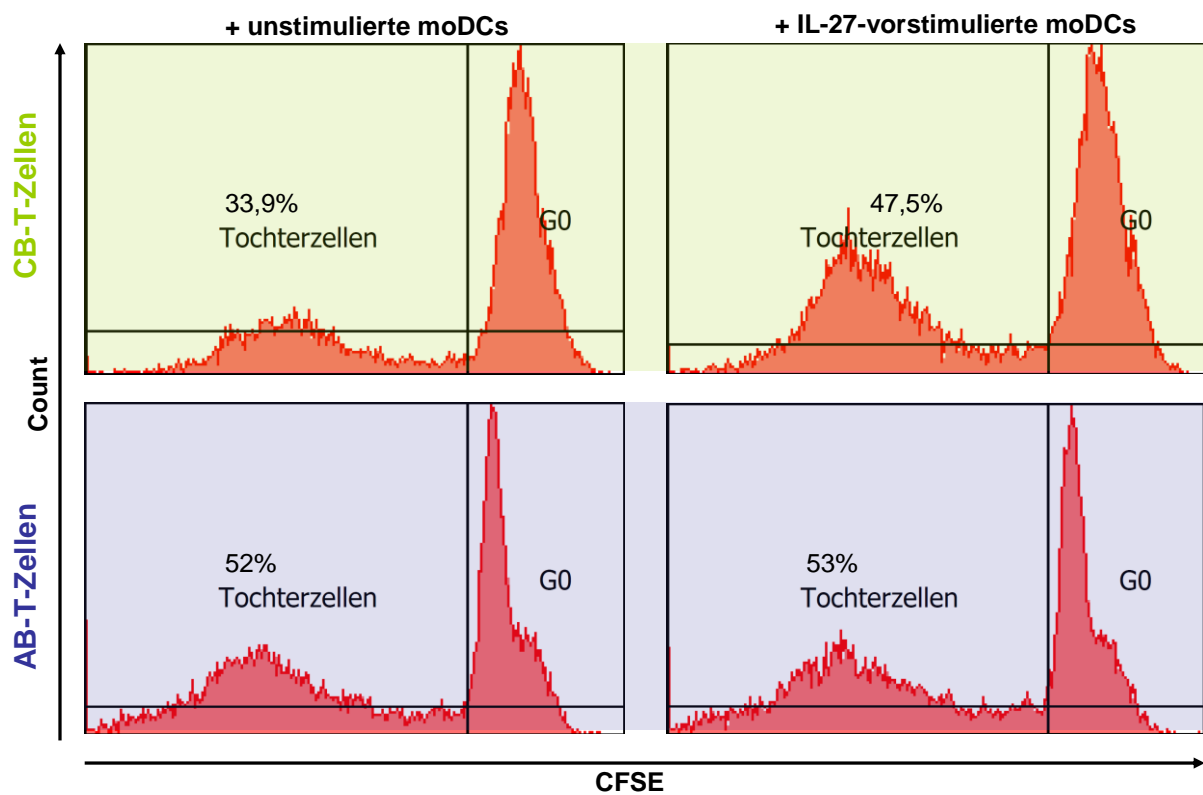


Abbildung 3.31: Nachweis der Proliferation von CD4⁺ T-Zellen nach Kokultur mit unstimulierten moDCs bzw. mit IL-27-vorstimulierten moDCs. Dargestellt ist je ein Histogramm von der in Triplikat durchgeführten Analyse.

4 Diskussion

4.1 Besonderheiten des neonatalen Immunsystems

Das neonatale Immunsystem ist im Vergleich zum adulten weniger effizient bei der Abwehr von Infektionskrankheiten, u.a. bei der Induktion zellvermittelter Immunität z.B. gegen Parasiten und Viren. Obwohl häufig als Unreife neonataler Immunzellen bezeichnet, wird dieses Phänomen, das sich unter anderem durch eine verminderte Neigung zu proinflammatorischen Immunreaktionen auszeichnet, mittlerweile auch als eine erforderliche Anpassung des neonatalen Immunsystems an die Gegebenheiten nach der Geburt betrachtet (Levy, 2007; Wood und Siegrist, 2011).

Neugeborene neigen zu einer verstärkten Ausbildung von Th2-Immunantworten und zu einem Mangel an Th1-Antworten (Barrios et al., 1996; Delespesse et al., 1998; Naderi et al., 2009). Der Ursprung dieses Phänomens beruht auf dem immunologischen Sonderstatus der Schwangerschaft. Die frühere Annahme, das mütterliche Immunsystem sei unterdrückt und aus diesem Grund würde der Fötus, ähnlich wie bei einer erfolgreichen Organtransplantation, nicht abgestoßen, ist jedoch durch den Nachweis einer kontrollierten Infiltration der Dezidua durch maternale Immunzellen relativiert worden. Neben NK-Zellen, dendritischen Zellen und Makrophagen finden sich an der fötomaternalen Barriere auch T-Zellen (Mor und Cardenas, 2010).

Jedoch würden erhöhte Mengen des Th1-Zytokin $IFN\gamma$ zu einer Abstoßung des Fötus und somit einer Fehlgeburt führen. Mit Ausnahme der Einnistung und der späteren immunologischen Einleitung der Geburt, die unter inflammatorischen Bedingungen stattfinden, liegt eine verstärkte Tendenz zur Ausbildung von Th2-Immunantworten seitens des mütterlichen Immunsystems und somit auch an der fötomaternalen Grenze vor (Wegmann et al., 1993). Darauf kann zurückgeführt werden, dass auch Neugeborene zunächst eher zu Th2-Antworten neigen. Dessen ungeachtet konnte gezeigt werden, dass neonatale DCs unter bestimmten Umständen, genauer durch die synergistische Stimulation von TLR-Liganden, dazu befähigt sind, die $IFN\gamma$ -Produktion naiver T-Zellen zu fördern (Krumbiegel et al., 2007). Neben T-Zellen spielen im Zusammenhang mit der neonatalen immunologischen Unreife dendritische Zellen eine entscheidende Rolle (Upham et al., 2006; Siegrist, 2007).

4.2 Untersuchungsmaterial und Kulturdauer

Für die vorliegende Arbeit wurden in erster Linie humane monozytäre dendritische Zellen verwendet, da sie sich als *in vitro* System für die Analyse dendritischer Zellen bewährt haben (Sallusto und Lanzavecchia, 1994; Zhou und Tedder, 1996; Hiasa et al., 2009). Hierzu wurden Monozyten mithilfe der Zytokine GM-CSF und IL-4 zu monozytären dendritischen Zellen differenziert. Diese dienen als *in vitro* Modell für antigenpräsentierende mDCs. In der Tat stammt auch *in vivo* ein Teil der myeloiden DCs von Monozyten ab (Peters et al., 1996). Für die Versuche zur IL-27-Produktion von humanen moDCs wurde unterschiedliche lange Kulturdauer für die Differenzierung der Monozyten zu moDCs getestet. Letztlich produzierten die moDCs nach der kürzeren Kulturdauer von vier Tagen mehr IL-27, als nach der längeren von 6 Tagen. Diese d4 moDCs wurden daraufhin als das geeignete Modell für die Untersuchung der Effekte von IL-27 bewertet.

Daneben wurde der Einfluss von IL-27 auf mDCs und pDCs analysiert. Beide Subpopulationen kommen im peripheren Blut nur in geringer Zahl vor, weshalb sie statt nach einer magnetischen Separation direkt im Vollblut, nach dessen Kultivierung, untersucht wurden.

Einerseits ist es von Vorteil, Zugang zu humanem Material zu haben, da gerade im Bereich der DCs diverse Abweichungen zwischen dem häufig verwendeten Mausmodell und dem humanen Immunsystem bekannt sind, andererseits traten teilweise, vermutlich aufgrund genetischer Variation zwischen den einzelnen Probanden, interindividuelle Schwankungen zwischen den gemessenen Parametern auf.

4.3 IL-27-Expressionskapazität neonataler DCs verglichen mit adulten Zellen

Die verminderte neonatale Kapazität zur Ausbildung einer Th1-Antwort wird auf einen Mangel an IL-12 bei neonatalen DCs zurückgeführt. Es wurde postuliert, dass bei neonatalen moDCs die Expression der IL-12p35 Untereinheit beeinträchtigt ist und somit die IFN γ - Produktion durch T-Zellen nicht hervorgerufen werden kann (Goriely et al., 2001; Langrish et al., 2002; Goriely et al., 2004).

Neonatale moDCs weisen aber dennoch die Voraussetzungen für die Generierung einer Th1-Antwort auf, was bei Untersuchungen zur Expression des IL-12-Familien-Zytokins IL-27 gezeigt werden konnte (Krumbiegel et al., 2008). Dabei wurde nachgewiesen, dass neonatale moDCs zu einer im Vergleich zu Adulten verstärkten Expression von IL-27p28 mRNA in der Lage sind, wenn sie mit einer Kombination aus LPS und IFN γ stimuliert werden.

Im Rahmen dieser Arbeit fiel beim Vergleich unterschiedlicher Kulturdauer zur Generierung von moDCs auf, dass nach der längeren Kulturdauer von sieben Tagen die Kapazität zur Produktion von IL-27 nicht so hoch war, wie nach vier Tagen. Ausnahme bildete hierbei die Stimulation mit LPS. In den Fällen, bei denen mit LPS alleine oder in Kombination mit IL-27 stimuliert worden ist, wurde im Gegensatz dazu nach sieben Tagen eine höhere IL-27-Produktion festgestellt. Im unstimulierten Zustand wurde nach vier Tagen von neonatalen moDCs signifikant mehr IL-27 gebildet als von adulten Zellen. Nach 7 Tagen kam es zu einer Angleichung der Menge an gebildetem IL-27 zwischen adulten und neonatalen moDCs. Neonatale moDCs verlieren demnach mit der Zeit ihre im Vergleich zu adulten erhöhte Kapazität zur IL-27-Produktion, wenn kein weiterer Stimulus auftritt. Während jedoch der TLR4-Ligand LPS zusammen mit IL-27 bei adulten d7 moDCs keinen nennenswerten Anstieg von IL-27 bewirkte, fand unter dieser Bedingung bei neonatalen moDCs ein signifikanter Anstieg des Zytokins statt.

Demnach sind neonatale moDCs prinzipiell dazu in der Lage, höhere Mengen an IL-27 zu sezernieren und somit potenziell dazu befähigt, auf diese Weise entweder Einfluss auf T-Zellen zu nehmen oder aber auch autokrine Effekte bei DCs, die wie im Rahmen dieser Arbeit gezeigt selbst auch den IL-27-Rezeptor exprimieren, auszulösen. Adulte Zellen weisen also unter allen beobachteten Umständen eine geringere Produktion von IL-27 auf. IL-27, ebenfalls der IL-12-Zytokin-Familie zugehörig, fördert zwar auch bei Adulten Th1-Antworten (Pflanz et al., 2002) und tritt generell früh im zeitlichen Verlauf einer Th1-Antwort auf, jedoch nur, bis ausreichende Mengen an IL-12 produziert werden (Owaki et al., 2005). Dementsprechend spielt IL-27 im adulten Immunsystem eine im Vergleich zu seiner potentiellen Funktion bei Neonaten wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle bei der Generierung einer Th1-Antwort.

Die vorliegenden Daten zeigten, dass neonatale dendritische Zellen verglichen mit adulten Zellen schon im unstimulierten Zustand mehr IL-27 produzierten als adulte moDCs, sowohl auf Transkriptions-Ebene, als auch auf Protein-Ebene. Auch über neonatale Makrophagen wurde damit einhergehend berichtet, dass sie ebenfalls mehr IL-27 als adulte Makrophagen produzieren (Kraft et al., 2013).

Im Folgenden werden autokrine Effekte von IL-27 auf seine eigene Expression und auf die Expression des IL-27-Rezeptors (primäre autokrine Effekte) diskutiert. Darüber hinausgehende sekundäre autokrine Effekte, wie u.a. der Einfluss auf die Produktion inflammatorischer Zytokine und Chemokine werden ebenfalls erörtert.

4.4 Primäre autokrine Wirkung von IL-27 DCs

Voraussetzung für eine autokrine Signalgebung durch IL-27 ist die Expression des IL-27-Rezeptors, der aus den beiden Untereinheiten WSX-1 und gp130 besteht (Pflanz et al., 2004). Da gp130 auch an der Signalgebung weiterer Zytokine, wie z.B. IL-6 beteiligt ist, wurde eine Aussage über die Expression eines funktionalen IL-27-Rezeptors nur über das Maß der Expression von WSX-1 getroffen. Bei moDCs konnte im Rahmen dieser Arbeit eine Expression von WSX-1 nachgewiesen werden, was ihnen ermöglicht, Signale über IL-27 zu empfangen. In Versuchen mit Mäusen wurde ein Zusammenhang zwischen der WSX-1/IL-27 Interaktion und einer negativen Th2-Regulation festgestellt (Lucas et al., 2003; Artis et al., 2004).

