

Aus dem Institut für Immunologie
der Universitätsmedizin der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Mechanistische Untersuchung des Beitrags von NF κ B und MAP Kinasen zur pro-
inflammatorischen Zytokinsekretion durch ein Flagellin:Allergen Fusionsprotein in
myeloiden dendritischen Zellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der
Medizin
der Universitätsmedizin
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Vorgelegt von

Tobias Maximilian Möller
aus Hadamar

Mainz, 2020

Wissenschaftlicher Vorstand:

1. Gutachter:

2. Gutachter:

Tag der Promotion: 06.07.2021

I. Inhaltsverzeichnis	
II. Abkürzungsverzeichnis	IV
III. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis	IX
1. Literaturdiskussion	1
1.1. Allergien und deren Behandlung sind eine globale Herausforderung	1
1.2. Allergien entstehen durch eine Dysregulation der Immunreaktion	2
1.3. Die spezifische Immuntherapie als derzeit einzige kurative Therapieoption	3
1.4. Neue Therapieoptionen zur Behandlung allergischer Erkrankungen	5
1.5. Die Rolle von Adjuvantien als effektive Immunmodulatoren	7
1.6. Zugelassene Adjuvantien – Funktionsweise und Limitationen	8
1.7. Entwicklung neuer Adjuvantien	11
1.8. Risiken bei der Verwendung von einfachen Mixturen aus Adjuvans und Antigen	14
1.9. Fusionsproteine kombinieren Adjuvans und Allergen in einem einzigen Molekül	15
1.10. Sipuleucel-T – Das erste im Menschen zugelassene Fusionsprotein	18
1.11. Adjuvans:Allergen-Fusionsproteine in der spezifischen Immuntherapie allergischer Erkrankungen	19
2. Einleitung	23
2.1. Flagellin ist ein vielversprechendes Adjuvans zur Anwendung in Adjuvans:Allergen-Fusionsproteinen	23
2.2. Die Stoffwechselaktivierung sowie die IL-10 Sekretion von mDCs nach Stimulation mit rFlaA:Betv1 ist mTOR-abhängig	25
2.3. Der Warburg-Effekt als Ausdruck der übermäßigen mDC-Aktivierung beeinflusst die anti-, nicht aber die pro-inflammatorische Zytokinsekretion	26
2.4. Das Inflammasom als Vermittler von Entzündungsreaktionen des angeborenen Immunsystem	27
2.5. Die rFlaA:Betv1-vermittelte Immunreaktion ist MyD88-abhängig	30
2.6. Hypothese/Zielsetzung	33

3. Material und Methoden.....	34
3.1. Rekombinante Proteine.....	34
3.2. BCA-Proteinmessung.....	34
3.3. Mäuse.....	35
3.4. Gewinnung von mDCs aus Mausknochenmark und Zellkultur.....	36
3.5. Toxische und intrinsische Aktivität der verwendeten Inhibitoren.....	38
3.6. Stimulation von mDCs mit rFlaA:Betv1.....	39
3.7. Stimulation von mDCs mit rFlaA:Betv1 und Inhibitoren.....	41
3.8. Zytokinanalyse mittels ELISA.....	41
3.9. Bestimmung des Warburg-Effekts.....	44
3.10. Analyse der Glukosekonzentration im Zellkulturmedium.....	44
3.11. SDS-PAGE.....	45
3.12. Western-Blot Analysen.....	48
3.13. Inhibitoren.....	49
I. mTOR-Inhibitoren.....	49
II. Inflammasom-Inhibitoren.....	50
III. NF κ B-Inhibitoren.....	51
IV. MAP-Kinase-Inhibitoren.....	52
4. Ergebnisse.....	53
4.1. rFlaA:Betv1 bildet hochmolekulare Aggregate aus und bewirkt eine deutlich stärkere mDC-Aktivierung als die einfache Mixtur der Einzelproteine.....	53
4.2. Die durch rFlaA:Betv1 induzierte Aktivierung des Zellstoffwechsels von mDCs sowie die Freisetzung anti-inflammatorischer, nicht aber pro-inflammatorischer Zytokine ist mTOR-abhängig.....	56
4.3. Die durch rFlaA:Betv1 induzierte Aktivierung des Zellstoffwechsels von mDCs sowie die Freisetzung anti- und pro-inflammatorischer Zytokine ist Inflammasom-unabhängig.....	61
4.4. Eine Inhibition des Transkriptionsfaktors NF κ B reduziert sowohl die rFlaA:Betv1-induzierte pro- als auch die anti-inflammatorische Zytokinsekretion aus mDCs.....	66

4.5.	Der MAP-Kinase-Signalweg ist nach rFlaA:Betv1-Stimulation sowohl in die pro- als auch in die anti-inflammatorische Zytokinausschüttung involviert.....	73
4.6.	Sowohl die MAPKs als auch NF κ B sind in die Aktivierung der mDCs nach rFlaA:Betv1-Stimulation involviert.....	79
5.	Ergebnisdiskussion.....	83
5.1.	Einleitung.....	83
5.2.	Das Fusionsprotein rFlaA:Betv1 zeigt eine überlegene Immunogenität im Vergleich zur einfachen Mixtur beider Proteine.....	84
5.3.	Die Stoffwechselaktivierung, der Warburg-Effekt und die anti-inflammatorische IL-10 Sekretion von mDCs nach rFla:Betv1-Stimulation sind mTOR-abhängig.....	85
5.4.	Das Inflammasom spielt wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle bei der rFlaA:Betv1-vermittelten pro-inflammatorischen Zytokinsekretion.....	86
5.5.	Der Transkriptionsfaktor NF κ B vermittelt die rFlaA:Betv1-induzierte mDC Aktivierung.....	89
5.6.	Die rFlaA:Betv1-vermittelte Aktivierung von MAP-Kinasen trägt wesentlich zur pro- und anti-inflammatorischen Zytokinsekretion bei, während nur die JNK MAP Kinase einen Beitrag zur Aktivierung des Glukosestoffwechsels leistet.....	94
5.7.	Eine Interaktion zwischen den untersuchten Signaltransduktionswegen trägt wesentlich zu der durch das Fusionsprotein verursachten Gesamtimmunantwort bei.....	97
5.8.	Die ausgeprägte rFlaA:Betv1-vermittelte mDC-Aktivierung führt zu einer Veränderung des Zellstoffwechsels mit Ausbildung des Warburg-Effekts.....	98
6.	Zusammenfassung.....	101
IV.	Literaturverzeichnis.....	XIII
V.	Anhang.....	XXXI
VI.	Danksagung.....	XXXV
VII.	Tabellarischer Lebenslauf.....	XXXVII

II. Abkürzungsverzeichnis

A(S)IT	Allergenspezifische Immuntherapie
Ak	Antikörper
Akt	Proteinkinase B
Alum	Aluminiumphosphat/-hydroxid
AMP	Adenosinmonophosphat
AMPK	AMP-abhängige Kinase
AP-1	<i>Activator protein 1</i>
APC	Antigen präsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Adjuvans-System
ASC	<i>Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD domain</i>
ATP	Adenosintriphosphat
Bet v 1	Major-Birkenpollenallergen 1 (von <i>Betula verrucosa</i> Allergen 1)
B _{reg}	Regulatorische B-Zelle
BSA	Bovines Serumalbumin
BZR	B-Zell-Rezeptor
c-Myc	<i>Avian myelocytomatosis virus oncogen cellular homology</i>
cAMP	Zyklisches Adenosinmonophosphat
CARD	<i>Caspase recruitment domain</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CFA	<i>Complete Freund's Adjuvant</i>
CLR(s)	C-Typ-Lectin-Rezeptor(en)
CpG	Dinukelotid-Sequenzmotiv aus Cytosin und Guanin
CpG ODN	CpG-Oligodesoxynucleotide
CREB	<i>cAMP response element-binding protein</i>
CTLA4	<i>Cytotoxic T-lymphocyte-associated Protein 4</i>
DAMP(s)	Gefahren-assoziierte molekulare Muster
Der p 1	Milben-Allergen 1 (von <i>Dermatophagoides pteronyssinus</i> Peptidase 1)
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelstrang-RNA
DTT	Dithioerythrit
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure

ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
ERKs	<i>Extracellular signal-regulated kinase(s)</i>
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorting</i> , Durchflusszytometrie
FCS	Fötales Kälberserum
Fel d 1	Katzen-Allergen 1 (von <i>Felis domesticus</i> Allergen 1)
Foxp3	<i>Forkhead box P3</i>
G-CSF	<i>Granulocyte-colony stimulating factor</i>
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GATA-3	<i>GATA binding protein 3</i>
GILZ	<i>Glucocorticoid-induced leucine zipper</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colonie-stimulating factor</i>
GR	Glokokortikoid-Rezeptor
GSDMD	Gasdermin D
Hbs	Hepatitis B-Hüllprotein
HBV	Hepatitis B-Virus
HDM	Hausstaubmilben
HEPES	(2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIF1 α	<i>Hypoxia-inducible factor 1-α</i>
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPV	Humanes Papilloma-Virus
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i>
HSF1	<i>Heat shock</i> Transkriptionsfaktor 1
IFA	<i>Incomplete Freund's Adjuvant</i>
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IKK	<i>Inhibitor of kappa B kinase</i>
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin-1-Rezeptor
ILC2	<i>Type 2 Innate Lymphoid Cell</i>
ILIT	Intralymphatische Immuntherapie
IPAF	<i>ICE-protease-activating factor</i> , siehe NLRC4
IRAK	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierten Kinase
ISS-ODN	<i>Immunostimulatory sequence containing ODN</i> , siehe auch CpG ODN
I κ B	<i>Inhibitor of kappa B</i>
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
Ii	<i>Invariant chain</i>

LPS	Lipopolysaccharide
LRR	<i>Leucine-rich repeat</i>
M	Marker
MAP2K, MKK, MEK	MAPK Kinasen
MAP3K	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase Kinase Kinase
MAPK(s)	Mitogen-aktivierte Proteinkinase(n)
MAPKAPK	Siehe Mks
MAT	<i>Modular antigen translocation</i>
mDC	Myeloide dendritische Zelle
MEK 1/2	MAP/ERK Kinase 1/2
MHCII	Major-Histokompatibilitätskomplex II
MKP1	Glukokortikoid-induzierte MAPK Phosphatase 1
MKs	<i>MAPK-activated protein kinases</i>
MPLA	Monophosphoryl-Lipid-A
MSK1	<i>Mitogen- and stress-activated protein kinase</i>
mTOR	Mammalian target of <i>rapamycin</i>
mTORC1	mTOR1-Komplex
MyD88	<i>Myeloid differentiation primary response 88</i>
NAIP 5/6	<i>NOD-like receptor family, apoptosis inhibitory proteins 5/6</i>
NEMO	<i>NFκB essential modulator</i> , auch IKKγ
NFAT	Nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen
NFκB	Transkriptionsfaktors aktivierter B-Zellen
NLR(s)	<i>Nucleotide-binding domain (NOD)-like receptor(s)</i>
NLRC4	<i>NLR family, CARD domain-containing protein 4</i> , auch IPAF
NLRP3	<i>NOD-like receptor, leucine-rich repeat and pyrin domain containing 3</i>
NOD	<i>Nucleotide-binding oligomerization domain</i>
OD	Optische Dichte
Ova	Ovalbumin, Allergen aus dem Hühnereiweiß
OXPHOS	Oxidative Phosphorylierung
p42/44	Siehe ERKS
PAMP(s)	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PAP	Prostata-spezifische saure Phosphatase
PBMCs	Mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PD-L1	<i>Programmed death ligand 1</i>
PEI	Paul-Ehrlich-Institut

PFA	Paraformaldehyd
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PLA ₂	Phospholipase A (Bienengift-Allergen)
PRR(s)	<i>Pattern recognition receptor(s)</i> , Mustererkennungsrezeptoren
PYCARD	Siehe ASC
PYD	Pyrin-Domäne
RAPTOR	<i>Regulatory associated protein of mTOR</i>
rBet v 1	Rekombinantes Major-Birkenpollen-Allergen
rFlaA	Rekombinantes Flagellin A
rFlaA:Betv1	Rekombinantes Fusionsprotein aus rFlaA und rBet v 1
RLR(s)	<i>Retinoic acid-inducible gene-I-like receptor(s)</i> , <i>RIG-I-like receptor(s)</i>
RLU	Relative Luminometer <i>Units</i>
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Radikale Sauerstoffspezies
rpL3	Ribosomales Protein L3
RPM	Umdrehung pro Minute
RPS3	Ribosomales Protein S3
RSK	Ribosomale p90 S6 Kinase
S-Layer	<i>Surface layer protein</i>
SAP/JNK	<i>Stress-activated protein kinase</i> , siehe JNK
SCIT	Subkutane Immuntherapie
SDS	Natriumdodecylsulfat
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SIT	Spezifische Immuntherapie
SLIT	Sublinguale Immuntherapie
ssRNA	Einzelstrang
STAT3	<i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
T-bet	<i>T-box-expressed in T-cells</i>
T3SS	Typ-3-Sekretionssystem
TAB 1, 2, 3	TAK-bindende Proteine 1, 2, 3
TAK1	<i>Transforming growth factor-β-activated kinase-1</i>
TAT	<i>Trans-activating regulatory protein</i>
TC	T-Zelle
TCM	Traditionelle chinesische Medizin
TEMED	N,N'-Tetramethyldiamin
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>

Th1	Typ 1-T-Helferzellen
Th2	Typ 2-T-Helferzellen
TLR(s)	<i>Toll-Like-Rezeptor(en)</i>
TMB	Tetramethylbenzidin
TRAF6	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6
T _{reg}	Regulatorische T-Zelle
TRIF	<i>TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-Amoniummethan
TSC1/2	<i>Tuberous sclerosis complex 1/2</i>
TZR	T-Zell-Rezeptor
VLP	Virus-ähnlicher Partikel
WAO	Weltallergieorganisation
WHO	Weltgesundheitsorganisation

III. Tabellen- und Abbildungsverzeichnis

1. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Lokalisation der bisher beschriebenen Mustererkennungsrezeptor-Familien und die von ihnen erkannten Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs).....	11
Tabelle 2	Einteilung der Zellkulturen nach Zellzahl/ml.....	37
Tabelle 3	Protokoll zum Austausch des Kulturmediums und zur Stimulation mit GM-CSF nach Zellzahl/ml.....	37
Tabelle 4	Protokoll für die Stimulation von Zellen in Standardkonzentration mit den einzelnen Proteinen, der Mixtur und dem Fusionsprotein.....	40
Tabelle 5	Übersicht: In der ELISA verwendete Fang- und Detektionsantikörper.....	43
Tabelle 6	Charge und Konzentration der in dieser Studie verwendeten Proteine.....	46
Tabelle 7	Beladung der SDS-Gele.....	47
Tabelle 8	Im Western Blot detektierte Proteine mit ihrem erwarteten Molekulargewicht.....	49

2. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Schematische Darstellung des Pathomechanismus von Typ 1 Allergien.....	2
Abbildung 2	Allgemeines Therapieprinzip und Verlauf der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT).....	4
Abbildung 3	Genereller Mechanismus der Immunmodulation durch Adjuvantien.....	6
Abbildung 4	Vorteile der Fusionsproteine gegenüber der Mixtur aus Adjuvans und Allergen.....	17
Abbildung 5	Übersicht der bisher beschriebenen Adjuvans:Allergen-Fusionsproteine.....	19
Abbildung 6	Der Warburg-Effekt.....	26
Abbildung 7	Aktivierung des Inflammasoms.....	28
Abbildung 8	Die TLR-Signalkaskade führt zu einer Aktivierung der MAPKs und von NF κ B.....	31
Abbildung 9	Protokoll für die Stimulation der mDCs mit rFlaA:Betv1 und den verschiedenen Inhibitoren.....	41
Abbildung 10	Nicht-reduzierte und reduzierte SDS-PAGE.....	53
Abbildung 11	Die Stimulation von mDCs mit rFlaA:Betv1 führt zu einer deutlich stärkeren Zytokinausschüttung als die Stimulation mit den einzelnen Proteinen oder der Proteinmixture.....	54
Abbildung 12	rFlaA:Betv1 induziert eine mTOR-abhängige Aktivierung des Zellmetabolismus und der IL-10 Sekretion in Maus mDCs.....	57
Abbildung 13	rFlaA:Betv1 induziert in Maus mDCs eine vom Inflammasom unabhängige Aktivierung des Zellmetabolismus.....	62
Abbildung 14	rFlaA:Betv1 induziert in Maus mDCs eine vom Inflammasom weitestgehend unabhängige Zytokinausschüttung.....	63
Abbildung 15	Eine Inhibition des Transkriptionsfaktors NF κ B reduziert die rFlaA:Betv1-induzierte metabolische Aktivität von mDCs.....	67
Abbildung 16	Eine Inhibition des Transkriptionsfaktors NF κ B reduziert die rFlaA:Betv1-induzierte Zytokinsekretion von mDCs.....	68

Abbildung 17	Nur die Inhibition der SAP/JNK MAPK zeigt Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der rFlaA:Betv1 stimulierten mDCs.....	74
Abbildung 18	Der MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg ist nach rFlaA:Betv1-Stimulation sowohl in die pro- als auch in die anti-inflammatorische Zytokinausschüttung involviert.....	75
Abbildung 19	Sowohl MAPKs als auch NF κ B tragen zur rFlaA:Betv1-induzierten mDC-Aktivierung bei. Nur die JNK MAPK trägt zur mTOR-abhängigen Phosphorylierung der p70 S6-Kinase bei.....	80
Abbildung 20	Propagierter Mechanismus der mDC-Aktivierung durch rFlaA:Betv1.....	102
Anhang Abbildung 1	Toxizität der Inflammasom-Inhibitoren.....	XXIX
Anhang Abbildung 2	Toxizität der NF κ B-Inhibitoren.....	XXX
Anhang Abbildung 3	Toxizität der MAPK-Inhibitoren.....	XXXI

1. Literaturdiskussion

1.1. Allergien und deren Behandlung sind eine globale Herausforderung

Über die letzten Jahrzehnte hat die Inzidenz allergischer Erkrankungen stetig zugenommen (1),(2). Auch wenn aktuelle epidemiologische Daten das Erreichen einer Plateau-Phase bzw. einen leichten Rückgang der Prävalenz allergischer Erkrankungen andeuten (2),(3), so bleibt der absolute Anteil weltweit Betroffener mit bis zu 30% der Bevölkerung weiterhin bedenklich hoch (1). Während schwerwiegende und lebensbedrohliche Anaphylaxien oder Asthmaanfälle glücklicherweise zu den selteneren allergischen Krankheitsmanifestationen gehören, gehen jedoch auch die weit weniger akut verlaufenden Allergien mit einem signifikanten Verlust an Lebensqualität für die Erkrankten einher (1),(4). Des Weiteren stellt die Behandlung der häufig chronisch verlaufenden allergischen Erkrankungen einen nicht zu vernachlässigenden Kostenfaktor sowohl für den Patienten selbst als auch für die betroffenen Gesundheitssysteme dar (5). In diesem Zusammenhang benennt die *World Allergy Association (WAO)* in ihrem *White Book of Allergy* (1) die niedrige Therapieadhärenz (< 50%) (1),(6),(7) im Rahmen einer chronischen Erkrankung als eines der Kernprobleme, sowohl individuell für den Erkrankten als auch finanziell für die Gesamtbevölkerung. Neben der symptomatischen Therapie und der strikten Vermeidung der allergieauslösenden Substanzen (Allergenkarrenz) ist die antigenspezifische Immuntherapie (SIT, auch: allergenspezifische Immuntherapie, ASIT, AIT oder Hyposensibilisierung) derzeit die einzige potentiell krankheitsmodifizierende Therapieoption (8),(9),(10). Allerdings zeigt die AIT in Abhängigkeit von der zu behandelnden Allergie stark unterschiedliche Erfolgsaussichten (11), kann durch Nebenwirkungen erschwert sein, ist für bestimmte Allergien (z.B. Lebensmittelallergien) noch nicht etabliert (12),(13) und stellt mit ihren langjährigen Behandlungsregimen eine oft nur schwer umsetzbare Therapiemethode dar (7),(8). Um die antigenspezifische Immuntherapie in Bezug auf Behandlungssicherheit und -dauer und somit auch in Bezug auf die Behandlungcompliance zu verbessern, sind neue Behandlungsstrategien notwendig (14).

1.2. Allergien entstehen durch eine Dysregulation der Immunreaktion

In Allergikern führt eine Kombination aus genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren zu einer veränderten Immunreaktion auf eigentlich harmlose Umweltantigene (15),(16) (siehe Abbildung 1).

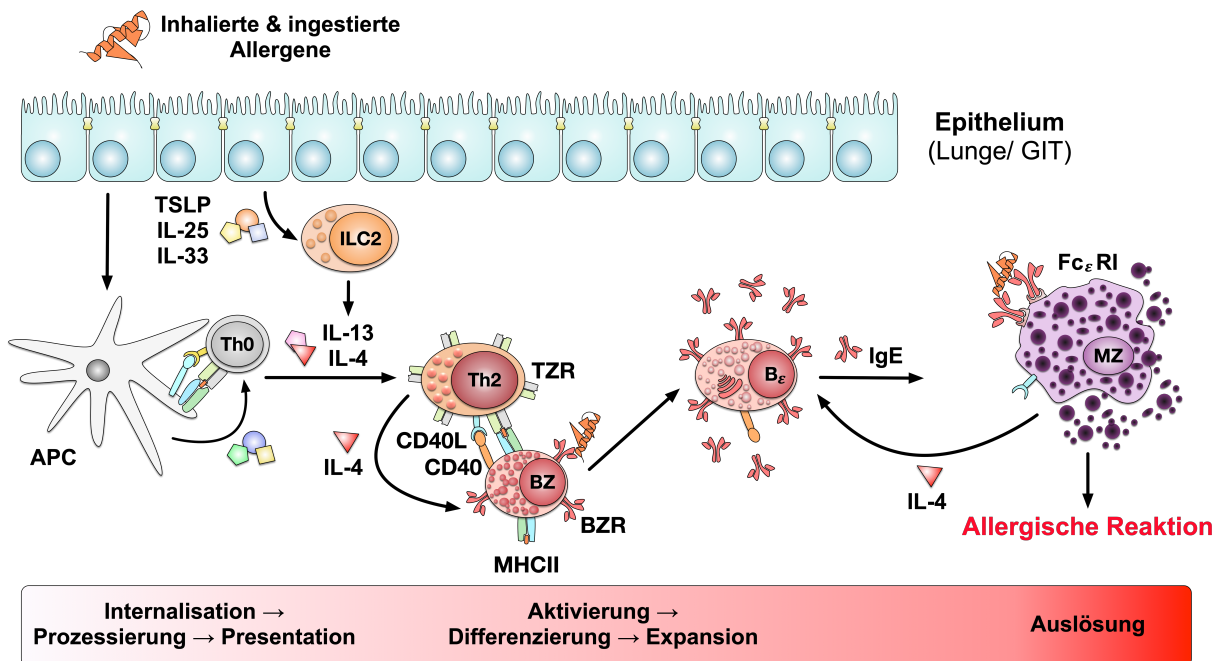


Abbildung 1 – Schematische Darstellung des Pathomechanismus von Typ 1 Allergien. APC: Antigen-präsentierende Zelle, TZR: T-Zell-Rezeptor, BZR: B-Zell-Rezeptor, MHCII: Major-Histokompatibilitätskomplex II, Fc_εRI: hochaffiner IgE-Rezeptor an der Zelloberfläche, ILC2: Type 2 innate lymphoid cell, sezerniert Th2-typische Zytokine (IL-4, IL-13). Nähere Erläuterungen siehe Text.

Die Prozessierung dieser Fremdproteine durch Antigen-präsentierende Zellen (*antigen presenting cells*, APCs) führt zu einer überschießenden Typ 2-T-Helferzell (Th2) Antwort, die mit der verstärkten Freisetzung von Th2-typischen Zytokinen (Interleukin (IL)-4, IL-5 und IL-13) einhergeht. Diese Zytokine tragen dann maßgeblich dazu bei, dass sich antigenspezifische B-Zellen zu Immunglobulin E (IgE)-produzierenden Plasmazellen differenzieren (17),(18). Das von diesen Zellen gebildete IgE bindet über seinen Fc (*crystallisable fragment*)-Teil mit sehr hoher Affinität den IgE-Rezeptor Fc_εRI auf der Zelloberfläche von Mastzellen und Basophilen und wird somit zu einem dauerhaften, allergenspezifischen Zellmembranrezeptor (17),(19).

Während dieser erste Kontakt mit dem Allergen, die sogenannte Sensibilisierung, noch keine wahrnehmbaren Symptome hervorruft, kommt es bei erneutem Allergen-Kontakt aufgrund der schnellen Antigen-Erkennung durch die zelloberflächen-gebundenen IgE-Rezeptoren bei einer Kreuzvernetzung dieser Rezeptoren zu einer massiven Degranulation der Mastzellen und Basophilen mit Freisetzung einer Vielzahl verschiedener Entzündungsmediatoren (15),(17).

Die Symptome dieser allergischen Inflammation reichen dabei von leichten Allgemeinreaktionen mit Pruritus oder Urtikaria über Atemwegskomplikationen bis hin zu schwerem Organversagen mit Atem- und Herzkreislaufstillstand (10),(20).

1.3. Die spezifische Immuntherapie als derzeit einzige kurative Therapieoption

Die spezifische Immuntherapie versucht durch sequentielle Verabreichung von Allergenextrakten in aufsteigender Dosierung und gegebenenfalls unter Verwendung einer Erhaltungsdosis eine immunologische Toleranz gegen das betreffende Allergen im Patienten wiederherzustellen (siehe Abbildung 2) (10),(15). Die Allergene werden dabei in der Regel entweder subkutan injiziert (subkutane Immuntherapie, SCIT) oder sublingual verabreicht (sublinguale Immuntherapie, SLIT) (10). Der zugrundeliegende Therapiemechanismus der SIT ist hierbei noch nicht abschließend geklärt, besteht aber wahrscheinlich in der Induktion von allergenspezifischen regulatorischen T- (T_{reg}) und B-Zellen (B_{reg}) sowie neutralisierender, allergenspezifischer IgG Antikörper im allergischen Patienten (15),(17).

Während bei Gesunden die ausreichende Ausbildung von T_{regs} nach Antigen-Kontakt zu einer ausgewogenen sowohl von Typ 1-(Th1) als auch von Typ 2-T-Helferzellen beeinflussten Immunantwort mit Toleranzinduktion führt, kommt es bei Allergikern wahrscheinlich aufgrund einer mangelhaften Ausbildung allergenspezifischer regulatorischer T-Zellen zu einem Th2-Ungleichgewicht der Immunantwort mit der oben beschriebenen IgE-vermittelten Allergie-Entwicklung (15),(17). Alle genannten T-Zell-Subtypen (Th1, Th2, T_{reg}) entwickeln sich sowohl beim Gesunden als auch beim Allergiker aus der gleichen Population naiver T-Zellen (21). Daher sind

allergenspezifische Th1 und T_{reg} auch bei allergischen Patienten durch die Verabreichung hoher Allergenmengen über einen längeren Zeitraum im Rahmen einer SIT theoretisch induzierbar (15),(17).