IL-27 zeigte überdies einen positiven Einfluss auf seine eigene Produktion. Sowohl bei neonatalen, als auch bei adulten moDCs wirkte sich IL-27 fördernd auf die IL-27-Expression aus, was zunächst auf einen positiven Rückkopplungsmechanismus hindeutet.

Bei neonatalen pDCs induzierte IL-27 ebenfalls seine eigene Produktion. Es wurde postuliert, dass durch pDCs gebildetes IL-27 zu immunregulatorischen Funktionen von pDCs beiträgt (Matta et al., 2012).

Guzzo et al. berichten, dass in Monozyten die Expression der IL-27 Rezeptor-Untereinheit gp130, nicht jedoch die Expression der Untereinheit WSX-1 durch IL-27 hochreguliert wird (Guzzo et al., 2012b). Die vorliegenden Daten zeigen, dass in moDCs die Expression der IL-27 Rezeptor-Untereinheit WSX-1 unter dem Einfluss von IL-27 sogar leicht gehemmt wurde. Dies ist ein erster Hinweis auf eine Selbstrestriktion von IL-27 im Zuge der autokrinen Reaktion. Der TLR4-Ligand LPS, ein Bestandteil der Zellmembran pathogener gramnegativer Bakterien, hatte in neonatalen moDCs überdies einen negativen Einfluss auf die Expression von WSX-1 und somit auf die IL-27-Sensitivität. Der positiv autokrine Einfluss von IL-27 auf neonatale DCs während einer bakteriellen Infektion ist demnach begrenzt.

IL-27 wirkt in humanen und murinen Zelllinien, T-Zellen und Monozyten über eine Aktivierung der Signaltransduktoren STAT1 und STAT3 (Hibbert et al., 2003; Kallioli and Ivashkiv, 2008; Guzzo et al., 2010). Es konnte gezeigt werden, dass IL-27 sowohl bei neonatalen, als auch adulten moDCs über eine Phosphorylierung von STAT1 Signale vermittelt (Siry, 2012). Nifuroxazid, ein STAT1/STAT3-Inhibitor, hatte insbesondere bei neonatalen moDCs einen hemmenden Einfluss auf Faktoren, die nachweislich durch IL-27 induziert werden konnten, wie CXCR3, TNF- α und schließlich IL-27 selbst.

4.5 Sekundäre autokrine Wirkung von IL-27 auf DCs

Sowohl CD40, als auch CD86 als kostimulatorische Oberflächenmoleküle wurden in neonatalen moDCs im Vergleich zu adulten in geringerem Maße exprimiert. IL-27 hatte einen positiven Einfluss auf die Expression von CD40 und CD86. Da auch nachgewiesen werden konnte, dass unstimulierte neonatale moDCs mehr IL-27 produzieren als adulte, kann davon ausgegangen werden, dass in Neonaten IL-27 *in vivo* dazu beiträgt, kostimulatorische Eigenschaften von DCs zu verbessern. Und auch im Falle einer Infektion, wenn noch mehr IL-27 gebildet wird, könnte es im neonatalen Immunsystem dazu beitragen, die Fähigkeit der Zellen zur Kostimulation von T-Zellen zu verbessern und dem adulten Level anzugleichen.

IL-27 spielt zudem eine Rolle bei der Antigenpräsentation durch DCs. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Gene, deren Produkte am Aufbau und an der Beladung von MHCI und MHCII-Molekülen beteiligt sind, durch den Einfluss von IL-27 verstärkt exprimiert wurden.

Es ist bekannt, dass humane neonatale DCs in der Lage sind, über den MHCI-Komplex Antigene zu prozessieren und zu präsentieren (Gold et al., 2007). In Einklang hiermit konnte hier die Expression des HLA-A-Allels, das zum MHCI-Komplex gehört, nachgewiesen werden. Die vorliegenden Daten belegen, dass IL-27 bei neonatalen moDCs einen fördernden Einfluss auf die Expression von HLA-A auf mRNA-Ebene hatte. Eine Veränderung der HLA-ABC Oberflächenexpression wurde jedoch nicht beobachtet.

(Canaday et al., 2006) konnten zeigen, dass neonatale Monozyten zwar einen Defekt in der MHCII-Antigenpräsentation aufweisen, dieser jedoch nicht auf einer verringerten Expression von MHCII-Molekülen beruht. Damit einhergehend konnte im Rahmen der hier erhobenen Daten nachgewiesen werden, dass auch neonatale moDCs HLA-DR genau wie adulte moDCs auf ihrer Oberfläche tragen. Die Expression von HLA-DR wurde unter dem Einfluss von IL-27 fast nicht beeinflusst, wobei tendenziell eine leichte Reduktion der Oberflächenexpression erkennbar war.

Jedoch hat IL-27 in neonatalen Zellen dennoch einen positiven Einfluss auf die Peptidbeladung von MHCII-Molekülen, da HLA-DM, welches an diesem Vorgang beteiligt ist, durch IL-27 um ein Vielfaches stärker exprimiert wurde.

Auch konnte hier gezeigt werden, wie IL-27 die Expression des Chemokins CXCL10 beeinflusste, welches durch IL-27 in neonatalen moDCs deutlich stärker als in adulten Zellen induziert wurde. CXCL10 vermittelt als ein Zielgen von STAT1 (Kanda et al., 2007) die Rekrutierung von Leukozyten und aktiviert *Natural Killer*-Zellen, dendritische Zellen, Makrophagen, B-Zellen (Liu et al., 2011) und T-Zellen (Sallusto et al., 1998). Autokrin wirkendes IL-27 könnte auf diesem Wege also die Initiierung angeborener wie auch adaptiver

Immunantworten unterstützen, indem es DCs mittels CXCL10 zur Aktivierung dieser unterschiedlicher Zelltypen befähigt. Anhand von Maus-Versuchen konnte gezeigt werden, dass CXCL10 die IL-12p40-Produktion dendritischer Zellen anregt und darüber hinaus die Generierung einer Th1-Antwort fördert, indem es die Empfindlichkeit von CD4⁺ Zellen gegenüber IL-12 durch eine gesteigerte Expression der IL-12 Rezeptor β 2 Kette erhöht (Vasquez et al., 2008). Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte IL-12p70, welches aus den beiden Untereinheiten IL-12p35 und IL-12p40 zusammengesetzt ist, konnte durch IL-27 jedoch nicht induziert werden. Eine Erklärung hierfür könnte der bei Neonaten vorliegende Defekt in der Produktion der IL-12p35-Untereinheit sein (Goriely et al., 2001).

Der Rezeptor von CXCL10, CXCR3, wird unter anderem von aktivierten T-Zellen exprimiert (Loetscher et al., 1996; Loetscher et al., 1998), wodurch die Sekretion von CXCL10 zu deren Rekrutierung führen könnte. Inwiefern CXCR3 auf neonatalen T-Zellen exprimiert wird, bedarf weiterer Untersuchungen.

Die vorliegenden Daten zeigen, im Gegensatz zu der erhöhten CXCL10-Expression, nur einen eher geringen Einfluss von IL-27 auf die Expression von CXCR3 auf der moDC-Oberfläche, was ein Nadelöhr für die autokrine Wirkung von CXCL10 darstellen könnte. Ng *et al.* identifizierten CXCL10 als Marker für Infektionen bei Neugeborenen. Insbesondere im Plasma von Frühgeborenen, die an Sepsis verstarben, wurden dabei erhöhte Level von CXCL10 nachgewiesen, was die Autoren zu dem Schluss führte, dass die gesteigerte Menge von CXCL10 zu der Schwere des Sepsisverlaufes beitrug (Ng et al., 2007). Obwohl CXCL10 vor allem in neonatalen Zellen unter dem Einfluss von IL-27 vermehrt produziert wurde, könnte die begrenzte Anzahl an CXCR3-Rezeptoren einer übermäßigen Aktivierung der DCs und somit einer schädlichen, inflammatorischen Immunantwort vorbeugen.

In Keratinozyten von Psoriasis-Patienten rief IL-27 ebenfalls eine Steigerung des Th1-Chemokins CXCL10 hervor (Shibata et al., 2010). Es wurde außerdem beschrieben, dass IL-27 in humanen primären Keratinozyten die Expression von CXCL10 und weiteren Chemokinen sowie Oberflächenmolekülen wie MHC I induziert, wenn danach ein zweites Signal in Form von TNF- α folgte (Wittmann et al., 2009). Auch die Arbeitsgruppe um Fujiwara konnte zeigen, dass TNF- α und IL-27 einen synergistischen Effekt bezüglich der Induktion von Chemokinen haben (Fujiwara et al., 2012).

In den für die vorliegende Arbeit durchgeführten Versuchen konnte ebenfalls eine durch IL-27 gesteigerte Expression von TNF- α detektiert werden. Dies spricht dafür, dass auch der hier beobachtete Effekt von IL-27 auf CXCL10 durch TNF- α vermittelt wird. Die IL-27-Empfindlichkeit unterscheidet sich deutlich zwischen neonatalen und adulten moDCs. So konnte hier gezeigt werden, dass eine höhere IL-27-Konzentration in adulten Zellen die Menge an sezerniertem TNF- α nicht erhöhte, während dies bei neonatalen Zellen der Fall war.

Im Zuge der sekundären autokrinen Reaktion von IL-27 wurde in neonatalen moDCs überdies die Expression der proinflammatorischen Chemokine CCL7 und CCL8 bzw. die Expression des Chemokinrezeptors CCR1 erhöht. Bei CCR1, das auf unreifen DCs exprimiert wird (Sozzani et al., 1999), handelt es sich um einen Rezeptor für proinflammatorische Chemokine wie beispielsweise CCL7 und CCL8 (Gong et al., 1997; Sozzani, 2005). Es wurde außerdem beschrieben, dass CD11c⁺ DCs durch CCL7 und CCL8 zur Migration induziert werden (de la Rosa et al., 2003). Nach diesen Daten erhöht IL-27 die Migrationskapazität insbesondere in neonatalen DCs.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Expression Interferon regulatorischer Faktoren (IRFs) ebenfalls durch IL-27 beeinflusst wurde. IL-27 erhöhte signifikant die Expression von IRF8 bei neonatalen moDCs. IRF8 ist in der Lage, an den Promotor von IL-27p28 zu binden und dadurch dessen Transkription zu regulieren (Zhang et al., 2010). Außerdem wurde beschrieben, dass IRF8 in Makrophagen, bei denen es sich ebenfalls um antigenpräsentierende Zellen handelt, durch STAT1 aktiviert wird und eine verstärkte Aktivierung Interferon-induzierbarer Promotoren bewirken kann (Contursi et al., 2000). IRF8 ist darüber hinaus in Th1-Antworten involviert, da es benötigt wird, um bei antigenpräsentierenden Zellen die Expression des Th1-Zytokins IL-12 zu induzieren (Giese et al., 1997; Scharton-Kersten et al., 1997; Wang et al., 2000; Honda und Taniguchi, 2006).

Marquis et al. postulierten, dass IRF8 an Gene bindet, die mit den Funktionen antigenpräsentierender Zellen assoziiert sind (Marquis et al., 2011).

Möglicherweise besteht demnach ein Zusammenhang zwischen IRF8 und der weiter oben beschriebenen IL-27-induzierten Expression von Genen, deren Produkte am Aufbau und an der Beladung von MHCI und MHCII-Molekülen beteiligt sind.

Auch konnte hier gezeigt werden, dass die Expression von IRF2 unter dem Einfluss von IL-27 leicht erhöht wurde, sowohl in neonatalen, als auch in adulten moDCs. IRF2 nimmt ebenfalls Einfluss auf die Induktion von Th1-Antworten durch DCs. IRF2 ist ein negativer Regulator der TypI induzierten Genexpression, und somit sichert seine Expression die Balance zwischen nützlichen und schädlichen Effekten (Tamura et al., 2008).

Die Transkription von IFIT1, IFIT2 und IFIT3, die antiviral wirken und Zellmigration und Proliferation induzieren (Zhou et al., 2013), kann durch Interferone, virale Infektionen und bakterielle Bestandteile (PAMPs= Pathogen associated molecular patterns) induziert werden (Schmeisser et al., 2010; Fensterl und Sen, 2011). Sie wurden durch den Einfluss von IL-27 in neonatalen moDCs vermehrt exprimiert.