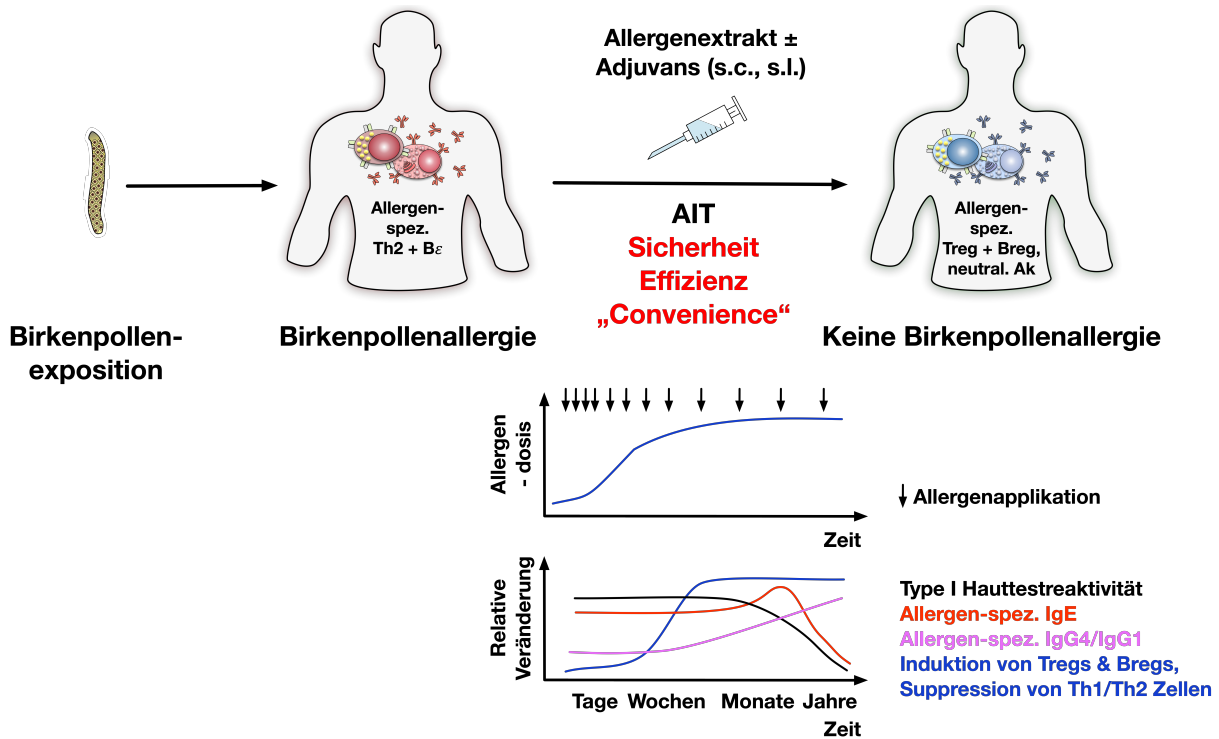


Abbildung 2 – Allgemeines Therapieprinzip und Verlauf der allergenspezifischen Immuntherapie (AIT): Durch wiederholte Allergenkonfrontation wird die Ausbildung allergenspezifischer regulatorischer B-Zellen (B_{reg}) und T_{reg} sowie die Induktion von Allergen-blockierenden Antikörpern und eine Reduktion der allergenspezifischen IgE-Bildung angestrebt.

Die Modulation dieser zellulären Komponente der Immunantwort durch Induktion von T_{reg} führt zudem zu einer veränderten humoralen Immunantwort mit Bildung allergenspezifischer IgG-Antikörper (15),(17),(21),(22). Diese binden das Allergen und verhindern (über eine sterische Blockierung der IgE Epitope) so eine IgE-vermittelte allergische Reaktion und reduzieren zusätzlich die Bildung von allergenspezifischem IgE (22). Studien belegen, dass insbesondere die Induktion von allergenspezifischen IgG4-Antikörpern zu einer anhaltenden Allergentoleranz über den Behandlungszeitraum mit den Allergenextrakten hinaus beiträgt (22),(23).

Über diese Mechanismen bewirkt die SIT eine Senkung der Symptomlast bis hin zur Symptombefreiheit und trägt so zur Verbesserung der Lebensqualität von Allergikern bei (24). Auch weitere Langzeiteffekte wie etwa eine Reduktion des Fortschreitens

der allergischen Rhinitis hin zu Asthma sind bei SIT-Anwendung beschrieben (24), (25).

Allerdings wird die Zugänglichkeit und Wirksamkeit gegenwärtiger Therapiemodelle für viele Patienten durch gleich mehrere entscheidende Faktoren limitiert: So besteht bei jeder SIT die Gefahr einer Induktion von allergischen Reaktionen (20) durch die verwendeten Allergenextrakte. In Verbindung mit einer langen Therapiedauer ergibt sich daher ein besonders hoher Compliance-Anspruch an die Patienten, der häufig mit einer niedrigen Therapieadhärenz einhergeht (10),(15). Die Qualität der Allergenextrakte bzw. die Unter- oder Überrepräsentation bestimmter Allergene in diesen stellt ein weiteres, nicht zu vernachlässigendes Problem dar (22).

Daraus und aus der zugrundeliegenden Pathologie bei Allergien ergibt sich zudem eine zusätzliche, schlechte Wirksamkeit der SIT bei polysensibilisierten Patienten (15),(17).

1.4. Neue Therapieoptionen zur Behandlung allergischer Erkrankungen

Aufgrund der oben beschriebenen Einschränkungen der SIT befinden sich verschiedene neue Therapiestrategien in Entwicklung, die das gemeinsame Ziel einer verbesserten, sichereren und nachhaltigeren spezifischen Immuntherapie verfolgen. Hierzu zählt die Verwendung von rekombinanten Allergenmolekülen, von Hypoallergenen oder von Peptid-basierten Impfstoffen, die Erprobung neuer Applikationsrouten wie etwa die intranodale oder transkutane Applikation oder die Verwendung neuer immunstimulierender Adjuvantien aus Bakterien und Viren (26). Darunter existieren auch verschiedene Ansätze, bei denen kein Allergenextrakt mehr verwendet wird, wie etwa bei DNA-basierten Impfungen, bei der Verwendung von Virus-ähnlichen Partikeln (*virus-like-particles*, VLP) oder bei Allergen-Adjuvans-Fusionsproteinen (15),(22),(27). Unabhängig von der gewählten Methode sind die übergeordneten Ziele der Allergiebehandlung stets eine Verbesserung der Sicherheit im Sinne einer Reduktion von unerwünschten Nebenwirkungen sowie die Verstärkung des therapeutischen Effektes und somit die Sicherstellung der Toleranzentwicklung. Zu diesem Zweck werden bei Impfungen zur Prävention infektiöser Erkrankungen schon seit längerem sogenannte Adjuvantien eingesetzt

(28). Unter einem Adjuvans versteht man dabei eine Substanz, die einem Impfstoff hinzugefügt wird, um die Immunreaktion gegen das betreffende Antigen zu verstärken (29).

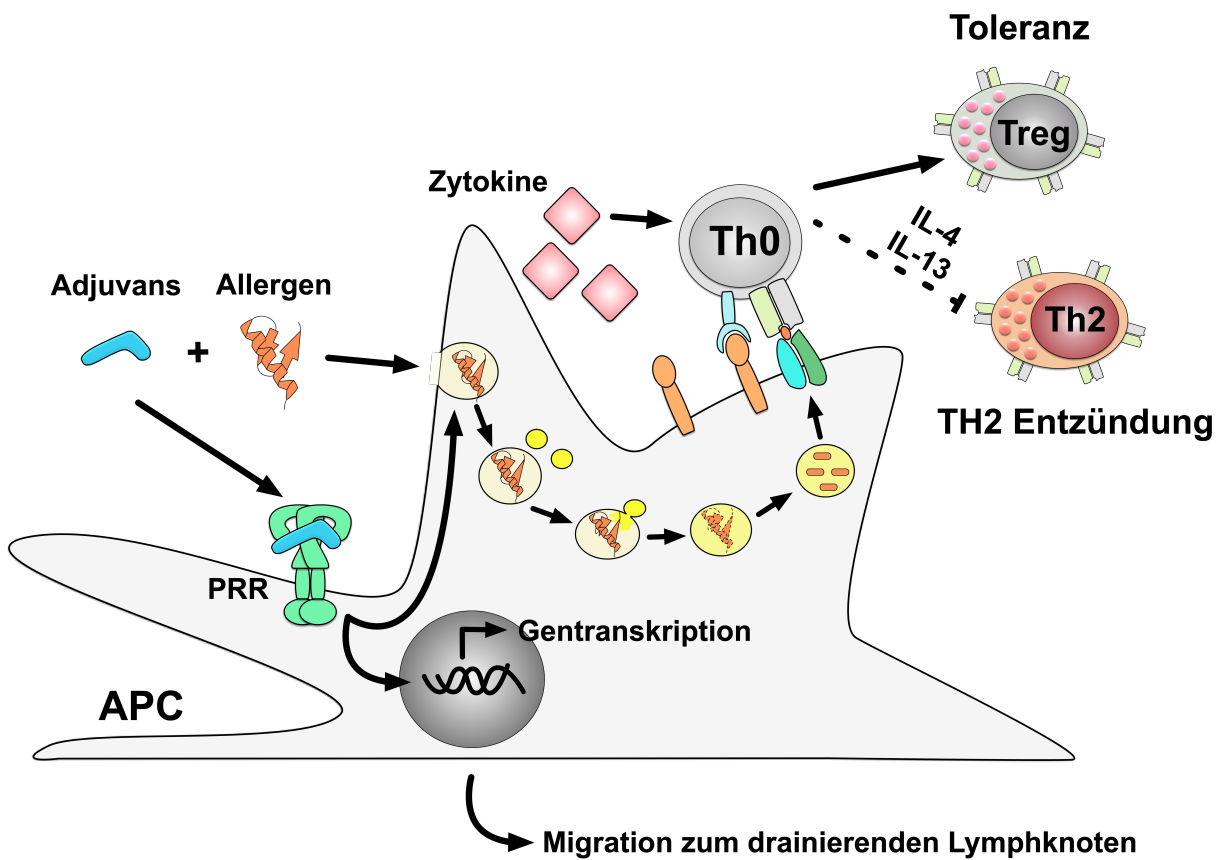


Abbildung 3 – Genereller Mechanismus der Immunmodulation durch Adjuvantien: Bei gleichzeitiger Konfrontation der APC mit einem Allergen und einem Adjuvans beeinflusst das Adjuvans die Prozessierung des Allergens und moduliert somit die resultierende Immunantwort.

Hieraus ergeben sich gleich mehrere Vorteile: So lässt sich sowohl die Anzahl der benötigten Immunisierungen als auch die in jeder Immunisierung enthaltene Antigen-Menge durch die Verwendung von Adjuvantien reduzieren. Gleichzeitig potenzieren sich die eingeleiteten Immunreaktionen, so dass selbst immunkompromittierte Bevölkerungsgruppen (Kinder, ältere Menschen, Immunsupprimierte) in der Theorie effektiv geschützt werden können (28). Die verstärkte Immunstimulation durch die Zugabe von Adjuvantien beruht dabei im Wesentlichen auf einer gezielteren Ansteuerung, Rekrutierung und Stimulation von antigenpräsentierenden Zellen des angeborenen Immunsystems (z.B. dendritische Zellen, DCs), was zu einer erhöhten Antigen-Aufnahme und Antigen-Prozessierung sowie zu einer beschleunigten Ausreifung dieser Zellen führt (siehe Abbildung 3) (30),(31). Die aktivierten APCs

wandern anschließend in den jeweils drainierenden Lymphknoten ab, um dort über die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen eine Verbindung zum adaptiven Immunsystem und somit zur Etablierung von langfristig schützenden Gedächtnisantworten herzustellen. Art, Umfang und Mechanismus der Aktivierung des angeborenen Immunsystems haben dabei entscheidenden Einfluss auf die resultierende B- und T-Zell-vermittelte adaptive Immunreaktion (28). Der Einsatz von Adjuvantien erlaubt somit über eine gezieltere Aktivierung von APCs die Induktion einer antigenspezifischen Immunantwort und die Etablierung protektiver Gedächtnisantworten.

1.5. Die Rolle von Adjuvantien als effektive Immunmodulatoren

Ein ideales Adjuvans muss dabei gleich mehrere Voraussetzungen erfüllen: Zum einen muss es sicher sein, darf also keine toxischen oder onkogenen Effekte aufweisen und allenfalls nur mit geringen unerwünschten Nebenwirkungen einhergehen (32). Zum anderen muss es eine einfache Applikation (z.B. intramuskuläre Injektion oder transoral) ermöglichen und auch unter verschiedenen Lagerungsbedingungen stabil sein (32).

Die ersten verwendeten und bis heute am häufigsten eingesetzten Adjuvantien sind Aluminium-Salze (Alum). Obwohl der eigentliche Mechanismus hinter den immunstimulatorischen Eigenschaften von Alum noch nicht vollständig geklärt ist (33), ist diese Substanzklasse aufgrund vielfach belegter Effektivität und Sicherheit weltweit als Adjuvans zugelassen (34). Alexander T. Glenny verwendete in den 1920er Jahren erstmals Alum, um die Immunogenität eines Diphtherie-Toxoidimpfstoffs zu erhöhen (35). Nur wenig früher, im Jahr 1906, war von dem Wiener Kinderarzt Clemens Peter Freiherr von Pirquet die "Allergie", abgeleitet vom griechischen "allos" (anders) und "ergon" (die Arbeit, die Reaktion), als eine veränderte Reaktivität auf körperfremde Substanzen definiert worden (36). Die erste spezifische Immuntherapie wurde 1911 von Leonard Noon bei Gras-Pollen-Allergikern durchgeführt (37).

Somit stehen die flächendeckende Einführung von Impfungen, die Verwendung von Adjuvantien sowie die Durchführung spezifischer Immuntherapien und damit

einhergehend das Erkennen von Allergien als potenziell behandelbare Erkrankungen historisch betrachtet in enger Verbindung zueinander. Die Impfung zur Prävention infektiöser Erkrankungen führte von Beginn des 20. Jahrhunderts über die folgenden Jahrzehnte, angetrieben durch ein hohes wissenschaftliches und medizinisches Interesse, zu einem der größten Erfolge der modernen Medizingeschichte, der einen seiner Höhepunkte 1980 in der durch die Welt-Gesundheits-Organisation (*World Health Organization*, WHO) erklärten Eradikation der Pocken fand (38). Im Vergleich dazu erscheinen die bezüglich der spezifischen Immuntherapie und Adjuvantien gemachten wissenschaftlichen Fortschritte bis zum Ende des 20. Jahrhunderts als eher gering (22),(33). Erst in jüngerer Vergangenheit haben die anhaltenden Schwierigkeiten mit der Erzeugung von Vakzinen gegen Erreger wie Tuberkulose, Malaria oder das Humane Immundefizienz-Virus (HIV) (39) die Grenzen der „einfachen Impfstoffe“ (40) des 20. Jahrhunderts aufgezeigt, deren Entwicklung auf rein empirischen Ansätzen beruhte. Ein insgesamt verbessertes Verständnis der immunologischen Prozesse sowie modernere labortechnische Arbeitsmethoden erlauben nun schon seit einigen Jahren eine evidenzbasierte Identifikation sowohl von Antigenen als auch von potenziellen Adjuvantien. So wurden in den letzten 20 Jahren neben Alum, das für mehr als ein halbes Jahrhundert das einzige zugelassene Adjuvans war, einige weitere Adjuvantien zur Verwendung im Menschen zugelassen (Aluminium-Salze, Öl-in-Wasser Emulsionen (MF59, AS03, AF03), AS04, Virosomen und Liposomen (AS01), CpG ODNs, siehe unten) (28).