Auch die Gene aus der IFITM-Familie wurden analysiert. Dabei zeigte sich eine durch IL-27 hervorgerrufene Erhöhung von IFITM1 sowohl bei adulten, als auch neonatalen, von IFITM2

ausschließlich bei neonatalen DCs. Die Proteine aus der IFIT und der IFITM-Familie haben die Aufgabe, virale Replikation zu inhibieren (Diamond und Farzan, 2013).

Auf diese Weise könnte IL-27 in Neonaten hilfreich für die angeborene Immunantwort auf Viren sein. IL-27 wurde bereits mehrfach als antivirales Zytokin beschrieben. So wurde einhergehend mit den hier beschriebenen Daten festgestellt, dass IL-27 Interferon-regulierte Gene mit antiviraler Aktivität induziert (Bender et al., 2009). Außerdem wird IL-27 durch virale Doppelstrang-RNA induziert und fördert die Entwicklung von Effektor CD8⁺ T-Zellen (de Groot et al., 2012).

IL-27 ist bekannt als ein Zytokin mit pleiotroper Wirkung. Es werden ihm sowohl pro-, als auch antiinflammatorische Eigenschaften zugeschrieben.

Der autokrine Effekt von IL-27 resultierte in einer verstärkten Stimulation der proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α , insbesondere bei neonatalen moDCs. In der vorliegenden Arbeit wurde gezeigt, dass die Sekretion von IL-6, welches für eine Balance von pro- und antiinflammatorischen Immunreaktionen sorgt (Jones, 2005), ausschließlich in neonatalen moDCs signifikant durch IL-27 erhöht wurde. IL-6 wurde als Antagonist einer durch IL-12 hervorgerufenen Differenzierung von Th1-Zellen beschrieben (Rincon et al., 1997). Einerseits könnte somit die vermehrte Produktion des neonatalen IL-6 zu einer Restriktion von Th1-Immunantworten zugunsten einer stärkeren Th2-Antwort beitragen. Andererseits verbessert IL-27 die Th1-Stimulations-Kapazität von DCs, indem es die Expression von CXCL10, IRF8 und IRF2 fördert. In Einklang hiermit wurde auch beschrieben, dass es sich bei IL-6 um einen positiven Regulator von CXCL10 handelt (McLoughlin et al., 2005). IL-6 ist einer der Faktoren, die eine Differenzierung von Th17-Zellen aus naiven T-Zellen fördern (Bettelli et al., 2006). Eventuell könnte IL-27 also indirekt die Entstehung von Th17-Antworten in Neugeborenen begünstigen, obwohl es eigentlich als hemmend für die Differenzierung inflammatorischer Th17-Zellen beschrieben wurde (Batten et al., 2006; Stumhofer et al., 2006; Yoshimura et al., 2006). Das von Th17-Zellen produzierte IL-17 hält Entzündungsreaktionen aufrecht, indem es die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen induziert und somit andere Immunzellen, insbesondere Makrophagen und Neutrophile zum Ort des Geschehens rekrutiert. Das IL-17-inhibierende IL-27 ist demnach in der Lage, durch IL-17 induzierte pathologische Immunreaktionen wie Gewebeschädigungen abzuwenden (Batten und Ghilardi, 2007).

Einhergehend mit den hier vorliegenden Daten von neonatalen moDCs haben (Guzzo et al., 2010) auch bei Monozyten eine Induktion von IL-6 und weiteren proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen durch IL-27 postuliert.

Insgesamt decken sich die hier beschriebenen Beobachtungen mit jenen in der Literatur berichteten Beschreibungen von IL-27 als proinflammatorisches Zytokin. Dies erlaubt den

Schluss, dass IL-27 in der Lage ist, angeborene Immunantworten auf Pathogene zu unterstützen, indem es eine Entzündungsreaktion und indirekt die Rekrutierung von Leukozyten fördert.

In der vorliegenden Arbeit konnte kein Einfluss von IL-27 auf die Sekretion des antiinflammatorischen Zytokins IL-10 durch moDCs festgestellt werden, anders als es für T-Zellen beschrieben wurde (Batten et al., 2008).

Durch LPS induziertes TNF- α wurde bei CB und AB moDCs durch IL-27 erhöht. Ebenso IL-6 und IL-12p70. Damit in Einklang wurde für humane Monozyten beschrieben, dass IL-27 die Produktion der LPS-induzierten Zytokine TNF- α , IL-6, MIP1- α (CCL3) und MIP-1 β (CCL4) fördert (Guzzo et al., 2012a). Nur bei Adulten wurde jedoch außerdem LPS-induziertes IL-10 durch IL-27 verstärkt. IFN γ hatte bei neonatalen und adulten moDCs einen fördernden Effekt auf die Sekretion von IL-1 β . IL-27 wirkte jedoch im Zusammenhang mit LPS oder IFN γ -induziertem IL-1 β inhibitorisch. Die Produktion von TNF- α wurde nicht durch IFN γ alleine erhöht, jedoch bewirkte IL-27 zusammen mit IFN γ einen Anstieg von TNF- α .

Während IL-27 also zum einen auf ein bereits zur Produktion angeregtes Zytokin hemmend wirken kann, kann es andererseits fördernd auf inflammatorische Zytokine wirken, deren Produktion durch einen Stimulus nicht erhöht werden konnten. IL-27 könnte demnach die Eigenschaft aufweisen, Immunantworten abhängig vom Kontext zu regulieren.

Ebenfalls untersucht wurde die autokrine Wirkung von IL-27 im Zusammenhang mit IL-21, einem Zytokin, das von aktivierten T-Zellen gebildet wird (Parrish-Novak et al., 2000). Es ist beschrieben worden, dass IL-27 die Differenzierung und Expansion von Tr1-Zellen begünstigt, unter anderem indem es IL-21 induziert (Awasthi et al., 2007). Dass IL-21 auf das neonatale Immunsystem eine andere Wirkung haben kann, als auf das adulte, wurde auch für seinen Einfluss auf T-Zellen berichtet. Demnach konnte IL-21 bei naiven neonatalen T-Zellen Th1-Antworten fördern, nicht jedoch bei adulten T-Zellen (Doganci et al., 2012).

IL-21 hatte auch auf neonatale moDCs einen von adulten moDCs abweichendem Effekt. Während es im neonatalen Immunsystem die durch IL-27 induzierten Zytokine IL-8, IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF- α hemmte, sezernierten AB moDCs bei der gemeinsamen Gabe von IL-27 und IL-21 mehr IL-8, TNF- α und IL-12p70. Bei adulten moDCs war aber ebenfalls ein inhibierender Effekt auf IL-1 β , IL-6, IL-10 zu beobachten. Einzig IL-12p70 wurde unter dieser Bedingung bei beiden verstärkt exprimiert.

Möglicherweise wirken IL-27 und IL-21 im neonatalen Immunsystem zusammen, um kurzfristig übermäßige Immunreaktionen zu regulieren. Auffällig war jedoch, dass IL-27 nach 48h die durch IL-21 induzierte IL-10-Produktion hemmt. Somit zeigte sich IL-27 wieder in seiner typischen Funktion als Gegenregulator.

4.6 Die Wirkung neonataler DCs auf autologe T-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurden Kokulturen von T-Zellen und neonatalen moDCs, welche mit LPS/IFN γ vorstimuliert wurden durchgeführt. Dabei wurde vermehrt IFN γ nachgewiesen, was für eine Th1-Polarisation der T-Zellen spricht. Dies entsprach den Erwartungen, da bekannt ist, dass die Expression von IL-27 durch die kombinatorische Stimulation mit LPS und IFN γ vermehrt gebildet wird (Krumbiegel et al., 2008). Eine Aufgabe des pleiotropen IL-27 könnte demnach im Neugeborenen-Immunsystem tatsächlich die Induktion von Th1-Immunantworten sein. Dies ist gerade deshalb von großer Bedeutung, da die Produktion des Haupt-Th1-Zytokins IL-12 in neonatalen DCs defizitär ist (Goriely et al., 2001). Unter den gleichen Bedingungen wurde auch weniger IL-10 produziert. Möglicherweise würden also neonatale DCs via IL-27 im Rahmen von Infektionen dafür sorgen, dass eine durch IL-10 gesteuerte Immunregulation abgeschwächt wird, und dadurch Immunantworten auf Pathogene begünstigen.

Pflanz et al. haben beobachtet, dass IL-27 die Proliferation von humanen und murinen naiven CD4⁺ T-Zellen induziert (Pflanz et al., 2002). Im Nabelschnurblut befinden sich größtenteils naive T-Zellen, anhand derer in der vorliegenden Arbeit gezeigt wurde, dass IL-27 die Proliferation neonataler, nicht-polarisierter T-Zellen konzentrationsabhängig begünstigt. Somit wirkt IL-27 bezüglich der Induktion der Proliferation im neonatalen Immunsystem in einer Weise, die mit dem adulten Immunsystem vergleichbar ist.

Im Gegensatz dazu zeigten WSX-1 defiziente DCs aus Mäusen eine verstärkte Neigung zur Proliferation (Yoshida et al., 2001), was auf eine proliferationshemmende Wirkung von IL-27 hinweist. Villarino et al. stellten ebenfalls im Mausmodell fest, dass IL-27 die Produktion von IL-2 hemmt, welches das Wachstum und Überleben von T-Zellen sichert (Villarino et al., 2006). Dies ist ein weiterer Hinweis auf die selbstregulierenden Eigenschaften von IL-27, die im nachfolgenden Kapitel 4.7 ausführlicher besprochen werden.

4.7 Mechanismen zur Selbstrestriktion von IL-27

Die Ergebnisse zeigen, dass IL-27 die Kapazität der DCs zur Induktion von Immunantworten auf Pathogene erhöhen kann. Diese autokrinen Effekte von IL-27 sind jedoch insbesondere in neonatalen moDCs selbst-restriktiv. Ein solcher Mechanismus könnte dazu beitragen, das neonatale Immunsystem vor der Entwicklung zu starker, und somit potenziell schädlicher Immunantworten zu bewahren.

Dieses negativ autokrine Phänomen wurde bereits im Zusammenhang mit IL-27 und Monozyten postuliert. Während IL-27 in der frühen Phase der angeborenen Immunantwort aktivierend auf Monozyten wirkt, werden diese in einer späteren Phase der Immunantwort, wenn sie selbst IL-27 produzieren, unempfindlich gegen das Zytokin (Kalliolias und Ivashkiv, 2008). In Analogie zu den Beobachtungen bei Monozyten konnte die vorliegenden Daten zeigen, dass bei moDCs IL-27 die Expression von WSX-1 herab reguliert, was nach einer gewissen Zeit ebenfalls eine niedrigere Empfindlichkeit der moDCs für das Zytokin zur Folge haben könnte. Darüber hinaus wurde eine Regulation der DC-Funktionen durch WSX-1/ IL-27 Signalgebung nachgewiesen (Wang et al., 2007). Dazu wurde gezeigt, dass in WSX-1-defizienten DCs nach LPS-Stimulation die Expression der Kostimulatoren CD80 und CD86 im Vergleich zum Wildtyp erhöht war. Hingegen wurde in den nicht mit LPS stimulierten Kontroll-DCs von Wildtyp-Mäusen mehr kostimulatorische Moleküle exprimiert, als in den DCs der Knockout-Mäuse. Bei neonatalen DCs wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit ebenfalls festgestellt, dass IL-27 einen positiven Einfluss auf die Produktion kostimulatorischer Moleküle hat. Jedoch hatte in Vollblut-Analysen von mDCs IL-27 keinen hemmenden Einfluss auf die LPS-induzierte CD80/CD86-Expression. Ob eine zeitlich vor der LPS-Stimulation stattfindende IL-27-Stimulation eine Hemmung zur Folge hätte, müsste jedoch noch untersucht werden. IL-27 wirkte in neonatalen mDCs und pDCs sogar der durch PolyIC gehemmten Expression von CD80 entgegen und förderte dessen Expression. Die Effekte von PolyIC auf den Kostimulator CD40 wurden in mDCs und pDCs jedoch durch IL-27 gedämpft. Diese Beobachtungen deuten daraufhin, dass IL-27 für eine Verbesserung der kostimulatorischen DC-Eigenschaften sorgt, während die induzierenden oder inhibierenden Effekte von TLR-Liganden wie LPS und PolyIC im Beisein von IL-27 balanciert werden können.

Bezüglich der DC-Antigenpräsentationskapazität hatte IL-27 zum einen, wie oben beschrieben, einen positiven Einfluss, indem HLA-DM verstärkt exprimiert wurde. Zum anderen jedoch konnte in diesem Zusammenhang ein weiterer Aspekt der Selbstrestriktion von IL-27 beobachtet werden. So wurde in neonatalen moDCs ebenfalls unter dem Einfluss von IL-27 ein negativer Regulator von HLA-DM, HLA-DO (van Ham et al., 1997), ebenfalls stärker exprimiert.