1.6. Zugelassene Adjuvantien – Funktionsweise und Limitationen

Grundsätzlich lassen sich die zugelassenen Adjuvantien aufgrund ihres Wirkmechanismus in zwei Gruppen einteilen. (I) Mineralsalze, Emulsionen, Liposome oder Virosome dienen dabei als Transportsysteme, um das Antigen gezielter mit den Zielzellen in Kontakt zu bringen. (II) Die zweite Gruppe besteht aus Immunstimulatoren, die durch direkte oder indirekte Immunzellaktivierung die Immunantwort der Zielzellen beeinflussen (30),(32). Wie bereits erwähnt, ist Alum auch heute noch das am häufigsten verwendete Adjuvans. Es ist unter anderem in Impfstoffen zur Verhinderung von Diphtherie-, Tetanus-, Hepatitis B-Virus (HBV)-

und humanen Papilloma-Virus (HPV)-Infektionen oder dem azellulären Pertussis-Impfstoff enthalten (33). Dabei sind verschiedene Mechanismen beschrieben, über die Alum eine verstärkte Immunstimulation vermittelt. Bereits Alexander Glenny hatte einen Depot-Effekt und somit eine verzögerte und länger anhaltende Antigenfreisetzung durch Alum als ein entscheidendes Wirkprinzip postuliert (35). Neuere Forschungsergebnisse belegen jedoch, dass der Depoteffekt keine Rolle in der Immunstimulation spielt, da er nicht nachzuweisen ist (41). Unabhängig davon sind verschiedene andere immunmodulierende Eigenschaften wie etwa die verstärkte Antigen-Aufnahme durch APCs, Aktivierung des Inflammasoms, Interaktionen mit der DC-Zellmembran oder auch die Aktivierung des Komplementsystems durch Alum beschrieben (zusammengefasst in Shi *et al.* (33)). Die Verstärkung der B-Zellantwort findet dabei allerdings im Sinne einer erhöhten Th2-Aktivierung statt (42). Daher sind Aluminium-Salze als Adjuvantien zur Behandlung allergischer Erkrankungen im Rahmen der SIT ungeeignet, da diese darauf abzielt, entweder eine allergenspezifische Th1-getragene Immunantwort oder regulatorische T Zellen zu induzieren.

Auch die als Adjuvantien verwendeten Emulsionen lassen sich in zwei Gruppen einteilen: Wasser-in-Öl- und Öl-in-Wasser-Lösungen (32). Freund's Adjuvans ist eine Wasser-in-Paraffin-Öl Emulsion entweder mit (*Complete Freund's Adjuvant*, CFA) oder ohne (*Incomplete Freund's Adjuvant*, IFA) abgetötete Mykobakterien, die zuerst von Jules Freund in den 1930er Jahren eingesetzt wurde (32),(43),(44). CFA ist als potenter Auslöser einer Th1-Immunantwort beschrieben (43), dabei aber ebenso wie IFA aufgrund von toxischen Effekten und schweren lokalen Nebenwirkungen nicht im Menschen zugelassen (32),(44). Leroux-Roels beschreibt Freund's Adjuvans als einen der Gründe für die langsamen Fortschritte in der Adjuvans-Entwicklung, da dessen überschießende Reaktivität im Menschen zu einer Verunsicherung in der Adjuvansanwendung geführt habe (44). Diese, so Leroux-Roels, konnte erst durch ein tiefgehendes Verständnis des angeborenen und adaptiven Immunsystems überwunden werden (44).

Modernere Wasser-in-Öl Emulsionen wie Montanide (ISA51, ISA720), welche Mannitol-Monooleat als Detergens verwenden, wurden für die Anwendung im Menschen freigegeben und in klinischen Studien zur Adjuvantierung von HIV-, Malaria- und Krebs-Impfstoffen getestet (42),(45). Ähnlich wie Freund's Adjuvans sind auch ISA51 und ISA720 starke Immunaktivatoren, die allerdings durch ihre bisweilen

schweren lokalen Nebenwirkungen in ihrer klinischen Anwendung beschränkt sind (45).

Öl-in-Wasser Emulsionen, wie zum Beispiel MF59 (Squalen-basiert) oder das Adjuvans-System 3 (AS03, Squalen + Vitamin E), haben sich klinisch aufgrund ihrer guten Wirksamkeit und Verträglichkeit etabliert. So wird zum Beispiel MF59, eine Squalen-basierte Emulsion (42), die die Rekrutierung und Aktivierung von APCs verstärkt (46), in Influenza-Impfstoffen eingesetzt (47). AS03, ebenfalls eine Squalen-basierte Emulsion, die sich im Wesentlichen durch α -Tocopherol (Vitamin E) in der Zusammensetzung von MF59 unterscheidet (33),(46), wurde in der Impfung gegen die 2009 aufgetretene Schweinegrippe-Pandemie (H1N1) eingesetzt. In diesem Zusammenhang haben retrospektive Studien eine mögliche Verbindung zwischen einem Anstieg der Narkolepsie-Inzidenz und AS03 aufgezeigt, die immer noch diskutiert wird (48). Es verdeutlicht sich hier, wie wichtig die exakte Aufschlüsselung der immunologischen Wirkungsweise der Adjuvantien ist, um potenzielle Nebenwirkungen im Vorhinein zu vermeiden oder aber auch um im Nachhinein eine Verbindung zwischen Adjuvans und auftretenden Nebenwirkungen sicher ausschließen zu können.

Eine weitere Adjuvans-Klasse stellen die sogenannten Liposomen dar. Diese künstlich erzeugten Vesikel umschließen das Antigen mit einer Lipid-Doppelschicht und fungieren so als eine Art Antigen-Transporter (44). Insbesondere in den letzten Jahren lieferte der Malaria Impfstoff RTS,S/AS01, der mit AS01, also einer Mischung aus Antigen, Liposomen und dem detoxifizierten *Toll-like*-Rezeptor 4-Liganden Monophosphoryl-Lipid-A (MPLA) adjuvantiert ist, vielversprechende Ergebnisse. In Langzeitstudien konnte für RTS,S/AS01 jedoch leider kein anhaltender und ausreichender Impfschutz gegen Malaria belegt werden (49). Trotzdem zeigt sich hier, dass die Anwendung von Adjuvantien zur gezielten und bedarfsgerechten Stimulation des Immunsystems ein aussichtsreicher Ansatzpunkt für die Erstellung moderner Impfstoffe ist, der auch bei komplexeren Krankheitsbildern Wirkung zeigen könnte (49).

Wesentlich häufiger als Liposomen enthalten zugelassene Impfstoffe Virosomen, die in gewisser Weise als eine Weiterentwicklung der Liposomen verstanden werden können. Virosomen sind dabei sphärische, Nukleinsäure-freie, einschichtige Lipid-Vesikel, die zusätzlich die Influenza-Glykoproteine Haemagglutinin und Neuramidase auf ihrer Oberfläche tragen (46),(50). Dabei beruht die adjuvante Wirkung der

Virosomen höchstwahrscheinlich nicht nur auf dem Antigen-Transport und der gezielteren Antigen-Aufnahme und -Prozessierung durch APCs (50), sondern auch auf einer direkten, Thymus-unabhängigen Aktivierung von B-Zellen *in vivo*. In Mäusen konnte gezeigt werden, dass eine vor der Impfung bestehende Immunität gegen Influenza die Immunantwort auf das jeweils transportierte Antigen wesentlich verstärkt. Aufgrund der hohen Influenza-Durchseuchung der Bevölkerung lässt sich dieser Effekt im Menschen mangels Influenza-naiver Patienten allerdings praktisch nicht überprüfen (50). Beispiele für lizenzierte Virosom-Impfstoffe sind der Influenzaimpfstoff *Invivac*TM oder der Hepatitis A-Impfstoff *Epaxal*TM (44).

1.7. Entwicklung neuer Adjuvantien

Eine neuere Strategie, die auf eine gleichzeitige Stimulation der angeborenen und der adaptiven Immunantwort abzielt, ist die Ansteuerung von Mustererkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs). Bisher sind vier PRR-Subtypen beschrieben: (1) *Toll-like*-Rezeptoren (TLRs), (2) C-Typ-Lectin-Rezeptoren (CLRs), *retinoic acid-inducible gene-1-like receptors* (RIG-I-like receptors, RLRs) und *nucleotide-binding domain* (NOD)-like receptors (NLRs) (Tabelle 1) (51).

Tabelle 1 – Lokalisation der bisher beschriebenen Mustererkennungsrezeptor-Familien und die von ihnen erkannten Pathogen-assoziierten molekularen Muster (PAMPs).

Rezeptor-Familie	Lokalisation	Erkannte PAMPs
C-typ-Lectin Rezeptoren (CLRs)	Transmembran	Pathogen-assoziierte Zuckerstruktur
„Toll-like“ Rezeptoren (TLRs)	Transmembran/ zytoplasmatisch	Bakterielle, virale, Pilzproteine, Lipoproteine, Nukleinsäuren
NOD-like Rezeptoren (NLRs)	Zytoplasmatisch	Bakterielle Peptidoglykane
RIG-I-like Rezeptoren (RLRs)	Zytoplasmatisch	dsRNA von dsRNA- und ssRNA-Viren

Neben direkten Immunaktivatoren können also auch Substanzen als Adjuvantien eingesetzt werden, die von Immunzellen über PAMP-Rezeptoren erkannt werden

und so eine Immunstimulation bewirken. Aus dieser Gruppe werden TLR-Agonisten bisher am häufigsten als Adjuvantien verwendet. MPLA, als ein detoxifiziertes Derivat von bakteriellen Lipopolysacchariden (LPS), ist der erste im Menschen zugelassene TLR-Agonist (42). Durch strukturelle Modifikationen konnte für MPLA die TLR4-vermittelte Immunaktivierung von LPS bei einer gleichzeitigen Reduktion der toxischen Effekte erhalten werden (33). Auch wenn dadurch der Mechanismus der MPLA-vermittelten Immunstimulation nicht exakt dem von LPS entspricht (33), zeigt sich doch eine deutliche Aktivierung des Transkriptionsfaktors aktivierter B-Zellen (NF κ B), der mitogen-aktivierten Proteinkinasen (MAPKs), eine verbesserte APC-Ausreifung sowie daraus resultierend eine verstärkte Induktion von Th1-Immunantworten (42),(46),(52),(53). Daher wird MPLA in Verbindung mit Alum als AS04 (siehe unten) bereits erfolgreich als Adjuvans in Impfstoffen gegen HBV und HPV eingesetzt (33),(42). Die Zulassung von MPLA wird zudem auch für die SIT untersucht (*Pollinex*[®]), da gezeigt werden konnte, dass sowohl bei subkutaner als auch sublingualer Applikation von MPLA zusammen mit verschiedenen Allergenen eine langanhaltende Th1-Antwort mit Produktion von schützenden IgG4-Antikörpern gegen die jeweiligen Antigene induziert werden kann (54).

Eine weitere Gruppe von TLR-Agonisten, die als Adjuvantien eingesetzt werden, sind die sogenannten CpG-Motive, also kurze DNA-Abschnitte aus Cytosin und Guanin, die in unmethylierter Form typischerweise in bakterieller DNA auftreten und von dem PRR TLR9 als „fremd“ erkannt werden (33),(54). CpG-Oligodesoxynucleotide (CpG ODN) werden zum Beispiel in dem 2017 in den USA zugelassenen Hepatitis B-Impfstoff *HEPLISAV-B*[™] verwendet und induzieren dabei im Vergleich zu den bisher verfügbaren HBV-Impfstoffen mit Alum-Adjuvans eine schnellere und stärkere Immunantwort gegen das Hepatitis B-Hüllprotein (HBs)-Antigen (55). Obwohl die Anwendung von CpG ODN im Rahmen der SIT zunächst vielversprechende Ergebnisse lieferte (z.B. verstärkte Induktion einer allergenspezifischen Th1-Immunantwort), konnte in Langzeitstudien bezüglich der Induktion einer schützenden Immunantwort keine ausreichende Effektivität belegt werden (54). Es werden derzeit verschiedene Strategien untersucht, um die Immunogenität der CpG-Motive durch zum Beispiel die Administration über VLPs (56) oder Nanopartikel (57) zu verbessern.

Auch die TLR7/8-Agonisten Imiquimod und Resiquimod wurden aufgrund ihrer immunmodulatorischen Eigenschaften als potentielle Adjuvantien zum Einsatz in der

Immuntherapie erwogen (54). Allerdings limitieren auch hier schwere Nebenwirkungen (Emesis, Hepatotoxizität, Blutbildveränderungen) die systemische Anwendung dieser Substanzklasse auf eine rein topische Applikation bei HPV-assoziiierter Warzenbildung oder bei Hautkrebs (54).

Neben den TLR-Liganden werden momentan zudem verschiedene andere immunologisch aktive Substanzen wie z.B. Zytokine, bakterielle Toxine und Glykolipide auf ihre Adjuvans-Kapazität hin untersucht (33),(42),(58).

Ein neuer, vielversprechender Ansatz ist hierbei die Verwendung von Allergoid-Konjugaten mit nicht-oxidiertem Mannan aus *Saccharomyces cerevisiae* (Bäckerhefe) (59). Allergoide sind chemisch veränderte Allergene, bei denen durch Formaldehyd- oder Glutaraldehyd-Polymerisation große Allergen-Aggregate erzeugt werden (59). Dadurch kann die Immunogenität des Allergoids verbessert und gleichzeitig dessen Allergenität und somit die Gefahr von Nebenwirkungen reduziert werden (59). Durch die klinische Anwendung dieser hypoallergenen Makromoleküle zur Therapie allergischer Erkrankungen ist deren Wirksamkeit bereits belegt (60). Allerdings sind auch die Allergoid-basierten Immuntherapien in der Anwendung langwierig (10) und mit einem hohen Risiko unerwünschter Nebenwirkungen verbunden (10),(60). Die Glutaraldehyd-vermittelte Aggregation der Allergene erlaubt eine zusätzliche Konjugation von nicht-oxidiertem Mannan und damit eine über das Mannan vermittelte, gezieltere Bindung des Komplexes an CLRs auf humanen und murinen DCs unter Aufrechterhaltung der Hypoallergenität des Allergoids (59),(61). In präklinischen Studien resultierte hieraus eine verstärkte Aufnahme des Mannan-Allergoids mit erhöhter Expression des *programmed death ligand 1* (PD-L1) in humanen DCs sowie die verstärkte Freisetzung der Zytokine IL-6 und IL-10 (61). Für so aktivierte DCs konnte wiederum eine Induktion von Interferon (IFN)- γ sezernierenden Th1- und IL-10 produzierenden CD4⁺CD25^{high}CD127-Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen nachgewiesen werden, die zu einer Unterdrückung der allergenspezifischen Th2-Antwort und zur erhöhten Produktion von blockierenden, allergenspezifischen IgG2a-Antikörpern in Mäusen beitragen (61). Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse werden derzeit zwei Dosisfindungsstudien (Phase II) mit Mannan-Allergoiden für Graspollen und Hausstaubmilben (*house dust mites*, HDM) mit sowohl subkutaner als auch sublingualer Applikationsroute durchgeführt (59).