Auch im Rahmen der Effekte von IL-27 auf Chemokine ließen sich selbstregulierende Aspekte beobachten. Ein untersuchter Ligand des durch IL-27 induzierten Chemokin-Rezeptors CCR1 ist CCL23. Dieses Chemokin wird konstitutiv von moDCs exprimiert und seine Expression kann durch CD40-Ligation und IFN γ -Behandlung (Nardelli et al., 1999a), also letztlich im Rahmen von Infektionen, gehemmt werden. In neonatalen moDCs wurde CCL23 deutlich weniger exprimiert, als in adulten. IL-27 wirkte sowohl bei neonatalen, als auch bei adulten moDCs inhibitorisch auf die Expression von CCL23. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass

die chemotaktische Wirkung von CCL23 auf moDCs, ruhende T-Zellen und auf Monozyten (Patel et al., 1997) durch die erhöhte IL-27-Expression eingeschränkt werden.

IL-27 wurde zunächst als Zytokin beschrieben, welches eine Th1-Antwort fördert und Th2-Antworten hemmt. Jedoch konnte in IL-27ra^{-/-} Mäusen die Funktion von IL-27 als Regulator inflammatorischer Reaktionen im Rahmen von Th1-Antworten auf Infektionen nachgewiesen werden (Villarino et al., 2003; Findlay et al., 2010; Freitas do Rosario et al., 2012; Villegas-Mendez et al., 2013). Des Weiteren wurde berichtet, dass IL-27 Tbet⁺ CXCR3⁺ regulatorische T-Zellen induziert (Hall et al., 2012). IL-27 könnte also auf diesem Wege pathologischen Effekten von Th1-Immunantworten entgegen wirken. Kürzlich wurde eine bedeutende Rolle der IL-27/ WSX-1-Signalgebung bezüglich der Regulation T-zellulärer Chemotaxis beschrieben. Im Rahmen einer Infektion kann IL-27/ WSX-1 auf CD4⁺ T-Zellen die Expression von CCR1 inhibieren, während wie oben erwähnt dessen Expression in DCs durch IL-27 erhöht wurde. Dies zeigt, wie die pleiotropen Effekte von IL-27 einer zu starken Aktivierung von Immunreaktionen entgegenwirken (Gwyer Findlay et al., 2013).

IL-27 hat zudem eine regulatorische Funktion bezüglich Th17-Immunantworten. Es induziert bei naiven T-Zellen PD-L1 über eine STAT1 Signalkaskade, wodurch diese in der Lage sind, eine Th17-Differenzierung von *Bystander* T-Zellen zu inhibieren (Hirahara et al., 2012).

4.8 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, welche zentrale Bedeutung IL-27 im neonatalen Immunsystem hat (Abbildung 4.1).

So werden unter dem Einfluss von IL-27 nicht nur Chemokine und inflammatorische Zytokine induziert, sondern auch Gene, die an der Antigenpräsentation und antiviralen Immunabwehr beteiligt sind.

Die Arbeit bietet deshalb eine Grundlage für weiterführende Untersuchungen der antiviralen Eigenschaften von IL-27 im humanen neonatalen Immunsystem. Hierbei ist es wichtig zu untersuchen, inwiefern durch DCs verstärkt produziertes IL-27 sich z.B. auf die Entwicklung und Funktion neonataler CD8⁺-T-Zellen auswirkt, da diese Population an antiviralen Immunantworten beteiligt ist.

Da IL-27 bei neonatalen DCs zu einer verstärkten Produktion von CXCL10 führt, sollte darüber hinaus noch die Expression von dessen Rezeptor CXCR3 durch andere neonatale Immunzellen, insbesondere T-Zellen, untersucht werden, um beurteilen zu können, in wie weit die gesteigerte Chemokin-Produktion Immunreaktionen beeinflussen kann.

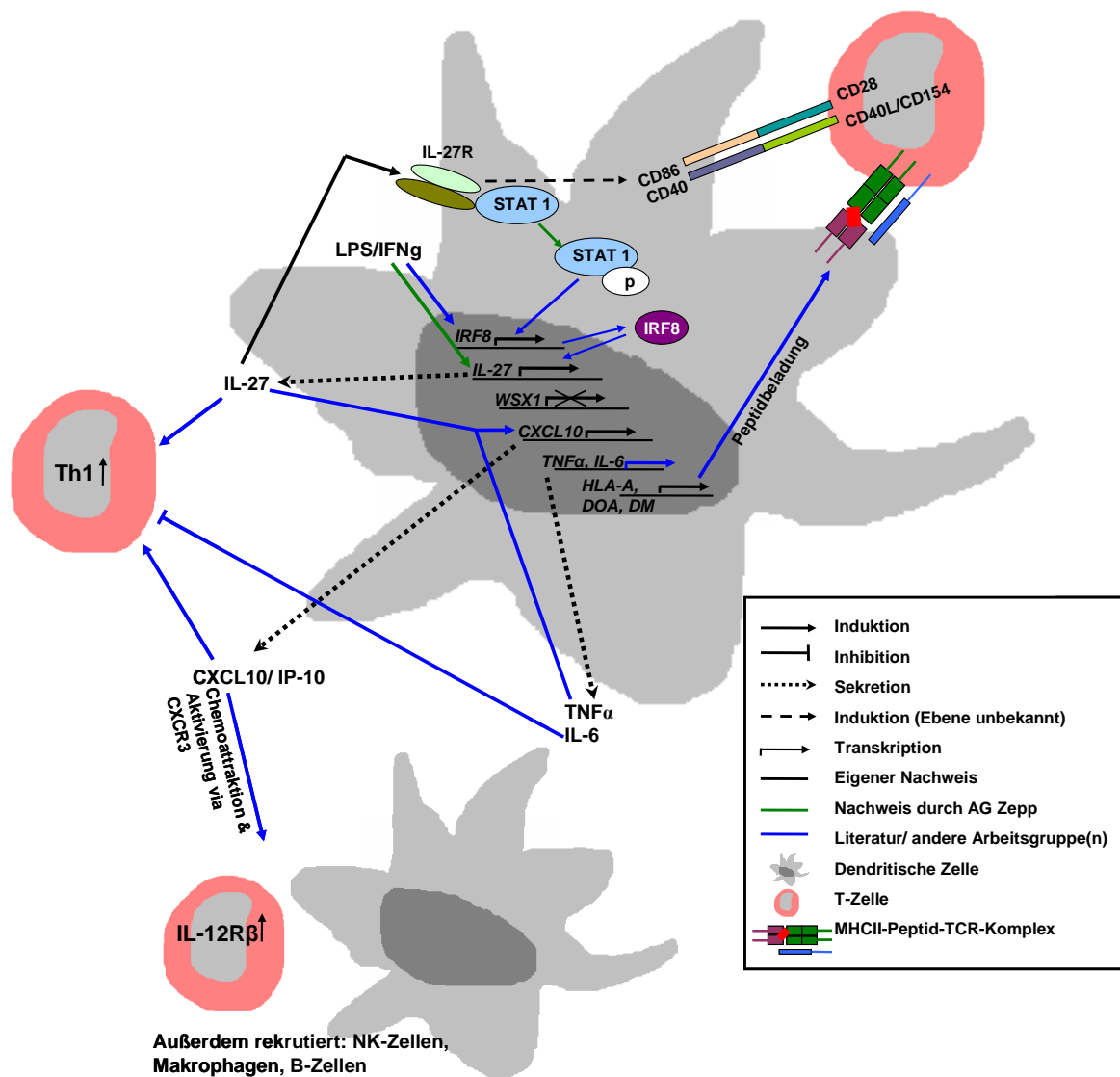


Abbildung 4.1: Schematischer Überblick über den Einfluss von IL-27 auf das neonatale Immunsystem.

Dass IL-27 jedoch trotz dieser weitreichenden Effekte auch selbstrestriktive Eigenschaften aufweist, könnte es zu einem Kandidaten für eine balancierte Modifikation von neonatalen Immunantworten ausweisen. Dabei ist es von Bedeutung weiterhin zu untersuchen, ob IL-27 auch bei anderen neonatalen Immunzellen, z.B. T-Zellen selbstrestriktiv wirkt. Dabei sollte der Einfluss von IL-27 auf die Expression des IL-27-Rezeptors und auch auf die Expression von Zytokinen überprüft werden.

5 Zusammenfassung

Neugeborene befinden sich bis zum Zeitpunkt der Geburt in der sterilen Umgebung des Uterus. Sie begegnen während des Geburtsvorgangs und vor allem nach der Geburt einer Vielzahl von Mikroorganismen, wie Bakterien und Pilzen, wodurch nach und nach eine Besiedelung ihrer Haut und Schleimhäute stattfindet. In diesem Kontext muss jedoch verhindert werden, dass es zu schädliche Überreaktionen gegen die Vielzahl an neuen Antigenen kommt. Die in der Kindheit erhöhte Infektionsanfälligkeit stellt somit eine essentielle Adaptation des neonatalen Immunsystems an die Herausforderungen der ersten Lebensphase dar.

Dennoch wird das neonatale Immunsystem häufig als unreif bezeichnet, da insbesondere Th1-Antworten weniger stark ausfallen, als bei Erwachsenen.

Ein messbares Äquivalent für diesen neonatalen „Th1-Mangel“ stellt die nahezu komplett ausfallende Expression des Th1-Zytokins IL-12 dar. Möglicherweise im Sinne einer Teilkompensation für das ausgefallene IL-12 wird das als Th1-Zytokin geltende IL-27 von neonatalen DCs verstärkt gebildet, und dies bereits im unstimulierten Zustand der Zellen. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung des Einflusses von IL-27 auf die Kapazität der DCs, angeborene und adaptive Immunantworten zu modulieren. Da DCs den Rezeptor für IL-27 auch auf ihrer eigenen Oberfläche tragen, lag der Schwerpunkt der Untersuchungen auf den primären und sekundären autokrinen Wirkungen des IL-27.

Hierbei wurde beobachtet, dass im Vergleich zu adulten DCs bei neonatalen DCs stärkere durch IL-27 ausgelöste autokrine Effekte auftraten. Die primäre autokrine Wirkung zeigte sich darin, dass IL-27 seine eigene Produktion, sowohl auf der Transkriptions- als auch auf der Proteinebene, anregte. Auf der Proteinebene fielen diese Effekte bei Neonaten stärker aus, als bei Adulten.

Darüber hinaus konnten sekundäre autokrine Effekte von IL-27 nachgewiesen werden. Eine Gabe von IL-27 induzierte zum einen die Erhöhung der proinflammatorischen Zytokine IL-8, IL-6 und TNF- α , wobei wiederum der beobachtete Effekt in DCs von Neugeborenen stärker war. Zum anderen wurde im Vergleich zwischen Neonaten und Adulten insbesondere bei neonatalen DCs die Expression der Chemokine CXCL10, CCL7 und CCL8 gefördert, die in der Lage sind, weitere Immunzellen, u.a. aktivierte T-Zellen zu rekrutieren. Auch die Produktion kostimulatorischer Moleküle wurde durch IL-27 angeregt, bei neonatalen wie adulten moDCs.

Zudem konnte gezeigt werden, dass IL-27 durch die Induktion der antiviralen Gene IFIT1, IFIT2, IFIT3 und IFITM2 bei Neonaten sowie IFITM1 bei Neonaten und Adulten

Immunantworten gegen Viren unterstützen könnte. Auch die erhöhte Expression der Transkriptionsfaktoren IRF7 und IRF8 ist in diesem Kontext von Bedeutung. Dabei kam der Einfluss von IL-27 bei neonatalen DCs stärker als bei adulten DCs zum Tragen.

Neonatale DCs sind demnach nicht nur dazu in der Lage, größere Mengen an IL-27 zu bilden, sie können darüber hinaus in vielfältiger Weise auf das Zytokin reagieren, was eine zentrale Rolle von IL-27 im Immungeschehen Neugeborener verdeutlicht.

6 Literaturverzeichnis

Adkins, B. (2000) 'Development of neonatal Th1/Th2 function', *Int Rev Immunol* 19(2-3): 157-71.

Akira, S. und Takeda, K. (2004) 'Toll-like receptor signalling', *Nat Rev Immunol* 4(7): 499-511.

Arancibia, S. A., Beltran, C. J., Aguirre, I. M., Silva, P., Peralta, A. L., Malinarich, F. und Hermoso, M. A. (2007) 'Toll-like receptors are key participants in innate immune responses', *Biol Res* 40(2): 97-112.