Ein weiterer oft genutzter Ansatz zur Potenzierung von Adjuvantien ist deren Kombination in sogenannten Adjuvans-Systemen (*adjuvant systems*, AS). Aktuell sind allerdings nur die bereits erwähnten Systeme AS03 (Squalen-in-Wasser + α -Tocopherol) in der Grippe-Impfung, AS04 (MPLA + Alum) in der HPV- und HBV-Impfung und AS01 in einem Herpes-Zoster-Impfstoff (*Shingrix*[®]) für den Menschen zugelassen (46),(62). Neben den laufenden klinischen Studien für AS01 in einem Malaria-Vakzin (62) werden auch andere Systeme wie AS15, welches gleich mehrere Adjuvantien (Lipsomen, CpG-Motive und MPLA) in der Krebsimmunotherapie kombiniert, auf ihre Effektivität und Sicherheit im Menschen hin untersucht (63).

Somit setzt sich die Liste der aktuell im Menschen zugelassenen Adjuvantien aus Aluminium-Salzen, Öl-in-Wasser Emulsionen (MF59, AS03, AF03), AS04 (MPLA + Alum), Virosomen, Liposomen (AS01) und CpG ODNs zusammen (33),(42),(46),(64). Aufgrund ihrer belegten Wirksamkeit und Sicherheit werden diese Adjuvantien dabei in vielen verschiedenen humanen Impfstoffen eingesetzt.

1.8. Risiken bei der Verwendung von einfachen Mixturen aus Adjuvans und Antigen

In der Regel werden Adjuvantien in Kombination mit den betreffenden Antigenen verabreicht und bewirken dabei eine separate Immunstimulation, welche dann wiederum die immunologische Verarbeitung des jeweiligen Antigens beeinflusst (siehe Abbildung 3) (33),(46). Adjuvans und Antigen werden also als zwei voneinander getrennte Moleküle appliziert. Reine Antigen-Extrakte, deren Erzeugung und Aufreinigung heutzutage in der Regel keine technische Herausforderung mehr darstellt, zeigen bei alleiniger Applikation eine eher geringe Immunogenität (58). Dabei wird bei modernen Allergenen unter anderem versucht durch Veränderung der IgE-bindenden Epitope oder durch die reine Verwendung von Toleranz-induzierenden Peptid-Fragmenten des betreffenden Allergens (ohne IgE-bindende Tertiärstruktur) die Sicherheit und Verträglichkeit dieser Allergene zusätzlich zu verbessern (65). Diese rekombinant modifizierten Allergene besitzen dabei jedoch eine in der Regel nur noch schwach ausgeprägte intrinsische Immunogenität, die

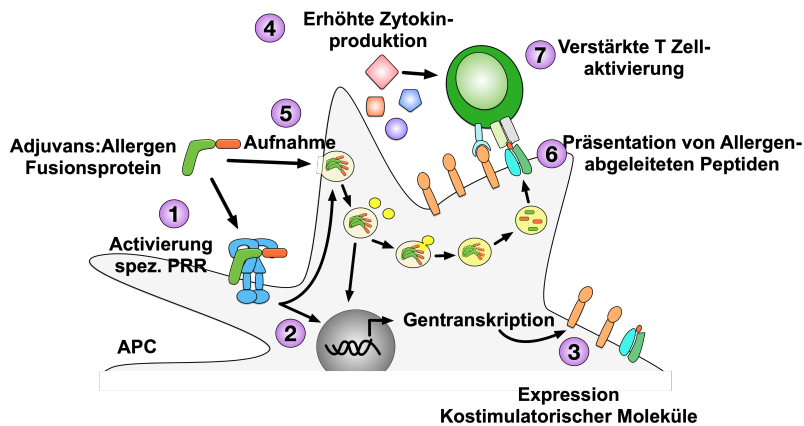
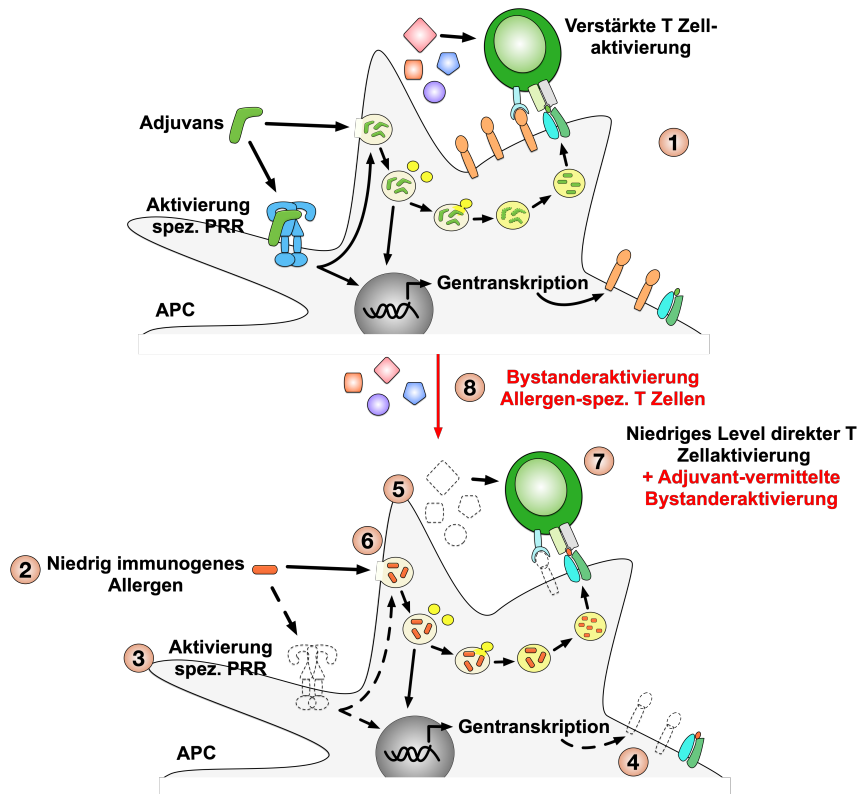
eine der Hauptursachen für die langwierigen Therapieregime der spezifischen Immuntherapie darstellt (66). Die gleichzeitige Applikation von Adjuvantien kann dabei die allergenspezifische Immunreaktion zwar verbessern, geht dann aber wieder mit einem erhöhten Risiko von unerwünschten Nebenwirkungen wie lokalen Entzündungen oder auch systemischer Toxizität einher (wie beispielsweise bei den TLR7/8-Agonisten Resiquimod/Imiquimod beobachtet, siehe auch Abschnitt 1.7 (54)). Ein weiterer Nachteil in der Verwendung einfacher Mixturen aus Allergen und Adjuvans besteht darin, dass nicht sichergestellt werden kann, dass jede APC auch beide Impfstoffkomponenten prozessiert. So kann es zu einer sogenannten *Bystander*-Aktivierung (67) kommen, bei der eine nur durch das Adjuvans aktivierte APC zur Aktivierung einer weiteren APC führt, welche allerdings nur das Allergen aufgenommen hat. Diese kann dann wiederum eine (für ein rekombinantes Allergen eigentlich nicht zu erwartende) starke, allergenspezifische T-Zell-Antwort im Sinne einer allergischen Reaktion verursachen (siehe Abbildung 4 B) (26). Darüber hinaus wird die *Bystander*-Aktivierung nicht-antigenspezifischer Lymphozyten durch Adjuvantien auch in der Entstehung von Autoimmunerkrankungen diskutiert (68).

1.9. Fusionsproteine kombinieren Adjuvans und Allergen in einem einzigen Molekül

Eine elegante Methode, um diese Probleme zu umgehen und dabei die hypoallergenen Eigenschaften eines rekombinanten Allergens noch effektiver mit dem immunmodulatorischen Potential des Adjuvans zu verbinden, ist die Verbindung beider Komponenten in einem Molekül. Adjuvans und Allergen werden dabei entweder durch chemische Konjugation oder durch rekombinante DNA-Technik zu einem Fusionsprotein (Adjuvans:Allergen) verbunden. Daraus ergeben sich gleich mehrere Vorteile (siehe Abbildung 4 A): (I) Zunächst erlaubt die Rezeptorspezifität des jeweils verwendeten Adjuvans eine genaue Ansteuerung der gewünschten Zielzelle (in der Regel APCs) mit dem Antigen *in vivo* (31),(69). (II) Zusätzlich ist dabei die gleichzeitige Stimulation der Zielzelle durch Adjuvans und Allergen in einem gleichbleibenden Verhältnis beider Komponenten zueinander aufgrund der Konjugation sichergestellt und erlaubt somit eine besser reproduzierbare

Immunstimulation ohne die Gefahr von *Bystander*-Effekten. (III) Zudem belegen verschiedene Studien, dass es Adjuvans-bedingt nicht nur zu einer Immunaktivierung, sondern auch zu einer verstärkten Aufnahme des Fusionsproteins durch die APCs kommt, welche wiederum mit einer, im Kontext der Adjuvans-vermittelten Immunzellaktivierung, sowohl in Qualität als auch in Quantität veränderten Antigenprozessierung und -präsentation einhergeht (31),(70). Die daraus resultierende erhöhte Immunogenität der Adjuvans:Antigen-Fusionsproteine im Vergleich zur einfachen Mischung von Adjuvans und Antigen begünstigt die Induktion von protektiven Immunantworten gegen das fusionierte Antigen bereits bei geringen Fusionsprotein-Mengen (69), (71), (72).

Adjuvans:Allergen-Fusionsproteine sind daher besonders attraktive Kandidaten für die Anwendung in der allergenspezifischen Immuntherapie, da sie das Potential besitzen, die Sicherheit, die Effektivität und somit insgesamt die SIT zu verbessern.

A**Adjuvans:Allergen Fusionsprotein****B****Adjuvans + Allergen Mischung**

Adjuvans aktivierte APCs (B1) allergenspezifische T-Zellen aktivieren (Bystanderaktivierung (B7, B8)). Durch alleinige Stimulation mit dem nur schwach immunogenen Allergen (B2) ohne Prozessierungsmodifikation über PRR-Ansteuerung (B3) und ohne Veränderung der Gentranskription (B4) entfällt die Expression ko-stimulatorischer Signale (B4) und die verstärkte Zytokinfreisetzung (B5). Es resultiert eine Allergie-induzierende Verarbeitung des Allergens (B6) mit einer schwachen, allergenspezifischen T-Zell-Aktivierung und der Gefahr der Bystanderaktivierung dieser T-Zellen (B7, B8).

Abbildung 4 A – Vorteile der Fusionsproteine gegenüber der Mixtur aus Adjuvans und Allergen: Die Verwendung von Fusionsproteinen erlaubt die gezielte Ansteuerung von APCs (A1) und garantiert die rezeptorgestützte (A1) oder endosomale (A5) Aufnahme beider Fusionsproteinkomponenten in einem definierten Verhältnis. Durch gleichzeitige Prozessierung von Allergen und Adjuvans kommt es zu einer rezeptorvermittelten Modifikation der Gentranskription (A2), der Expression ko-stimulatorischer Moleküle (A3), einer erhöhten Zytokinproduktion (A4) sowie der Präsentation eines größeren Spektrums von Allergen-abgeleiteten Peptiden (A6). Es resultiert eine verstärkte, modifizierte T-Zell-Antwort (A7).

Abbildung 4 B – Nachteile bei der Verwendung von Allergen-Adjuvans-Mixturen: Da in der Mixtur die gleichzeitige APC-Aktivierung mit Allergen und Adjuvans nicht sichergestellt ist, können nur durch das

1.10. Sipuleucel-T – Das erste im Menschen zugelassene Fusionsprotein

Das derzeit einzige in der Klinik zugelassene Fusionsprotein ist Sipuleucel-T (PROVENGE®) (73). Es handelt sich dabei um ein Fusionsprotein aus dem Antigen prostata-spezifische saure Phosphatase (*Prostatic acid phosphatase*, PAP) und dem hier als Adjuvans verwendeten Zytokin Granulozyten-/Makrophagen-Kolonie-stimulierenden Faktor (*granulocyte-macrophage colony-stimulating factor*, GM-CSF) (73), welches in der Behandlung von fortgeschrittenen Prostatakarzinomen eingesetzt wird. Dazu werden mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) eines Patienten mit dem Fusionsprotein *ex vivo* stimuliert und diesem anschließend wieder infundiert (73). Die dabei *ex vivo* aktivierten APCs bewirken dann eine verstärkte antigenspezifische Immunantwort gegen das Tumorgewebe *in vivo* (73), wodurch in Studien eine Verlängerung der Lebensdauer bei Hormon-resistenten Prostatakarzinomen von im Median um 4,1 Monate belegt werden konnte (74).

Auch wenn sich diese vielversprechenden Erkenntnisse in der Anwendung von Fusionsproteinen aus der Krebstherapie ableiten, zeigt sich hier eindeutig, dass die zielgerichtete Immunmodulation durch die Kombination von Adjuvans und Antigen in einem Molekül das Potential besitzt, den Verlauf immunologisch bedingter Erkrankungen und somit auch Allergien maßgeblich zu beeinflussen.

1.11. Adjuvans:Allergen-Fusionsproteine in der spezifischen Immuntherapie allergischer Erkrankungen

Es wurden bereits verschiedene Adjuvans:Allergen-Fusionsproteine als potenzielle Therapeutika für die SIT beschrieben (zusammengefasst in Blanco-Pérez *et al.* (26)), die sich im Wesentlichen durch das verwendete Adjuvans bzw. durch den jeweiligen, die Immunstimulation vermittelnden Mechanismus unterscheiden. Grundsätzlich lassen sich diese Adjuvans:Allergen-Fusionsproteine dabei in 6 Gruppen einteilen: (I) Bakterielle, (II) virale oder (III) aus Pilzen gewonnene Proteine, (IV) CpG-Oligodesoxynukleotide (CpG ODN), (V) die Verwendung des *modular antigen translocation* (MAT)-Moleküls sowie die (VI) Zerstörung allergenspezifischer, IgE-tragender Zellen durch Allergen:Diphtherie-Toxin-Fusionsproteine (26).

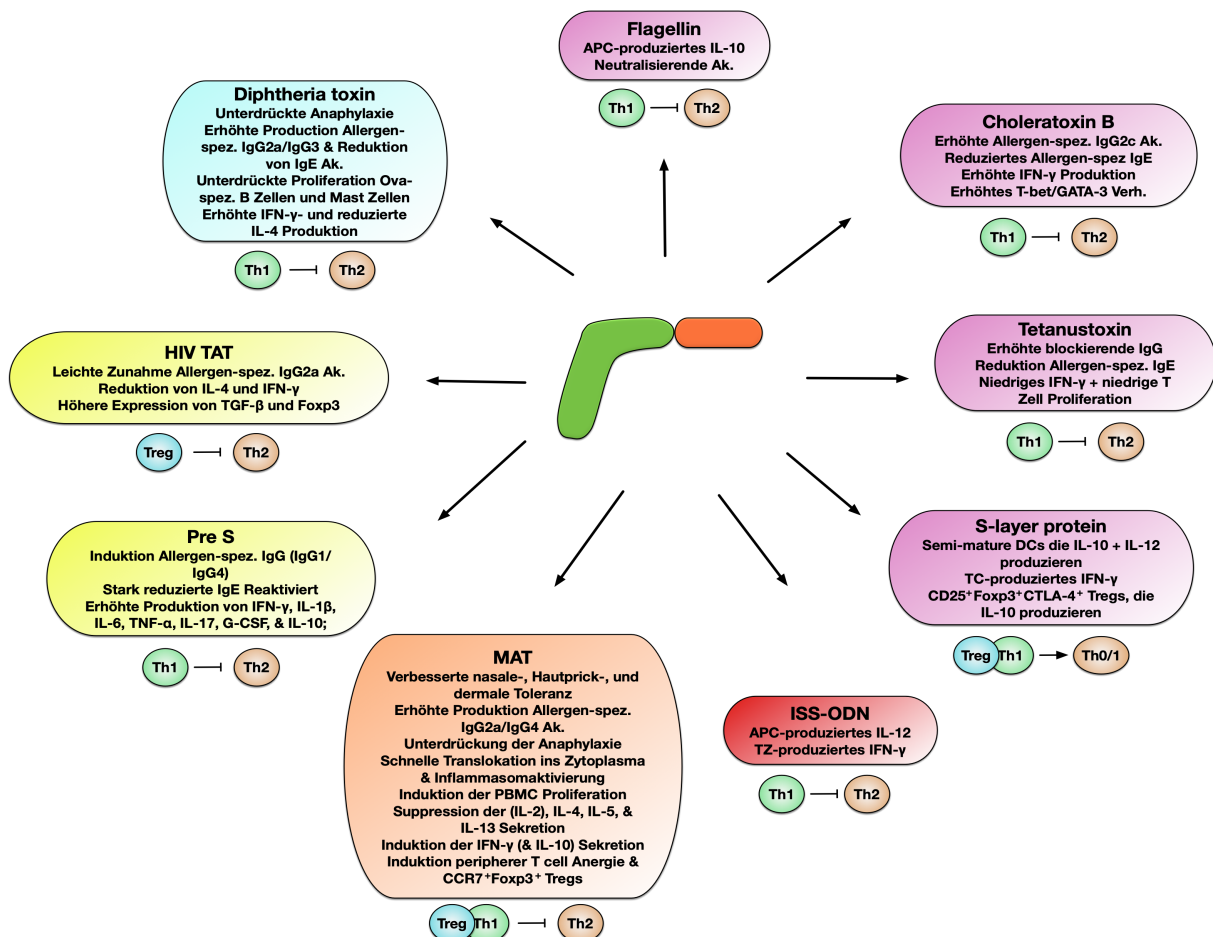


Abbildung 5 – Übersicht der bisher beschriebenen Adjuvans:Allergen-Fusionsproteine. Für nähere Erläuterung siehe Text. Stumpfe Pfeile zeigen eine Hemmung, spitze Pfeile eine Verstärkung an.

So wurden beispielsweise die immunmodulatorischen Eigenschaften von PreS, einem Oberflächenprotein des Hepatitis B-Virus, in Verbindung mit verschiedenen Allergenen beschrieben (75),(76),(77),(78). Sowohl mit Katzen-Allergenen (75) als auch mit dem Birkenpollen-Allergen Bet v 1 (76) und verschiedenen Grasspollen-Allergenen (BM32: Rekombinantes Vakzin mit PreS-Fusionsproteine aus den Timothy-Grasspollen-Allergenen Phl p 1, Phl p 2, Phl p 5, Phl p 6) (77),(78) zeigen diese PreS:Allergen-Fusionsproteine eine stark reduzierte Allergenität sowie eine veränderte T-Zell-Antwort mit Induktion von allergenspezifischen IgG-Antikörpern sowohl im Tier-Modell (75),(76) als auch im Menschen (77),(78).

Auch für das aus HIV gewonnene *trans-activating regulatory* Protein (TAT) konnte in Fusion mit dem *Chenopodium album* (weißer Gänsefuß) Pollenallergen (Che a 3) eine Immunmodulation nachgewiesen werden (79). In einem murinen Rhinitis-Modell zeigte sich dabei nach sublingualer Applikation des Fusionsproteins rTAT:Che a 3 eine Verstärkung der T_{reg}-vermittelten Immunantwort und somit eine Unterdrückung der allergischen Reaktion (79).

MAT-Moleküle werden durch Fusion von HIV-TAT mit der sogenannten *invariant chain* (Ii) als Ligand für den humanen Histokompatibilitätskomplex II (MHCII) erzeugt (80). MAT-Allergen-Fusionsproteine können so TAT-vermittelt leichter in die Zellen gelangen und führen dann intrazellulär zu einer über die *invariant chain* vermittelten, verstärkten Allergen-Präsentation über MHCII (80). So konnte bei der *ex vivo*-Stimulation von PBMCs allergischer Patienten mit verschiedenen MAT-Allergen-Fusionsproteinen (inklusive entweder des Birkenpollenallergens Bet v1, des Katzen-Allergens Fel d 1, des HDM-Allergens Der p 1 oder des Bienengift-Allergens PLA₂) gezeigt werden, dass diese Proteinkomplexe zu einer verstärkten Sekretion von typischen Th1-Zytokinen und des immunsuppressiven Zytokins IL-10 führen und hierdurch eine allergenspezifische Th2-Immunantwort unterdrücken (80). In einer klinischen Studie mit einem MAT-Fel d 1-Fusionsprotein konnte bei Katzen-Allergikern bereits nach dreimaliger intranodaler Applikation (intralymphatische Immuntherapie, ILIT) innerhalb von 2 Monaten eine Toleranzinduktion gegen eine nasale Provokation mit Katzenhaarallergen-Extrakt nachgewiesen werden, wie sie bei der gängigen subkutanen SIT in der Regel erst nach mindestens 30 Injektionen über einen Zeitraum von 3 oder mehr Jahren zu beobachten ist (81). Zudem traten über den gesamten Studienzeitraum keine schwerwiegenden Nebenwirkungen auf (81). Zaleska *et al.* konnten in einer darauf aufbauenden Studie zeigen, dass diese

Toleranzentwicklung auf der Induktion von allergenspezifischen T_{regs} beruht und mit einer allergenspezifischen peripheren T-Zell-Toleranz, einer Veränderung im Histamin-Rezeptor-Profil und einer Reduktion von Fel d 1-spezifischen T-Zellen einhergeht (82).

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse mit viralen Adjuvans:Allergen-Fusionsproteinen ist der weitaus größte Teil der in Fusionsproteinen eingesetzten Adjuvantien bakteriellen Ursprungs.

Neben der adjuvanten Verwendung von bakteriellen Toxinen wie etwa der Cholera-Toxin-Untereinheit B (83) und dem Tetanus-Toxoid (84) oder der Allergenfusion mit bakteriellen Oberflächen-Proteinen (*surface layer proteins*, S-Layer Proteine) (85) ist vor allem der Einsatz von TLR-Agonisten in Adjuvans:Allergen-Fusionsproteinen präklinisch ein häufig gewählter und gut beschriebener Ansatz.

Die 2006 von Creticos *et al.* veröffentlichten Ergebnisse einer klinischen Phase-II-Studie zeigten, dass die sechsmalige Injektion mit einem Fusionsprotein aus dem Beifuß-Allergen Amb a 1 und dem TLR9-Liganden CpG ODN zu einer signifikanten und langanhaltenden Reduktion der Rhinitis-Symptome in allergischen Patienten führen kann (86). Allerdings bestätigten sich diese vielversprechenden Beobachtungen in klinischen Phase-III-Studien nicht (87), so dass sich der Fokus in der Anwendung von CpG ODNs als Adjuvantien im Rahmen der SIT - wie bereits erwähnt - auf andere Ansätze verlagerte (z.B. in Kombination mit VLPs (56) oder Nanopartikeln (57)).

Auch der TLR4-Liganden MPLA zeigt nach Fusion mit einem Allergen starke, immunmodulierende Eigenschaften (52). So führte die Stimulation von murinen mDCs mit einem Fusionsprotein aus MPLA und dem Hühnerei-Allergen Ovalbumin (MPLA:Ova) zu einer, im Vergleich mit der MPLA + Allergen Mixtur, eindeutig überlegenen Zytokinsekretion (52). Bei der gleichzeitigen Stimulation von mDCs und CD4⁺ DO11.10 T-Zellen zeigte sich allerdings, dass die MPLA:Ova-induzierte Immunantwort zur gleichzeitigen Induktion von allergenspezifischen Th1-, Th2- und Th17-Zellen ohne eindeutige Gewichtung führte (52). Es ist daher anzunehmen, dass die starke und Subtyp-unabhängige T-Zellaktivierung durch MPLA:Ova bei Allergikern zu einem nicht akzeptablen Nebenwirkungsprofil führt. Trotz alledem könnten MPLA-Fusionsproteine für Krebs-Therapien weiterhin interessant sein, da dort eine generelle, antigenspezifische Immunaktivierung von Vorteil sein kann, um die immunologische Toleranz gegenüber dem Tumor zu brechen (52).

Ein weiterer, ebenfalls häufig genutzter Ansatz zur Verbesserung der SIT durch Adjuvans:Allergen-Fusionsproteine ist die Verwendung des TLR5-Agonisten Flagellin (53),(88) als adjuvante Komponente. Die sich daraus ergebenden Vorteile sowie die vielversprechenden klinischen Ergebnisse werden im Folgenden genauer diskutiert.

2. Einleitung

2.1. Flagellin ist ein vielversprechendes Adjuvans zur Anwendung in Adjuvans:Allergen-Fusionsproteinen

Der TLR5-Ligand Flagellin (88), ein Motilitätsprotein und Hauptbestandteil des bakteriellen Flagellums, erweist sich als besonders interessanter Kandidat für die Entwicklung von Adjuvans:Allergen-Fusionsproteinen.

Da es sich bei Flagellin um ein gut beschriebenes Protein handelt, gestaltet sich die Erstellung von Fusionsproteinen aus Flagellin und Antigenen oder Allergenen mit Hilfe moderner DNA-Rekombinationstechniken unkompliziert. Solche Fusionsproteine können durch das Adjuvans (Flagellin) gezielt TLR5-positive APCs mit dem an das Flagellin gebundene Allergen in Kontakt bringen und dabei gleichzeitig aktivieren (69). Aufgrund dieses Potentials wurden bereits verschiedene flagellinbasierte Impfstoffe zur Behandlung von Erkrankungen wie Influenza (89), (72), Pocken (90), Tetanus (91) oder auch *Pseudomonas*-Infektionen (92) auf ihre klinische Anwendbarkeit hin getestet. Dabei wurde für Flagellin sowohl die Sicherheit als auch die Wirksamkeit als Adjuvans nachgewiesen (93),(94). Die genetische Fusion des aus *Salmonella* gewonnenen Flagellin C in Verbindung mit ansonsten nur gering immunogenen (93), rekombinanten M2e-Peptiden (M2 stellt hierbei eine Untereinheit des *Influenza A* Matrix-Proteins M2 dar) konnte so zum Beispiel effizient die Bildung schützender Antikörper induzieren, ohne dabei schwere Nebenwirkungen bei jungen Erwachsenen in einer Interventionsgruppe zu induzieren (93).

Neben dieser Anwendung in krankheitsspezifischen, prophylaktischen Impfstoffen zur Induktion protektiver Gedächtnisantworten machen die intrinsischen immunstimulierenden und immunmodulatorischen Eigenschaften der Flagellin-Fusionsproteine diese aber auch für die Behandlung von IgE-vermittelter Typ 1 Allergien interessant (71),(95),(96),(97).

So beschreiben Kitzmüller und Kollegen eine verstärkte Immunogenität, reduzierte Allergenität sowie eine dem in der Studie verwendeten Flagellin:Allergen-Fusionsprotein eigene, adjuvante Immunmodulation in humanen mDCs und in T-

Zellen allergischer Patienten (95). Die verwendeten Fusionsproteine zeigten dabei eine reduzierte allergenspezifische IgE-Bindung, eine verstärkte mDC- und T-Zell-Aktivierung sowie eine zu Gunsten der IgG-Bildung verschobene Immunantwort im Vergleich zur einfachen Stimulation mit dem Allergen alleine oder auch im Vergleich zur Stimulation mit dem Proteingemisch aus Flagellin und Allergen (95).

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen wird auch in vielen weiteren Studien die potentere Immunstimulation durch Flagellin-Fusionsproteine im Vergleich zur einfachen Mischung aus Flagellin und Antigen beschrieben (71),(72),(90),(91),(92). Zusammengenommen deuten diese Ergebnisse aus klinischen (93),(94) und *in vitro* (95),(97) Studien darauf hin, dass flagellinbasierte Fusionsproteine vielversprechende Impfstoff-Kandidaten für unterschiedlichste Erkrankungen darstellen. Die genauen zugrundeliegenden molekularen Mechanismen der beschriebenen Immunmodulation sind dabei jedoch noch weitestgehend unbekannt. In der unmittelbaren Vorarbeit zu diesem Forschungsprojekt zeigten Schülke *et al.* die immunmodulatorischen Eigenschaften eines Fusionsproteins bestehend aus dem TLR5-Liganden Flagellin A (von *Listeria monocytogenes*) und dem Haupt-Birkenpollen-Allergen Bet v 1 (FlaA:Betv1) (97). Birkenpollen stellen dabei besonders im Frühjahr eine relevante Allergenquelle für Allergiker in Nord-Europa und Nord-Amerika dar (98). Da bis zu 95% der Baumpollen-Allergiker auf Bet v 1 mit einer erhöhten, allergenspezifischen IgE-Freisetzung reagieren (98), ist die Entwicklung neuer Therapiestrategien zur Behandlung der Birkenpollen-Allergie von höchster klinischer Relevanz.