Artis, D., Villarino, A., Silverman, M., He, W., Thornton, E. M., Mu, S., Summer, S., Covey, T. M., Huang, E., Yoshida, H. et al. (2004) 'The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity', *J Immunol* 173(9): 5626-34.

Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J. P., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R. A., Kuchroo, V. K., Oukka, M. und Weiner, H. L. (2007) 'A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells', *Nature Immunology* 8(12): 1380-9.

Baggiolini, M. und Clark-Lewis, I. (1992) 'Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine', *FEBS Lett* 307(1): 97-101.

Banchereau, J., Pascual, V. und O'Garra, A. (2012) 'From IL-2 to IL-37: the expanding spectrum of anti-inflammatory cytokines', *Nature Immunology* 13(10): 925-31.

Banchereau, J. und Steinman, R. M. (1998) 'Dendritic cells and the control of immunity', *Nature* 392(6673): 245-52.

Bao, M. und Liu, Y. J. (2013) 'Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells', *Protein Cell* 4(1): 40-52.

Barrios, C., Brawand, P., Berney, M., Brandt, C., Lambert, P. H. und Siegrist, C. A. (1996) 'Neonatal and early life immune responses to various forms of vaccine antigens qualitatively differ from adult responses: predominance of a Th2-biased pattern which persists after adult boosting', *Eur J Immunol* 26(7): 1489-96.

Batten, M. und Ghilardi, N. (2007) 'The biology and therapeutic potential of interleukin 27', *J Mol Med (Berl)* 85(7): 661-72.

Batten, M., Kljavin, N. M., Li, J., Walter, M. J., de Sauvage, F. J. und Ghilardi, N. (2008) 'Cutting edge: IL-27 is a potent inducer of IL-10 but not FoxP3 in murine T cells', *J Immunol* 180(5): 2752-6.

Batten, M., Li, J., Yi, S., Kljavin, N. M., Danilenko, D. M., Lucas, S., Lee, J., de Sauvage, F. J. und Ghilardi, N. (2006) 'Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells', *Nature Immunology* 7(9): 929-36.

Bender, H., Wiesinger, M. Y., Nordhoff, C., Schoenherr, C., Haan, C., Ludwig, S., Weiskirchen, R., Kato, N., Heinrich, P. C. und Haan, S. (2009) 'Interleukin-27 displays interferon-gamma-like functions in human hepatoma cells and hepatocytes', *Hepatology* 50(2): 585-91.

Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T. B., Oukka, M., Weiner, H. L. und Kuchroo, V. K. (2006) 'Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells', *Nature* 441(7090): 235-8.

Bradley, J. R. (2008) 'TNF-mediated inflammatory disease', *J Pathol* 214(2): 149-60.

Brass, A. L., Huang, I. C., Benita, Y., John, S. P., Krishnan, M. N., Feeley, E. M., Ryan, B. J., Weyer, J. L., van der Weyden, L., Fikrig, E. et al. (2009) 'The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus', *Cell* 139(7): 1243-54.

Burke-Gaffney, A., Brooks, A. V. und Bogle, R. G. (2002) 'Regulation of chemokine expression in atherosclerosis', *Vascul Pharmacol* 38(5): 283-92.

Busch, R., Rinderknecht, C. H., Roh, S., Lee, A. W., Harding, J. J., Burster, T., Hornell, T. M. und Mellins, E. D. (2005) 'Achieving stability through editing and chaperoning: regulation of MHC class II peptide binding and expression', *Immunol Rev* 207: 242-60.

Canaday, D. H., Chakravarti, S., Srivastava, T., Tisch, D. J., Cheruvu, V. K., Smialek, J., Harding, C. V. und Ramachandra, L. (2006) 'Class II MHC antigen presentation defect in neonatal monocytes is not correlated with decreased MHC-II expression', *Cell Immunol* 243(2): 96-106.

Cella, M., Sallusto, F. und Lanzavecchia, A. (1997) 'Origin, maturation and antigen presenting function of dendritic cells', *Curr Opin Immunol* 9(1): 10-6.

Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. und Alber, G. (1996) 'Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation', *J Exp Med* 184(2): 747-52.

Chan, S. H., Perussia, B., Gupta, J. W., Kobayashi, M., Pospisil, M., Young, H. A., Wolf, S. F., Young, D., Clark, S. C. und Trinchieri, G. (1991) 'Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers', *J Exp Med* 173(4): 869-79.

Chen, C., Gault, A., Shen, L. und Nabavi, N. (1994) 'Molecular cloning and expression of early T cell costimulatory molecule-1 and its characterization as B7-2 molecule', *J Immunol* 152(10): 4929-36.

Chen, Q., Ghilardi, N., Wang, H., Baker, T., Xie, M. H., Gurney, A., Grewal, I. S. und de Sauvage, F. J. (2000) 'Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR', *Nature* 407(6806): 916-20.

Contursi, C., Wang, I. M., Gabriele, L., Gadina, M., O'Shea, J., Morse, H. C., 3rd und Ozato, K. (2000) 'IFN consensus sequence binding protein potentiates STAT1-dependent activation of IFN γ -responsive promoters in macrophages', *Proc Natl Acad Sci U S A* 97(1): 91-6.

Cuenca, A. G., Wynn, J. L., Moldawer, L. L. und Levy, O. (2013) 'Role of innate immunity in neonatal infection', *Am J Perinatol* 30(2): 105-12.

Dauer, M., Obermaier, B., Hertel, J., Haerle, C., Pohl, K., Rothenfusser, S., Schnurr, M., Endres, S. und Eigler, A. (2003) 'Mature dendritic cells derived from human monocytes within 48 hours: a novel strategy for dendritic cell differentiation from blood precursors', *J Immunol* 170(8): 4069-76.

de Groot, R., van Beelen, A. J., Bakdash, G., Taanman-Kueter, E. W., de Jong, E. C. und Kapsenberg, M. L. (2012) 'Viral dsRNA-activated human dendritic cells produce IL-27, which selectively promotes cytotoxicity in naive CD8 $^+$ T cells', *J Leukoc Biol*.

de la Rosa, G., Longo, N., Rodriguez-Fernandez, J. L., Puig-Kroger, A., Pineda, A., Corbi, A. L. und Sanchez-Mateos, P. (2003) 'Migration of human blood dendritic cells across endothelial cell monolayers: adhesion molecules and chemokines involved in subset-specific transmigration', *J Leukoc Biol* 73(5): 639-49.

Dealtry, G. B., O'Farrell, M. K. und Fernandez, N. (2000) 'The Th2 cytokine environment of the placenta', *Int Arch Allergy Immunol* 123(2): 107-19.

Delespesse, G., Yang, L. P., Ohshima, Y., Demeure, C., Shu, U., Byun, D. G. und Sarfati, M. (1998) 'Maturation of human neonatal CD4 $^+$ and CD8 $^+$ T lymphocytes into Th1/Th2 effectors', *Vaccine* 16(14-15): 1415-9.

Diamond, M. S. und Farzan, M. (2013) 'The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins', *Nat Rev Immunol* 13(1): 46-57.

Dinarello, C. A. (1996) 'Biologic basis for interleukin-1 in disease', *Blood* 87(6): 2095-147.

Doganci, A., Birkholz, J., Gehring, S., Puhl, A. G., Zepp, F. und Meyer, C. U. (2012) 'In the presence of IL-21 human cord blood T cells differentiate to IL-10 producing Th1 but not Th17 or Th2 cells', *Int Immunol*.

- Elser, B., Lohoff, M., Kock, S., Giaisi, M., Kirchhoff, S., Krammer, P. H. und Li-Weber, M. (2002) 'IFN-gamma represses IL-4 expression via IRF-1 and IRF-2', *Immunity* 17(6): 703-12.
- Fensterl, V. und Sen, G. C. (2011) 'The ISG56/IFIT1 gene family', *J Interferon Cytokine Res* 31(1): 71-8.
- Fernandez, E. J. und Lolis, E. (2002) 'Structure, function, and inhibition of chemokines', *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42: 469-99.
- Findlay, E. G., Greig, R., Stumhofer, J. S., Hafalla, J. C., de Souza, J. B., Saris, C. J., Hunter, C. A., Riley, E. M. und Couper, K. N. (2010) 'Essential role for IL-27 receptor signaling in prevention of Th1-mediated immunopathology during malaria infection', *J Immunol* 185(4): 2482-92.
- Freitas do Rosario, A. P., Lamb, T., Spence, P., Stephens, R., Lang, A., Roers, A., Muller, W., O'Garra, A. und Langhorne, J. (2012) 'IL-27 promotes IL-10 production by effector Th1 CD4+ T cells: a critical mechanism for protection from severe immunopathology during malaria infection', *J Immunol* 188(3): 1178-90.
- Fujiwara, S., Nagai, H., Oniki, S., Yoshimoto, T. und Nishigori, C. (2012) 'Interleukin (IL)-17 versus IL-27: opposite effects on tumor necrosis factor-alpha-mediated chemokine production in human keratinocytes', *Exp Dermatol* 21(1): 70-2.
- Giese, N. A., Gabriele, L., Doherty, T. M., Klinman, D. M., Tadesse-Heath, L., Contursi, C., Epstein, S. L. und Morse, H. C., 3rd (1997) 'Interferon (IFN) consensus sequence-binding protein, a transcription factor of the IFN regulatory factor family, regulates immune responses in vivo through control of interleukin 12 expression', *J Exp Med* 186(9): 1535-46.
- Gold, M. C., Robinson, T. L., Cook, M. S., Byrd, L. K., Ehlinger, H. D., Lewinsohn, D. M. und Lewinsohn, D. A. (2007) 'Human neonatal dendritic cells are competent in MHC class I antigen processing and presentation', *PLoS One* 2(9): e957.
- Gong, X., Gong, W., Kuhns, D. B., Ben-Baruch, A., Howard, O. M. und Wang, J. M. (1997) 'Monocyte chemotactic protein-2 (MCP-2) uses CCR1 and CCR2B as its functional receptors', *J Biol Chem* 272(18): 11682-5.
- Goriely, S., Van Lint, C., Dadkhah, R., Libin, M., De Wit, D., Demonte, D., Willems, F. und Goldman, M. (2004) 'A defect in nucleosome remodeling prevents IL-12(p35) gene transcription in neonatal dendritic cells', *J Exp Med* 199(7): 1011-6.
- Goriely, S., Vincart, B., Stordeur, P., Vekemans, J., Willems, F., Goldman, M. und De Wit, D. (2001) 'Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes', *J Immunol* 166(3): 2141-6.
- Guermontprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. und Amigorena, S. (2002) 'Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells', *Annu Rev Immunol* 20: 621-67.

Guo, J., Peters, K. L. und Sen, G. C. (2000) 'Induction of the human protein P56 by interferon, double-stranded RNA, or virus infection', *Virology* 267(2): 209-19.

Guzzo, C., Ayer, A., Basta, S., Banfield, B. W. und Gee, K. (2012a) 'IL-27 enhances LPS-induced proinflammatory cytokine production via upregulation of TLR4 expression and signaling in human monocytes', *J Immunol* 188(2): 864-73.

Guzzo, C., Che Mat, N. F. und Gee, K. (2010) 'Interleukin-27 induces a STAT1/3- and NF-kappaB-dependent proinflammatory cytokine profile in human monocytes', *J Biol Chem* 285(32): 24404-11.

Guzzo, C., Hopman, W. M., Che Mat, N. F., Wobeser, W. und Gee, K. (2012b) 'IL-27-Induced Gene Expression Is Downregulated in HIV-Infected Subjects', *PLoS One* 7(9): e45706.

Gwyer Findlay, E., Villegas-Mendez, A., de Souza, J. B., Inkson, C. A., Shaw, T. N., Saris, C. J., Hunter, C. A., Riley, E. M. und Couper, K. N. (2013) 'IL-27 Receptor Signaling Regulates CD4+ T Cell Chemotactic Responses during Infection', *J Immunol*.

Hall, A. O., Beiting, D. P., Tato, C., John, B., Oldenhove, G., Lombana, C. G., Pritchard, G. H., Silver, J. S., Bouladoux, N., Stumhofer, J. S. et al. (2012) 'The Cytokines Interleukin 27 and Interferon-gamma Promote Distinct Treg Cell Populations Required to Limit Infection-Induced Pathology', *Immunity* 37(3): 511-23.

Harada, A., Sekido, N., Akahoshi, T., Wada, T., Mukaida, N. und Matsushima, K. (1994) 'Essential involvement of interleukin-8 (IL-8) in acute inflammation', *J Leukoc Biol* 56(5): 559-64.

Harris, D. T., Schumacher, M. J., Locascio, J., Besencon, F. J., Olson, G. B., DeLuca, D., Shenker, L., Bard, J. und Boyse, E. A. (1992) 'Phenotypic and functional immaturity of human umbilical cord blood T lymphocytes', *Proc Natl Acad Sci U S A* 89(21): 10006-10.

Hiasa, M., Abe, M., Nakano, A., Oda, A., Amou, H., Kido, S., Takeuchi, K., Kagawa, K., Yata, K., Hashimoto, T. et al. (2009) 'GM-CSF and IL-4 induce dendritic cell differentiation and disrupt osteoclastogenesis through M-CSF receptor shedding by up-regulation of TNF-alpha converting enzyme (TACE)', *Blood* 114(20): 4517-26.

Hibbert, L., Pflanz, S., De Waal Malefyt, R. und Kastelein, R. A. (2003) 'IL-27 and IFN-alpha signal via Stat1 and Stat3 and induce T-Bet and IL-12Rbeta2 in naive T cells', *J Interferon Cytokine Res* 23(9): 513-22.

Hirahara, K., Ghoreschi, K., Yang, X. P., Takahashi, H., Laurence, A., Vahedi, G., Sciume, G., Hall, A. O., Dupont, C. D., Francisco, L. M. et al. (2012) 'Interleukin-27 priming of T cells controls IL-17 production in trans via induction of the ligand PD-L1', *Immunity* 36(6): 1017-30.

Honda, K. und Taniguchi, T. (2006) 'IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors', *Nat Rev Immunol* 6(9): 644-58.

Honda, K., Yanai, H., Negishi, H., Asagiri, M., Sato, M., Mizutani, T., Shimada, N., Ohba, Y., Takaoka, A., Yoshida, N. et al. (2005) 'IRF-7 is the master regulator of type-I interferon-dependent immune responses', *Nature* 434(7034): 772-7.

Iparraguirre, A., Tobias, J. W., Hensley, S. E., Masek, K. S., Cavanagh, L. L., Rendl, M., Hunter, C. A., Ertl, H. C., von Andrian, U. H. und Weninger, W. (2008) 'Two distinct activation states of plasmacytoid dendritic cells induced by influenza virus and CpG 1826 oligonucleotide', *J Leukoc Biol* 83(3): 610-20.

Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M. und Shlomchik, M. (2002) *Immunologie*, Heidelberg: Spektrum, Akademischer Verlag.

Jankowski, M., Kopinski, P. und Goc, A. (2010) 'Interleukin-27: biological properties and clinical application', *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 58(6): 417-25.

Jansen, K., Blimkie, D., Furlong, J., Hajjar, A., Rein-Weston, A., Crabtree, J., Reikie, B., Wilson, C. und Kollmann, T. (2008) 'Polychromatic flow cytometric high-throughput assay to analyze the innate immune response to Toll-like receptor stimulation', *J Immunol Methods* 336(2): 183-92.

Jones, L. L. und Vignali, D. A. (2011) 'Molecular interactions within the IL-6/IL-12 cytokine/receptor superfamily', *Immunol Res* 51(1): 5-14.

Jones, S. A. (2005) 'Directing transition from innate to acquired immunity: defining a role for IL-6', *J Immunol* 175(6): 3463-8.

June, C. H., Bluestone, J. A., Nadler, L. M. und Thompson, C. B. (1994) 'The B7 and CD28 receptor families', *Immunol Today* 15(7): 321-31.

Kallioli, G. D. und Ivashkiv, L. B. (2008) 'IL-27 activates human monocytes via STAT1 and suppresses IL-10 production but the inflammatory functions of IL-27 are abrogated by TLRs and p38', *J Immunol* 180(9): 6325-33.

Kanda, N., Shimizu, T., Tada, Y. und Watanabe, S. (2007) 'IL-18 enhances IFN-gamma-induced production of CXCL9, CXCL10, and CXCL11 in human keratinocytes', *Eur J Immunol* 37(2): 338-50.

Kollmann, T. R., Levy, O., Montgomery, R. R. und Goriely, S. (2012) 'Innate immune function by Toll-like receptors: distinct responses in newborns and the elderly', *Immunity* 37(5): 771-83.

Kraft, J. D., Horzempa, J., Davis, C., Jung, J. Y., Pena, M. M. und Robinson, C. M. (2013) 'Neonatal macrophages express elevated levels of interleukin-27 that oppose immune responses', *Immunology*.

Kropshofer, H., Hammerling, G. J. und Vogt, A. B. (1999) 'The impact of the non-classical MHC proteins HLA-DM and HLA-DO on loading of MHC class II molecules', *Immunol Rev* 172: 267-78.

Kropshofer, H., Vogt, A. B., They, C., Armandola, E. A., Li, B. C., Moldenhauer, G., Amigorena, S. und Hammerling, G. J. (1998) 'A role for HLA-DO as a co-chaperone of HLA-DM in peptide loading of MHC class II molecules', *EMBO J* 17(11): 2971-81.

Krumbiegel, D., Anthogalidis-Voss, C., Markus, H., Zepp, F. und Meyer, C. U. (2008) 'Enhanced expression of IL-27 mRNA in human newborns', *Pediatr Allergy Immunol* 19(6): 513-6.

Krumbiegel, D., Zepp, F. und Meyer, C. U. (2007) 'Combined Toll-like receptor agonists synergistically increase production of inflammatory cytokines in human neonatal dendritic cells', *Hum Immunol* 68(10): 813-22.

Langerhans, P. (1868) 'Über die Nerven der menschlichen Haut', *Archiv für pathologische Anatomie und Physiologie und für klinische Medizin* 44(2-3): pp 325-337

Langrish, C. L., Buddle, J. C., Thrasher, A. J. und Goldblatt, D. (2002) 'Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses', *Clin Exp Immunol* 128(1): 118-23.

Larsen, C. G., Anderson, A. O., Appella, E., Oppenheim, J. J. und Matsushima, K. (1989) 'The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T lymphocytes', *Science* 243(4897): 1464-6.

Levy, O. (2007) 'Innate immunity of the newborn: basic mechanisms and clinical correlates', *Nat Rev Immunol* 7(5): 379-90.

Li, M. O. und Flavell, R. A. (2008) 'Contextual regulation of inflammation: a duet by transforming growth factor-beta and interleukin-10', *Immunity* 28(4): 468-76.

Liu, M., Guo, S., Hibbert, J. M., Jain, V., Singh, N., Wilson, N. O. und Stiles, J. K. (2011) 'CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications', *Cytokine Growth Factor Rev* 22(3): 121-30.

Loetscher, M., Gerber, B., Loetscher, P., Jones, S. A., Piali, L., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. und Moser, B. (1996) 'Chemokine receptor specific for IP10 and mig: structure, function, and expression in activated T-lymphocytes', *J Exp Med* 184(3): 963-9.

Loetscher, M., Loetscher, P., Brass, N., Meese, E. und Moser, B. (1998) 'Lymphocyte-specific chemokine receptor CXCR3: regulation, chemokine binding and gene localization', *Eur J Immunol* 28(11): 3696-705.

Loetscher, P., Seitz, M., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M. und Moser, B. (1994) 'Monocyte chemotactic proteins MCP-1, MCP-2, and MCP-3 are major attractants for human CD4+ and CD8+ T lymphocytes', *FASEB J* 8(13): 1055-60.

Lucas, S., Ghilardi, N., Li, J. und de Sauvage, F. J. (2003) 'IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms', *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(25): 15047-52.

- Marodi, L. (2006) 'Innate cellular immune responses in newborns', *Clin Immunol* 118(2-3): 137-44.
- Marquis, J. F., Kapoustina, O., Langlais, D., Ruddy, R., Dufour, C. R., Kim, B. H., MacMicking, J. D., Giguere, V. und Gros, P. (2011) 'Interferon regulatory factor 8 regulates pathways for antigen presentation in myeloid cells and during tuberculosis', *PLoS Genet* 7(6): e1002097.
- Marsh, S. G., Albert, E. D., Bodmer, W. F., Bontrop, R. E., Dupont, B., Erlich, H. A., Geraghty, D. E., Hansen, J. A., Hurley, C. K., Mach, B. et al. (2005) 'Nomenclature for Factors of the HLA System, 2004', *Hum Immunol* 66(5): 571-636.
- Matta, B. M., Raimondi, G., Rosborough, B. R., Sumpter, T. L. und Thomson, A. W. (2012) 'IL-27 production and STAT3-dependent upregulation of B7-H1 mediate immune regulatory functions of liver plasmacytoid dendritic cells', *J Immunol* 188(11): 5227-37.
- McKenna, K., Beignon, A. S. und Bhardwaj, N. (2005) 'Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity', *J Virol* 79(1): 17-27.
- McLoughlin, R. M., Jenkins, B. J., Grail, D., Williams, A. S., Fielding, C. A., Parker, C. R., Ernst, M., Topley, N. und Jones, S. A. (2005) 'IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation', *Proc Natl Acad Sci U S A* 102(27): 9589-94.
- Mor, G. und Cardenas, I. (2010) 'The immune system in pregnancy: a unique complexity', *Am J Reprod Immunol* 63(6): 425-33.
- Mullis, K., Faloona, F., Scharf, S., Saiki, R., Horn, G. und Erlich, H. (1986) 'Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction', *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 51 Pt 1: 263-73.
- Murugaiyan, G., Beynon, V., Pires Da Cunha, A., Joller, N. und Weiner, H. L. (2012) 'IFN-gamma limits Th9-mediated autoimmune inflammation through dendritic cell modulation of IL-27', *J Immunol* 189(11): 5277-83.
- Naderi, N., Pourfathollah, A. A., Alimoghaddam, K. und Moazzeni, S. M. (2009) 'Cord blood dendritic cells prevent the differentiation of naive T-helper cells towards Th1 irrespective of their subtype', *Clin Exp Med* 9(1): 29-36.
- Nardelli, B., Morahan, D. K., Bong, G. W., Semenuk, M. A., Kreider, B. L. und Garotta, G. (1999a) 'Dendritic cells and MPIF-1: chemotactic activity and inhibition of endogenous chemokine production by IFN-gamma and CD40 ligation', *J Leukoc Biol* 65(6): 822-8.
- Nardelli, B., Tiffany, H. L., Bong, G. W., Yourey, P. A., Morahan, D. K., Li, Y., Murphy, P. M. und Alderson, R. F. (1999b) 'Characterization of the signal transduction pathway activated in human monocytes and dendritic cells by MPIF-1, a specific ligand for CC chemokine receptor 1', *J Immunol* 162(1): 435-44.

Ng, P. C., Li, K., Chui, K. M., Leung, T. F., Wong, R. P., Chu, W. C., Wong, E. und Fok, T. F. (2007) 'IP-10 is an early diagnostic marker for identification of late-onset bacterial infection in preterm infants', *Pediatr Res* 61(1): 93-8.

Owaki, T., Asakawa, M., Morishima, N., Hata, K., Fukai, F., Matsui, M., Mizuguchi, J. und Yoshimoto, T. (2005) 'A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation', *J Immunol* 175(4): 2191-200.

Parish, C. R. (1999) 'Fluorescent dyes for lymphocyte migration and proliferation studies', *Immunol Cell Biol* 77(6): 499-508.

Parrish-Novak, J., Dillon, S. R., Nelson, A., Hammond, A., Sprecher, C., Gross, J. A., Johnston, J., Madden, K., Xu, W., West, J. et al. (2000) 'Interleukin 21 and its receptor are involved in NK cell expansion and regulation of lymphocyte function', *Nature* 408(6808): 57-63.

Patel, V. P., Kreider, B. L., Li, Y., Li, H., Leung, K., Salcedo, T., Nardelli, B., Pippalla, V., Gentz, S., Thotakura, R. et al. (1997) 'Molecular and functional characterization of two novel human C-C chemokines as inhibitors of two distinct classes of myeloid progenitors', *J Exp Med* 185(7): 1163-72.

Peach, R. J., Bajorath, J., Naemura, J., Leytze, G., Greene, J., Aruffo, A. und Linsley, P. S. (1995) 'Both extracellular immunoglobulin-like domains of CD80 contain residues critical for binding T cell surface receptors CTLA-4 and CD28', *J Biol Chem* 270(36): 21181-7.

Perona-Wright, G., Kohlmeier, J. E., Bassity, E., Freitas, T. C., Mohrs, K., Cookenham, T., Situ, H., Pearce, E. J., Woodland, D. L. und Mohrs, M. (2012) 'Persistent loss of IL-27 responsiveness in CD8+ memory T cells abrogates IL-10 expression in a recall response', *Proc Natl Acad Sci U S A* 109(45): 18535-40.