In Übereinstimmung mit den Ergebnissen von Kitzmüller *et al.* (95) zeigte das untersuchte rFlaA:Betv1 immunaktivierende und -modulierende Effekte sowohl *in vivo* als auch *in vitro*, gemessen an der Ausschüttung pro- und anti-inflammatorischer Zytokine von murinen myeloiden dendritischen Zellen (mDCs) und PBMCs von Birkenpollen-Allergikern (97). Schülke *et al.* zeigten weiter, dass dabei die vermehrte Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10- zu einer Suppression der allergenspezifischen Th1- und vor allem der Th2-Antworten führte (97). Gleichzeitig ging die Immunaktivierung der mDCs durch das Fusionsprotein mit einer ausgeprägten Aktivierung des Glukosestoffwechsels in den untersuchten dendritischen Zellen einher (97), bei der das durch eine verstärkte aerobe Glykolyse akkumulierende Laktat zu einer pH-Veränderung und damit einem Farbumschlag des Kulturmediums führte. Dieses zuerst in Krebszellen von Otto Warburg beschriebene

Phänomen wird auch als Warburg-Effekt bezeichnet (99),(100) und wird mechanistisch durch eine Aktivierung des *mammalian target of rapamycin* (mTOR)-Komplexes vermittelt.

2.2. Die Stoffwechselaktivierung sowie die IL-10 Sekretion von mDCs nach Stimulation mit rFlaA:Betv1 ist mTOR-abhängig

Der mTOR-Komplex fungiert als ein zentraler Regulator zwischen Zellproliferation unter adäquaten Bedingungen oder Zellzyklusarrest und Autophagie bei Stress oder Nährstoffmangel (101). In dieser Schlüsselrolle integriert mTOR unterschiedliche stoffwechselrelevante (Insulin-Signalkaskade, Aminosäure- und Adenosintriphosphat (ATP)-Status der Zelle) und immunologische Signale (u.a. TLR-vermittelte Signale) (102) über eine Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3K)-vermittelte Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) und der daraus resultierenden Aufhebung der Inhibition des mTOR1-Komplexes (mTORC1) durch den *Tuberous sclerosis complex 1/2* (TSC1/2) (102). Der so aktivierte mTORC1 trägt dann durch die Phosphorylierung der *downstream* gelegenen p70 S6-Kinase (p70 S6k) zur Modifikation der Proteinbiosynthese und des Zellstoffwechsels bei (siehe Abb. 17) (103).

Auch die rFlaA:Betv1-induzierte mTOR-Aktivierung in mDCs führte zu einer Rapamycin-sensitiven Phosphorylierung der p70 S6-Kinase, zu einer Steigerung des zellulären Glukosestoffwechsels der Zellen und zur Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 (97).

Bei Inhibition der mTOR-Aktivierung mit Rapamycin, einem spezifischen Inhibitor des mTOR1-Komplexes, zeigte sich in rFlaA:Betv1-stimulierten mDCs ein dosisabhängiger Rückgang der anti-inflammatorischen IL-10-Sekretion, während die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α weitestgehend unbeeinflusst blieben (97). Eine Ausnahme bildete dabei IL-12, welches bei zunehmender IL-10-Supprimierung durch Rapamycin dosisabhängig verstärkt freigesetzt wurde, was eine reziproke Regulation beider Interleukine vermuten lässt (97). Neben der Zytokinsekretion erwies sich auch der Glukoseverbrauch der mDCs nach Stimulation mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 als mTOR-abhängig und konnte ebenso wie der Warburg-Effekt dosisabhängig durch Rapamycin gehemmt werden (97).

2.3. Der Warburg-Effekt als Ausdruck der übermäßigen mDC-Aktivierung beeinflusst die anti-, nicht aber die pro-inflammatorische Zytokinsekretion

Der Warburg-Effekt ist ein zuerst bei Krebszellen beschriebenes Phänomen. Er beruht auf einer Dysregulation des Energiestoffwechsels, bei der Zellen trotz ausreichender Verfügbarkeit von Sauerstoff die vorhandene Glukose nicht über den Citratzyklus (Krebs-Zyklus) in den Mitochondrien, sondern in einer „aeroben Glykolyse“ im Cytoplasma zu Laktat umsetzen (siehe Abbildung 6) (99).

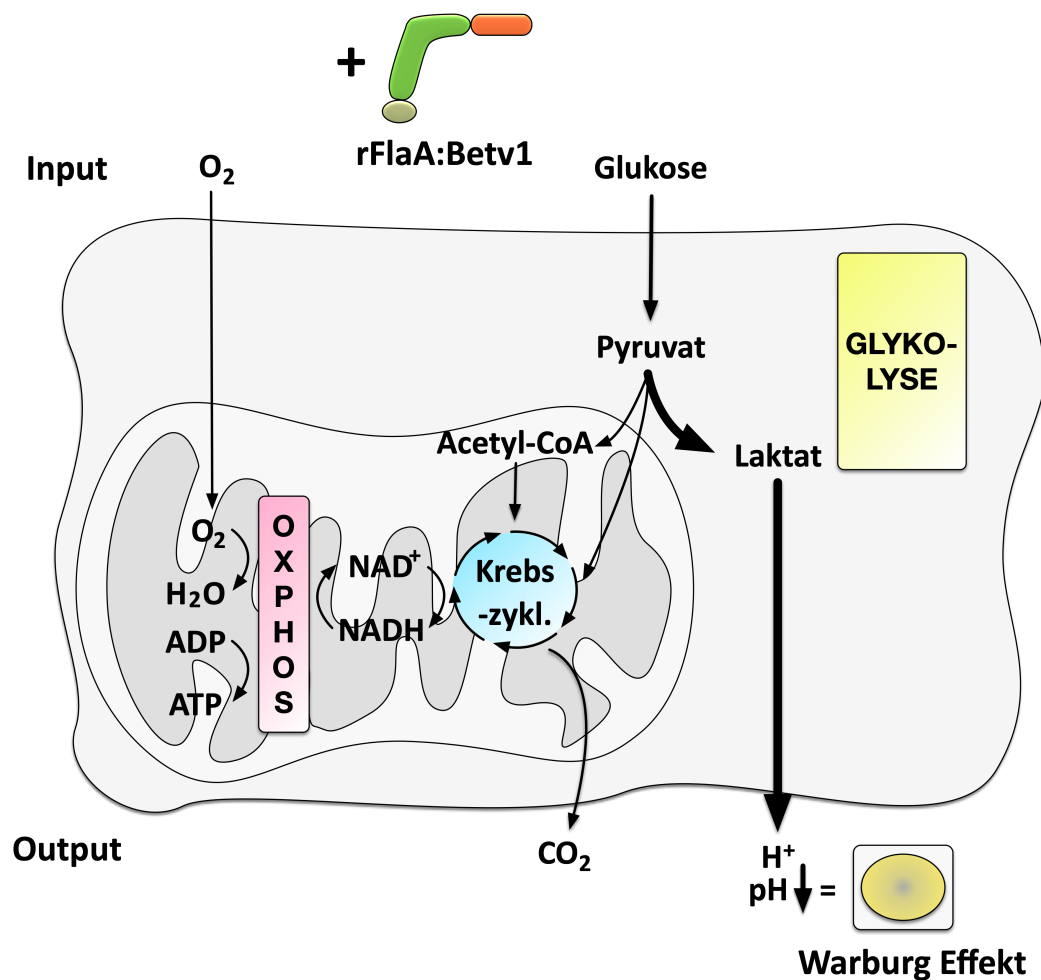


Abbildung 6 – Der Warburg-Effekt: Tumorzellen, aber auch stark aktivierte Immunzellen (z.B. mDCs nach Stimulation mit rFlaA.Betv1) setzen die vorhandene Glukose auch unter O₂-Verfügbarkeit nicht über den intramitochondrialen Krebs-Zyklus und die oxidative Phosphorylierung (OXPHOS) um. Stattdessen wird das aus der Glukose gewonnene Pyruvat intrazytoplasmatisch unter H⁺-Anfall zu Laktat abgebaut. Der resultierende pH-Abfall kann durch eine Farbveränderung des Kulturmediums sichtbar gemacht werden.

Die übermäßige Akkumulation von Laktat bewirkt dabei einen Abfall des pH-Wertes im Medium der Zellkultur. Auch wenn die genauen Ursachen bzw. die Funktionalität des Warburg-Effekts noch Gegenstand aktueller Forschungen sind (104), (105), so zeigen sich doch eindeutige Parallelen im metabolischen Profil zwischen rasch proliferierenden Tumorzellen und aktivierten Immunzellen (105). Interessanterweise konnten Schülke *et al.* zwar feststellen, dass die anti-inflammatorische IL-10-Sekretion über mTOR mit der Stoffwechselaktivierung der mDCs und somit auch mit dem Warburg-Effekt verknüpft ist (97). Die pro-inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α zeigten sich jedoch mTOR-unabhängig (97).

Um zu verstehen, in welchem Zusammenhang die pro-inflammatorische Zytokinsekretion und die Stoffwechselaktivierung der mDCs nach Stimulation mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 stehen, ist also die Untersuchung weiterer Signalkaskaden notwendig.

2.4. Das Inflammasom als Vermittler von Entzündungsreaktionen des angeborenen Immunsystem

Seit der ersten Beschreibung des Inflammasoms durch Tschopp *et al.* (106) hat sich das Wissen um den Aufbau, die Aktivierung und die Funktion dieses Multiproteinkomplexes stetig vergrößert. Ein Grund dafür ist in der doppelten Schlüsselrolle des Inflammasoms in der Vermittlung von Entzündungssignalen zu finden: Es hat sowohl eine Funktion in der Wahrnehmung von intrazellulären Krankheitserregern als auch in deren Bekämpfung über die nachgeschaltete Ausschüttung der Zytokine IL-1 β und IL-18 als potente Mediatoren entzündlicher Reaktionen (106),(107),(108),(109). Aufgrund dieser wichtigen Doppel-Funktion und eines möglichen Beitrags zu verschiedenen Krankheitsbildern stellt das Inflammasom ein vielversprechendes Forschungsgebiet für ein breites Spektrum an Pathogen-assoziierten, metabolischen, neoplastischen, autoimmunen, entzündlichen und auch allergischen Erkrankungen dar (107),(108),(110). Ausgangspunkt der Inflammasomaktivierung sind dabei Proteine aus der *nucleotide-binding oligomerization domain* (NOD), *leucine-rich repeat* (LRR)-*containing* (NLR)-Familie,

die wie die TLRs ebenfalls zu der Gruppe der *pattern-recognition receptors* (PRRs) gehören (108),(109).

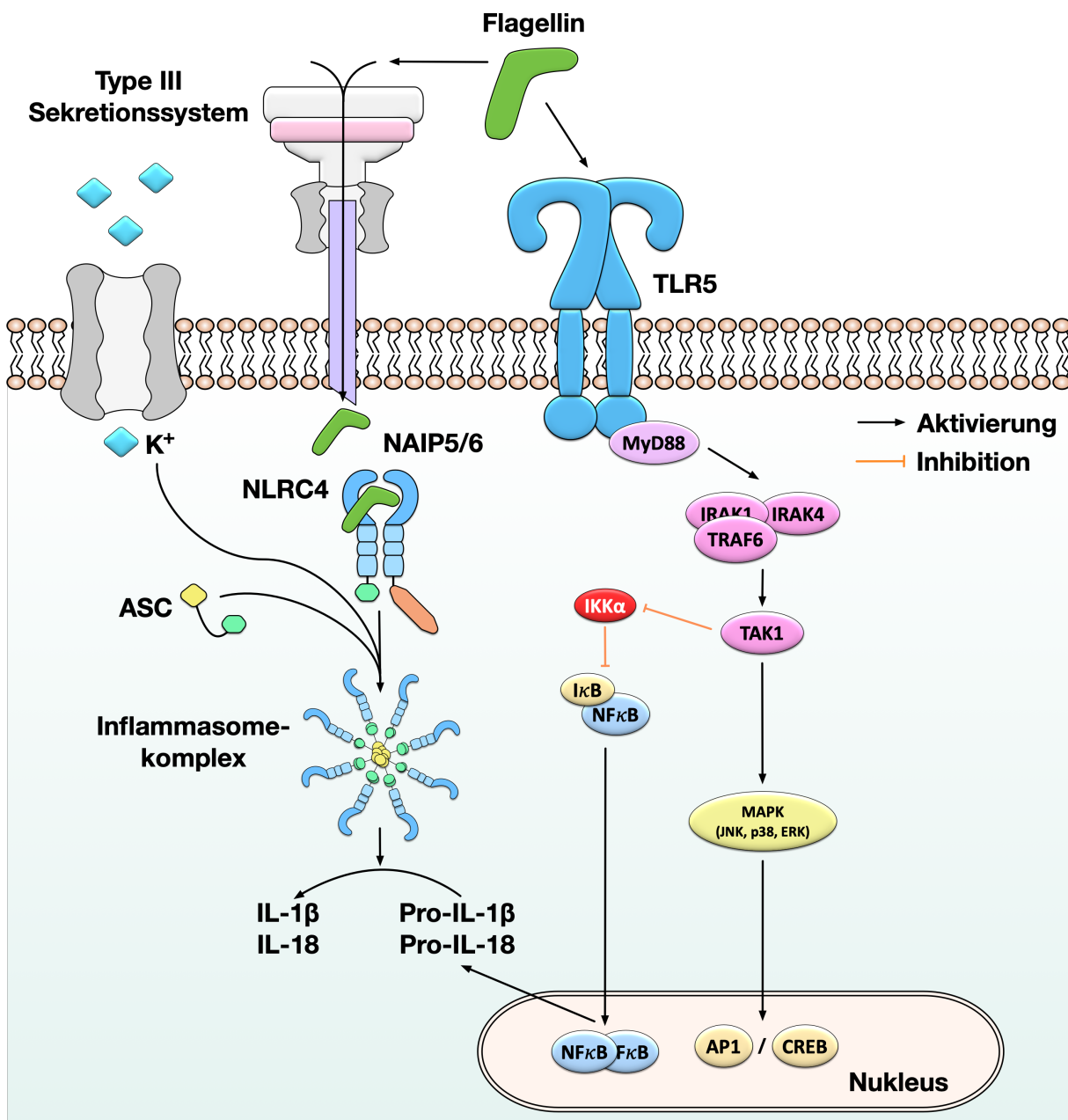


Abbildung 7 – Aktivierung des Inflammasoms: Verschiedene Mechanismen wie etwa ein erhöhter K⁺-Efflux, die Erkennung bakterieller Typ-III-Sekretionssysteme (T3SS) oder die Erkennung von intrazytoplasmatischem Flagellin über NAIP5/6 führen zu einer Aktivierung des Inflammasoms. Nach der Rekrutierung von NLRC4 durch NAIP5/6 lagern sich mehrere NAIP5/6-NLRC4-Komplexe mit ASC zu einem radspeichenförmigen Inflammasom zusammen. Die dabei autoproteolytisch aktivierte Caspase 1 überführt dann pro-IL-1β und pro-IL-18 in ihre wirksamen Formen. Die verstärkte Transkription der Zytokinvorstufen wird durch eine verstärkte NFκB-Aktivierung vermittelt (siehe auch Abbildung 8).