Peters, J. H., Gieseler, R., Thiele, B. und Steinbach, F. (1996) 'Dendritic cells: from ontogenetic orphans to myelomonocytic descendants', *Immunol Today* 17(6): 273-8.

Pflanz, S., Hibbert, L., Mattson, J., Rosales, R., Vaisberg, E., Bazan, J. F., Phillips, J. H., McClanahan, T. K., de Waal Malefyt, R. und Kastelein, R. A. (2004) 'WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27', *J Immunol* 172(4): 2225-31.

Pflanz, S., Timans, J. C., Cheung, J., Rosales, R., Kanzler, H., Gilbert, J., Hibbert, L., Churakova, T., Travis, M., Vaisberg, E. et al. (2002) 'IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells', *Immunity* 16(6): 779-90.

Pot, C., Jin, H., Awasthi, A., Liu, S. M., Lai, C. Y., Madan, R., Sharpe, A. H., Karp, C. L., Miaw, S. C., Ho, I. C. et al. (2009) 'Cutting edge: IL-27 induces the transcription factor c-Maf, cytokine IL-21, and the costimulatory receptor ICOS that coordinately act together to promote differentiation of IL-10-producing Tr1 cells', *J Immunol* 183(2): 797-801.

Puhlmann, M., Weinreich, D. M., Farma, J. M., Carroll, N. M., Turner, E. M. und Alexander, H. R., Jr. (2005) 'Interleukin-1beta induced vascular permeability is dependent on induction of endothelial tissue factor (TF) activity', *J Transl Med* 3: 37.

Raghupathy, R., Al-Azemi, M. und Azizieh, F. (2012) 'Intrauterine growth restriction: cytokine profiles of trophoblast antigen-stimulated maternal lymphocytes', *Clin Dev Immunol* 2012: 734865.

Rincon, M., Anguita, J., Nakamura, T., Fikrig, E. und Flavell, R. A. (1997) 'Interleukin (IL)-6 directs the differentiation of IL-4-producing CD4+ T cells', *J Exp Med* 185(3): 461-9.

Sallusto, F. und Lanzavecchia, A. (1994) 'Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha', *J Exp Med* 179(4): 1109-18.

Sallusto, F., Lanzavecchia, A. und Mackay, C. R. (1998) 'Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses', *Immunol Today* 19(12): 568-74.

Scharton-Kersten, T., Contursi, C., Masumi, A., Sher, A. und Ozato, K. (1997) 'Interferon consensus sequence binding protein-deficient mice display impaired resistance to intracellular infection due to a primary defect in interleukin 12 p40 induction', *J Exp Med* 186(9): 1523-34.

Schmeisser, H., Mejido, J., Balinsky, C. A., Morrow, A. N., Clark, C. R., Zhao, T. und Zoon, K. C. (2010) 'Identification of alpha interferon-induced genes associated with antiviral activity in Daudi cells and characterization of IFIT3 as a novel antiviral gene', *J Virol* 84(20): 10671-80.

Schoggins, J. W. und Rice, C. M. (2011) 'Interferon-stimulated genes and their antiviral effector functions', *Curr Opin Virol* 1(6): 519-25.

Shibata, S., Tada, Y., Kanda, N., Nashiro, K., Kamata, M., Karakawa, M., Miyagaki, T., Kai, H., Saeki, H., Shirakata, Y. et al. (2010) 'Possible roles of IL-27 in the pathogenesis of psoriasis', *J Invest Dermatol* 130(4): 1034-9.

Siegrist, C. A. (2001) 'Neonatal and early life vaccinology', *Vaccine* 19(25-26): 3331-46.

Siegrist, C. A. (2007) 'The challenges of vaccine responses in early life: selected examples', *J Comp Pathol* 137 Suppl 1: S4-9.

Siry, C. (2012) Einfluss von IL-27 auf die Stat1-vermittelte Signaltransduktion neonataler Dendritischer Zellen; Inauguraldissertation Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz.

Sozzani, S. (2005) 'Dendritic cell trafficking: more than just chemokines', *Cytokine Growth Factor Rev* 16(6): 581-92.

Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A. und Mantovani, A. (1999) 'The role of chemokines in the regulation of dendritic cell trafficking', *J Leukoc Biol* 66(1): 1-9.

Steinman, R. M. (1991) 'The dendritic cell system and its role in immunogenicity', *Annu Rev Immunol* 9: 271-96.

Steinman, R. M. und Cohn, Z. A. (1973) 'Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution', *J Exp Med* 137(5): 1142-62.

Stumhofer, J. S. und Hunter, C. A. (2008) 'Advances in understanding the anti-inflammatory properties of IL-27', *Immunol Lett* 117(2): 123-30.

Stumhofer, J. S., Laurence, A., Wilson, E. H., Huang, E., Tato, C. M., Johnson, L. M., Villarino, A. V., Huang, Q., Yoshimura, A., Sehy, D. et al. (2006) 'Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system', *Nature Immunology* 7(9): 937-45.

Stumhofer, J. S., Tait, E. D., Quinn, W. J., 3rd, Hosken, N., Spudy, B., Goenka, R., Fielding, C. A., O'Hara, A. C., Chen, Y., Jones, M. L. et al. (2010) 'A role for IL-27p28 as an antagonist of gp130-mediated signaling', *Nature Immunology* 11(12): 1119-26.

Takeda, A., Hamano, S., Yamanaka, A., Hanada, T., Ishibashi, T., Mak, T. W., Yoshimura, A. und Yoshida, H. (2003) 'Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment', *J Immunol* 170(10): 4886-90.

Tamura, T., Yanai, H., Savitsky, D. und Taniguchi, T. (2008) 'The IRF family transcription factors in immunity and oncogenesis', *Annu Rev Immunol* 26: 535-84.

Taniguchi, T., Ogasawara, K., Takaoka, A. und Tanaka, N. (2001) 'IRF family of transcription factors as regulators of host defense', *Annu Rev Immunol* 19: 623-55.

Trinchieri, G., Wysocka, M., D'Andrea, A., Rengaraju, M., Aste-Amezaga, M., Kubin, M., Valiante, N. M. und Chehimi, J. (1992) 'Natural killer cell stimulatory factor (NKSF) or interleukin-12 is a key regulator of immune response and inflammation', *Prog Growth Factor Res* 4(4): 355-68.

Trivedi, H. N., HayGlass, K. T., Gangur, V., Allardice, J. G., Embree, J. E. und Plummer, F. A. (1997) 'Analysis of neonatal T cell and antigen presenting cell functions', *Hum Immunol* 57(2): 69-79.

Upham, J. W., Lee, P. T., Holt, B. J., Heaton, T., Prescott, S. L., Sharp, M. J., Sly, P. D. und Holt, P. G. (2002) 'Development of interleukin-12-producing capacity throughout childhood', *Infect Immun* 70(12): 6583-8.

- Upham, J. W., Rate, A., Rowe, J., Kusel, M., Sly, P. D. und Holt, P. G. (2006) 'Dendritic cell immaturity during infancy restricts the capacity to express vaccine-specific T-cell memory', *Infect Immun* 74(2): 1106-12.
- Van Damme, J., Proost, P., Lenaerts, J. P. und Opdenakker, G. (1992) 'Structural and functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-2 and MCP-3) belonging to the chemokine family', *J Exp Med* 176(1): 59-65.
- van Ham, S. M., Tjin, E. P., Lillemeier, B. F., Gruneberg, U., van Meijgaarden, K. E., Pastoors, L., Verwoerd, D., Tulp, A., Canas, B., Rahman, D. et al. (1997) 'HLA-DO is a negative modulator of HLA-DM-mediated MHC class II peptide loading', *Curr Biol* 7(12): 950-7.
- Vasquez, R. E., Xin, L. und Soong, L. (2008) 'Effects of CXCL10 on dendritic cell and CD4+ T-cell functions during *Leishmania amazonensis* infection', *Infect Immun* 76(1): 161-9.
- Velilla, P. A., Rugeles, M. T. und Chougnet, C. A. (2006) 'Defective antigen-presenting cell function in human neonates', *Clin Immunol* 121(3): 251-9.
- Vignali, D. A. und Kuchroo, V. K. (2012) 'IL-12 family cytokines: immunological playmakers', *Nature Immunology* 13(8): 722-8.
- Villadangos, J. A. und Young, L. (2008) 'Antigen-presentation properties of plasmacytoid dendritic cells', *Immunity* 29(3): 352-61.
- Villarino, A., Hibbert, L., Lieberman, L., Wilson, E., Mak, T., Yoshida, H., Kastelein, R. A., Saris, C. und Hunter, C. A. (2003) 'The IL-27R (WSX-1) is required to suppress T cell hyperactivity during infection', *Immunity* 19(5): 645-55.
- Villarino, A. V., Stumhofer, J. S., Saris, C. J., Kastelein, R. A., de Sauvage, F. J. und Hunter, C. A. (2006) 'IL-27 limits IL-2 production during Th1 differentiation', *J Immunol* 176(1): 237-47.
- Villegas-Mendez, A., de Souza, J. B., Lavelle, S. W., Gwyer Findlay, E., Shaw, T. N., van Rooijen, N., Saris, C. J., Hunter, C. A., Riley, E. M. und Couper, K. N. (2013) 'IL-27 receptor signalling restricts the formation of pathogenic, terminally differentiated Th1 cells during malaria infection by repressing IL-12 dependent signals', *PLoS Pathog* 9(4): e1003293.
- Wang, I. M., Contursi, C., Masumi, A., Ma, X., Trinchieri, G. und Ozato, K. (2000) 'An IFN-gamma-inducible transcription factor, IFN consensus sequence binding protein (ICSBP), stimulates IL-12 p40 expression in macrophages', *J Immunol* 165(1): 271-9.
- Wang, S., Miyazaki, Y., Shinozaki, Y. und Yoshida, H. (2007) 'Augmentation of antigen-presenting and Th1-promoting functions of dendritic cells by WSX-1(IL-27R) deficiency', *J Immunol* 179(10): 6421-8.

Wegmann, T. G., Lin, H., Guilbert, L. und Mosmann, T. R. (1993) 'Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: is successful pregnancy a TH2 phenomenon?', *Immunol Today* 14(7): 353-6.

Wittmann, M., Zeitvogel, J., Wang, D. und Werfel, T. (2009) 'IL-27 is expressed in chronic human eczematous skin lesions and stimulates human keratinocytes', *J Allergy Clin Immunol* 124(1): 81-9.

Wood, N. und Siegrist, C. A. (2011) 'Neonatal immunization: where do we stand?', *Curr Opin Infect Dis* 24(3): 190-5.

Yoshida, H., Hamano, S., Senaldi, G., Covey, T., Faggioni, R., Mu, S., Xia, M., Wakeham, A. C., Nishina, H., Potter, J. et al. (2001) 'WSX-1 is required for the initiation of Th1 responses and resistance to L. major infection', *Immunity* 15(4): 569-78.

Yoshida, H., Nakaya, M. und Miyazaki, Y. (2009) 'Interleukin 27: a double-edged sword for offense and defense', *J Leukoc Biol* 86(6): 1295-303.

Yoshimura, T., Takeda, A., Hamano, S., Miyazaki, Y., Kinjyo, I., Ishibashi, T., Yoshimura, A. und Yoshida, H. (2006) 'Two-sided roles of IL-27: induction of Th1 differentiation on naive CD4+ T cells versus suppression of proinflammatory cytokine production including IL-23-induced IL-17 on activated CD4+ T cells partially through STAT3-dependent mechanism', *J Immunol* 177(8): 5377-85.

Zhang, J., Qian, X., Ning, H., Yang, J., Xiong, H. und Liu, J. (2010) 'Activation of IL-27 p28 gene transcription by interferon regulatory factor 8 in cooperation with interferon regulatory factor 1', *J Biol Chem* 285(28): 21269-81.

Zhou, L. J. und Tedder, T. F. (1996) 'CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells', *Proc Natl Acad Sci U S A* 93(6): 2588-92.

Zhou, X., Michal, J. J., Zhang, L., Ding, B., Lunney, J. K., Liu, B. und Jiang, Z. (2013) 'Interferon Induced IFIT Family Genes in Host Antiviral Defense', *Int J Biol Sci* 9(2): 200-8.

7 Anhang

7.1 STABW Inflammation CBA (Cytometric Bead Array)

IL-8 (pg/ml)	n=	Median CB	STABW CB	IL-1beta (pg/ml)	n=	Median CB	STABW CB
unstimuliert 24h	21	1477,89	1386,335719	unstimuliert 24h	20	7,835	11,48526763
unstimuliert 48h	8	940,095	1291,892057	unstimuliert 48h	7	5,54	3,361744162
IL-27 24h	22	2133,175	1615,612959	IL-27 24h	22	8,335	10,91906868
IL-27 48h	7	1864,42	1729,182765	IL-27 48h	7	5,78	3,876207032
IL-21 24h	6	1843,09	1353,938385	IL-21 24h	6	4,79	2,996651465
IL-21 48h	7	1038,97	1516,427129	IL-21 48h	6	5,17	3,245511773
IL-27+IL-21 24h	2	2501,805	1593,641908	IL-27+IL-21 24h	2	5,21	0,127279221
IL-27+IL-21 48h	2	2586,86	1649,156861	IL-27+IL-21 48h	2	3,59	1,909188309
IL-27+IFNg 24h	2	2486,635	1253,509404	IL-27+IFNg 24h	2	4,61	3,351686143
IL-27+IFNg 48h	1	3814,2	#DIV/0!	IL-27+IFNg 48h	1	2,88	#DIV/0!
IL-27+LPS	13	19446,61	4792,372593	IL-27+LPS	13	12,13	8,426633905
IL-27+LPS 48h	2	19214,815	1891,079305	IL-27+LPS 48h	2	8,325	4,094148263
LPS	18	17996,555	15814,90946	LPS	18	13,46	16,3653195
LPS 48h	3	17036,7	6323,054252	LPS 48h	4	9,825	4,640854806
IFNg	6	2981,95	3169,428472	IFNg	6	18,74	24,92238866
IFNg 48h	1	1180,95	#DIV/0!	IFNg 48h	1	4,68	#DIV/0!
IL-27 100ng/ml 24h	6	3376,19	2052,928389	IL-27 100ng/ml 24h	6	9,56	4,443212426
IL-27 100ng/ml 48h	3	2236,93	2372,703142	IL-27 100ng/ml 48h	3	5,78	0,415812458

IL-6 (pg/ml)	n=	Median CB	STABW CB
unstimuliert 24h	21	29,2	54,77883009
unstimuliert 48h	8	26,03	77,63301194
IL-27 24h	22	38,995	87,00760807
IL-27 48h	7	57,21	131,5403372
IL-21 24h	6	21,93	91,87314894
IL-21 48h	7	34,9	94,33246621
IL-27+IL-21 24h	2	18,115	14,78560279
IL-27+IL-21 48h	2	27,9	28,2277027
IL-27+IFNg 24h	2	15,225	6,936717523
IL-27+IFNg 48h	1	38,42	#DIV/0!
IL-27+LPS	13	1877,29	1837,050476
IL-27+LPS 48h	2	6802,745	3483,398923
LPS	18	1107,155	1564,497076
LPS 48h	4	1425,05	2626,869047
IFNg	6	32,62	34,40296581
IFNg 48h	1	12,94	#DIV/0!
IL-27 100ng/ml 24h	6	95,325	106,8085256
IL-27 100ng/ml 48h	3	171,67	148,9963231

IL-10 (pg/ml)	n=	Median CB	STABW CB
unstimuliert 24h	20	2,61	1,67248153
unstimuliert 48h	8	2,79	1,94435447
IL-27 24h	19	2,18	1,55800161
IL-27 48h	7	2,74	1,68679042
IL-21 24h	6	2,115	1,00420449
IL-21 48h	7	3,56	8,88920774
IL-27+IL-21 24h	2	0,825	1,16672619
IL-27+IL-21 48h	2	0	0
IL-27+IFNg 24h	2	1,41	1,99404112
IL-27+LPS	13	11,51	6,83148649
IL-27+LPS 48h	2	44,45	43,5012092
LPS	18	13,065	54,1575954
LPS 48h	4	8,225	13,4566399
IFNg	6	1,315	2,26467143
IFNg 48h	0	#ZAHL!	#DIV/0!
IL-27 100ng/ml 24h	6	2,115	1,99638423
IL-27 100ng/ml 48h	3	3,08	1,44223207

TNF (pg/ml)	n=	Median CB	STABW CB
unstimuliert 24h	21	11,61	13,29630794
unstimuliert 48h	7	4,65	15,2651812
IL-27 24h	21	57,8	101,3307371
IL-27 48h	7	8,57	21,86700548
IL-21 24h	6	7,25	11,08537896
IL-21 48h	6	6,365	22,52658607
IL-27+IL-21 24h	2	19,045	4,164858941
IL-27+IL-21 48h	2	8,08	5,43058008
IL-27+IFNg 24h	2	35,305	22,4082139
IL-27+IFNg 48h	1	23,91	#DIV/0!
IL-27+LPS	13	8093,9	4232,939725
IL-27+LPS 48h	2	5842,08	6272,475555
LPS	18	4890,43	4340,448832
LPS 48h	4	1294,245	3533,693689
IFNg	6	10,045	10,98765262
IFNg 48h	1	3,04	#DIV/0!
IL-27 100ng/ml 24h	6	40,93	46,79752319
IL-27 100ng/ml 48h	2	23,68	26,23366158

IL-12p70 (pg/ml)	n=	Median CB	STABW CB
unstimuliert 24h	19	0	1,048329777
unstimuliert 48h	6	0	1,388011767
IL-27 24h	20	0	1,324976663
IL-27 48h	7	0	0,558889204
IL-21 24h	5	0	0,599266218
IL-21 48h	7	0	0,970978888
IL-27+IL-21 24h	2	0,86	1,216223664
IL-27+IL-21 48h	2	0,795	1,124299782
IL-27+IFNg 24h	2	1,02	1,442497834
IL-27+IFNg 48h	1	2,41	#DIV/0!
IL-27+LPS	13	12,57	12,39060857
IL-27+LPS 48h	2	11,4	10,55003318
LPS	18	1,82	2,249485054
LPS 48h	4	0	0,895
IFNg	6	0	0,612372436
IFNg 48h	1	0	#DIV/0!
IL-27 100ng/ml 24h	6	0	1,090742866
IL-27 100ng/ml 48h	3	0	0,773649361

IL-8 (pg/ml)	n=	Median AB	STABW AB
unstimuliert 24h	20	1866,47	1990,995017
unstimuliert 48h	7	1550,8	2642,45027
IL-27 24h	20	2750,49	2980,356713
IL-27 48h	7	3908,26	2098,524369
IL-21 24h	4	3142,655	2296,466357
IL-21 48h	7	1720,12	2168,458026
IL-27+IL-21 24h	2	4737,41	2844,450164
IL-27+IL-21 48h	2	4325,475	1767,561892
IL-27+IFNg 24h	2	4602,095	2646,184494
IL-27+IFNg 48h	1	5435,67	#DIV/0!
IL-27+LPS	15	17271,02	7319,25014
IL-27+LPS 48h	1	20086,08	#DIV/0!
LPS	15	16926,73	5722,93757
LPS 48h	4	15886,51	4524,200895
IFNg	8	3079,875	4477,096681
IFNg 48h	1	458,8	#DIV/0!
IL-27 100ng/ml 24h	4	2777,905	2101,66858
IL-27 100ng/ml 48h	2	3990,47	4292,364436

IL-1beta (pg/ml)	n=	Median AB	STABW AB
unstimuliert 24h	19	8,24	7,164701934
unstimuliert 48h	7	5,66	3,384968875
IL-27 24h	20	8,195	7,19579263
IL-27 48h	7	6,76	3,108102315
IL-21 24h	3	8,31	3,560201305
IL-21 48h	7	5,27	3,225940247
IL-27+IL-21 24h	2	6,225	1,689985207
IL-27+IL-21 48h	2	6,01	0,254558441
IL-27+IFNg 24h	2	5,605	1,449568901
IL-27+IFNg 48h	1	5,12	#DIV/0!
IL-27+LPS	15	14,51	9,185013933
IL-27+LPS 48h	1	20,49	#DIV/0!
LPS	15	13,12	4,433159467
LPS 48h	4	13,205	2,57527992
IFNg	8	14,5	8,032975676
IFNg 48h	1	3	#DIV/0!
IL-27 100ng/ml 24h	3	11,67	2,354938074
IL-27 100ng/ml 48h	2	6,53	1,555634919

IL-6 (pg/ml)	n=	Median AB	STABW AB
unstimuliert 24h	20	19,045	43,15069408
unstimuliert 48h	7	29,21	35,81177387
IL-27 24h	20	28,225	207,9732586
IL-27 48h	7	34,11	35,94505105
IL-21 24h	4	14,095	20,11394106
IL-21 48h	7	22,29	43,38140835
IL-27+IL-21 24h	2	19,99	7,59432683
IL-27+IL-21 48h	2	22,415	11,02379472
IL-27+IFNg 24h	2	17,095	7,375123728
IL-27+IFNg 48h	1	12,1	#DIV/0!
IL-27+LPS	15	2831,06	4151,131248
IL-27+LPS 48h	1	9265,88	#DIV/0!
LPS	15	1251,52	3101,19342
LPS 48h	4	4362,745	2230,744209
IFNg	8	24,08	47,14958923
IFNg 48h	1	44,52	#DIV/0!
IL-27 100ng/ml 24h	4	40,855	55,34702792
IL-27 100ng/ml 48h	2	90,73	75,57557277

IL-10 (pg/ml)	n=	Median AB	STABW AB
unstimuliert 24h	19	2,64	1,73877688
unstimuliert 48h	7	4,15	1,84830295
IL-27 24h	20	2,76	2,09765903
IL-27 48h	7	4,26	2,04771301
IL-21 24h	4	3,25	0,83210576
IL-21 48h	7	3,94	4,90740063
IL-27+IL-21 24h	2	2,49	1,4283557
IL-27+IL-21 48h	2	4,925	1,54856385
IL-27+IFNg 24h	2	1,97	0,33941125
IL-27+IFNg 48h	1	4,05	#DIV/0!
IL-27+LPS	15	17,69	89,9329418
IL-27+LPS 48h	1	75,94	#DIV/0!
LPS	15	12,65	83,3664918
LPS 48h	4	18,905	26,6052017
IFNg	6	2,115	2,19642816
IFNg 48h	1	2,44	#DIV/0!
IL-27 100ng/ml 24h	4	1,795	0,92536029
IL-27 100ng/ml 48h	2	4,075	0,1767767

TNF (pg/ml)	n=	Median AB	STABW AB
unstimuliert 24h	20	9,98	11,3947268
unstimuliert 48h	6	3,575	1,830286863
IL-27 24h	20	38,485	32,68687095
IL-27 48h	7	6,02	21,01054894
IL-21 24h	4	9,275	6,205086623
IL-21 48h	6	4,185	16,50402981
IL-27+IL-21 24h	2	61,855	46,59126581
IL-27+IL-21 48h	2	13,175	8,959042918
IL-27+IFNg 24h	2	37,725	6,710443353
IL-27+IFNg 48h	1	5,56	#DIV/0!
IL-27+LPS	15	8279,71	6075,824789
IL-27+LPS 48h	1	8304,69	#DIV/0!
LPS	15	5801,72	5922,046446
LPS 48h	4	2825,72	2278,896898
IFNg	8	9,37	9,4527513
IFNg 48h	1	3,45	#DIV/0!
IL-27 100ng/ml 24h	4	7,72	3,297457354
IL-27 100ng/ml 48h	2	8,42	0,650538239

IL-12p70 (pg/ml)	n=	Median AB	STABW AB
unstimuliert 24h	20	0	2,008978465
unstimuliert 48h	5	0	0,947982067
IL-27 24h	20	0	1,216355644
IL-27 48h	6	0	0
IL-21 24h	3	0	1,691636289
IL-21 48h	5	0	1,194370127
IL-27+IL-21 24h	2	3,17	0,579827561
IL-27+IL-21 48h	2	2,4	0,509116882
IL-27+IFNg 24h	2	0	0
IL-27+IFNg 48h	1	2,23	#DIV/0!
IL-27+LPS	15	70,35	235,1100782
IL-27+LPS 48h	1	389,01	#DIV/0!
LPS	15	9,73	35,02268752
LPS 48h	4	34,835	34,964571
IFNg	8	0	0,570281885
IFNg 48h	1	1,45	#DIV/0!
IL-27 100ng/ml 24h	2	0	0
IL-27 100ng/ml 48h	1	0	#DIV/0!

7.2 Eidesstattliche Erklärung

Versicherung gemäß §11, Abs. 3d der Promotionsordnung vom 30. April 1990

1. Ich habe die vorliegende Arbeit selbstständig angefertigt und alle benutzten Quellen und Hilfsmittel in der Arbeit angegeben.
2. Ich habe die Dissertation nicht als Prüfungsarbeit für eine andere Prüfung eingereicht.
3. Ich habe weder die gleichen noch Teile der Abhandlung als Dissertation bei einer anderen Fakultät oder einem anderen Fachbereich eingereicht.

Mainz, den _____

7.3 Lebenslauf

7.4 Danksagung