Sie sind ausschließlich im Zytoplasma gelegene Sensormoleküle für eine Vielzahl von Stimuli. NLRs (auch: *NOD-like receptor*) erkennen intrazelluläre Pathogene oder pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*, z.B. Flagellin über NLRC4, s.u.) oder Gefahrensignale (DAMPs: *danger-associated molecular patterns*, z.B. intrazellulären Kaliummangel über das NLRP3-Inflammasom, s.u.) und leiten dann eine Oligomerisation mit dem ASC-Protein (auch PYCARD, *Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD*) ein (109). ASC, bestehend aus einer *caspase recruitment domain* (CARD) und einer *pyrine domain* (PYD), dient dabei als Brücke zwischen dem *upstream* gelegenen intrazellulären Sensormolekül und der *downstream* gelegenen Caspase 1, die dann durch Bindung und Autoprozessierung in ihre aktive Form überführt wird (106),(109). Für die intrazelluläre Erkennung von sowohl Flagellin als auch von bakteriellen *type 3 secretion systems* (T3SS) sind bei Mäusen *NOD-like receptor family, apoptosis inhibitory proteins 5/6* (NAIP 5/6) als verantwortliche PRRs beschrieben und stellen somit einen wichtigen Auslöser der angeborenen Immunantwort gegen diese Stimuli dar (111),(112),(113) (Abbildung 7).

Die NOD-Untereinheit von NAIP5/6 erkennt und bindet dabei das Flagellin direkt (114). Durch die Bindung ihres Liganden aktiviert, rekrutieren NAIP 5 oder 6 das *NLR family, CARD domain-containing protein 4* (NLRC4, auch IPAF) und aktivieren es ebenfalls. Aktives NLRC4 bindet ASC durch CARD-CARD-Interaktion (CARD von NLRC4 und CARD von ASC) (109). An die PYD-Domäne des gebundenen ASC lagert sich ein weiteres ASC-Molekül an (über PYD-PYD-Interaktion), so dass die nun freie CARD-Region des ASC-Moleküls Pro-Caspase-1 rekrutieren kann, welche sich dann auto-proteolytisch aktiviert (109). Mehrere dieser NAIP-NLRC4-Proteinkomplexe lagern sich im Zytoplasma der betreffenden Zelle zu einem radspeichenförmigen NLRC4-Inflammasom zusammen (115), das durch die aktivierten Caspasen pro-IL-1 β und pro-IL-18 zu deren aktiven Formen IL-1 β und IL-18 spaltet (106), (109).

Neben der intrazellulären Erzeugung pro-inflammatorischer Zytokine kommt es durch die vermehrte Aktivierung der Caspase 1 (aber auch durch Caspase 4, 5 im Menschen und Caspase 11 in der Maus) zusätzlich zur Spaltung von Gasdermin D (GSDMD) (116). Das dabei entstehende N-terminale Fragment (GSDMD-N) induziert dann die Pyroptose der Zelle, eine Art des programmierten Zelltodes, der durch die Lyse der Zellmembran charakterisiert ist (117) und daher eine entscheidende Rolle

bei der Freisetzung der intrazytoplasmatisch erzeugten Zytokine und somit der Einleitung von Immunantworten spielt (116),(118).

Wie in Abbildung 7 dargestellt, sind noch weitere Signalkaskaden an der Immunaktivierung beteiligt. Sowohl die MAPKs als auch Nf κ B nehmen Schlüsselfunktionen bei der Verarbeitung einer Vielzahl von pro-inflammatorischen Reizen ein (119), (120), (121), (122), weshalb diese Signalwege später noch einmal genauer beschrieben werden (siehe auch Abbildung 8).

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die rFlaA:Betv1-induzierte Immunmodulation in murinen mDCs weitestgehend TLR-5-unabhängig vermittelt wurde (97), sollte hier durch unspezifische Inhibition des Inflammasoms untersucht werden, ob die NLR-Inflammasom-Interleukin-Signaltransduktionsachse zu der rFlaA:Betv1-induzierten pro-inflammatorische Zytokinausschüttung in den stimulierten mDCs beiträgt.

2.5. Die rFlaA:Betv1-vermittelte Immunreaktion ist MyD88-abhängig

Auch wenn durch Schülke *et al.* bereits gezeigt werden konnte, dass die Stimulation von mDCs mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 TLR5-unabhängig verläuft, so wurde in der gleichen Arbeit belegt, dass *myeloid differentiation primary response 88* (MyD88) eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung der Immunreaktion spielt (siehe Abbildung 8) (97).

MyD88 stellt dabei ein entscheidendes Adapterprotein zwischen der Registrierung inflammatorischer Reize z.B. über „Toll“-Like Rezeptoren oder den Interleukin-1-Rezeptor (IL-1R) und der Weiterleitung des aktivierenden Signals in den Zellkern der betreffenden Zelle über die Interleukin-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK) dar (123). Vorergebnisse von Schülke *et al.* legen zudem nahe, dass MyD88 ebenfalls essentiell für die intrazelluläre Signalverarbeitung von phagozytierten Fusionsproteinen ist (97). Aktiviertes MyD88 bildet einen Komplex (auch Myddosome genannt) mit IRAK4 (124) und rekrutiert sowie aktiviert IRAK1, welches sich dann wiederum nach Autophosphorylierung (125) vom MyD88-IRAK4-Komplex abspaltet (125). Phosphoryliertes IRAK1 lagert sich mit dem TNF-Rezeptor-assoziierten Faktor 6 (TRAF6) zusammen, was mit einer Polyubiquitinierung der *Transforming growth factor- β -activated kinase-1* (TAK1) und Rekrutierung der TAK-bindenden Proteine

(TAB) 1, 2 und 3 einhergeht (120), wobei der genaue Mechanismus der TAK1-Aktivierung noch nicht vollständig geklärt ist (119),(126),(127).

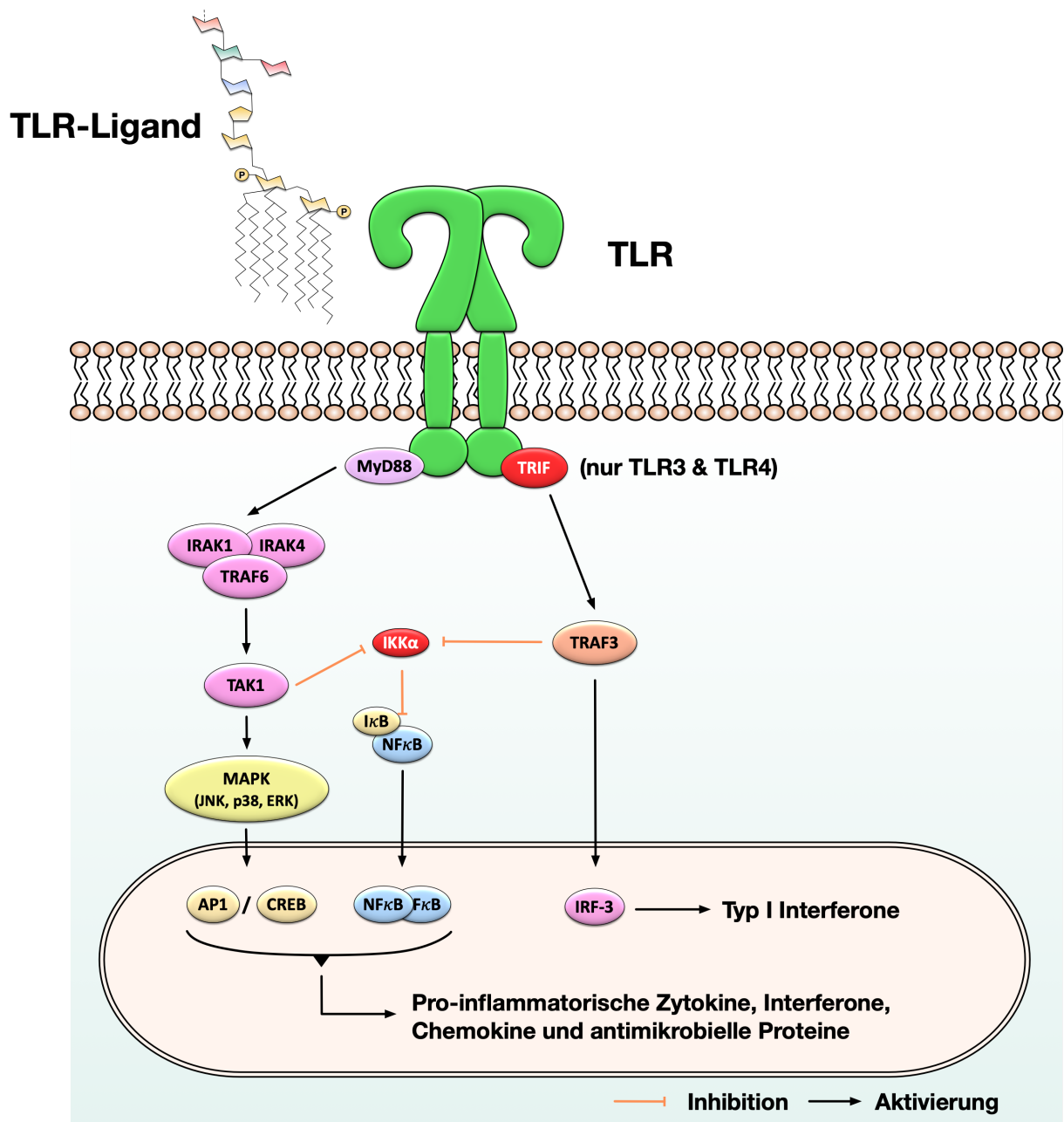


Abbildung 8 – Die TLR-Signalkaskade führt zu einer Aktivierung der MAPKs und von NFκB: TLR-Rezeptor-vermittelte Signale (mit der Ausnahme von TLR3 und 4) führen über MyD88, IRAK1, IRAK4 und TRAF6 zu einer Aktivierung von TAK1. TAK1 wiederum inhibiert IKK, wodurch die IκB-vermittelte Hemmung von NFκB reduziert wird. Es resultiert somit eine Aktivierung von NFκB. Neben NFκB initiiert TAK1 (als MAP3K) auch die MAP-Kinase-Signalkaskade. Dabei sind hauptsächlich 3 MAPK in die Vermittlung pro-inflammatorischer Reize verwickelt: Die JNK, die p38 sowie die ERK (auch P42/44). Über die MAPKs und NFκB bewirkt die TLR-Signalkaskade so eine pro-inflammatorische Zellantwort.

TAK1 (auch Mitogen-aktivierte Protein-Kinase Kinase Kinase, MAP3K) initiiert selbst zwei weitere Signalkaskaden: zum einen die der MAP Kinasen, die später (Abschnitt 5.6) genauer beschrieben wird, und zum anderen die NF κ B-Kaskade (119),(120), (121),(122). Hierzu aktiviert TAK1 die katalytische alpha (IKK α) und beta (IKK β) Untereinheit der *inhibitor of kappa B* (I κ B)-Kinase (IKK) im Zusammenspiel mit der regulatorischen Untereinheit IKK γ (auch NEMO: *NF κ B essential modulator*) (128). IKK phosphoryliert anschließend den an NF κ B gebundenen I κ B, was zu dessen Abbau und zur Aktivierung von NF κ B führt.

Unter den MAP Kinasen lassen sich insbesondere für inflammatorische Reize drei Hauptsignaltransduktionspfade innerhalb der MAPK-Kaskaden abgrenzen: (I) Kinasen, die extrazelluläre Signale integrieren (*extracellular signal-regulated kinases*, ERKs, auch: p42/44), (II) Stress-Signal-aktivierte Kinasen (*stress-activated protein kinases/c-Jun N-terminal kinases*, SAP/JNK) und (III) die p38 MAPK vermittelte Zellaktivierungen (129),(130).

Es erscheint somit wahrscheinlich, dass entweder die NF κ B-, die MAPK- oder beide Signalkaskaden gleichzeitig in die pro-inflammatorische Zytokinsekretion der mDCs nach Stimulation mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 verwickelt sind.

2.6. Hypothese/Zielsetzung

Während in Vorarbeiten die rFlaA:Betv1-induzierte IL-10 Sekretion in dendritischen Zellen als mTOR-abhängig gezeigt werden konnte, blieb die Regulation der rFlaA:Betv1-vermittelten pro-inflammatorischer Zytokinfreisetzung in diesen Vorstudien noch weitestgehend ungeklärt und war deshalb Gegenstand dieser Forschungsarbeit.

Das Ziel war dabei die mechanistische Untersuchung der Signaltransduktionswege, welche zur rFlaA:Betv1-vermittelten Aktivierung des Stoffwechsels und der pro-inflammatorischen Zytokinproduktion muriner myeloider Dendritischer Zellen nach Stimulation mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 beitragen.

Auf Basis der aktuellen Literatur wurden deshalb eine Beteiligung der Inflammasom-, der NF κ B- sowie der MAPK-Signalkaskaden zu der rFlaA:Betv1-vermittelten mDC Aktivierung unter Verwendung entsprechender Inhibitoren untersucht.

3. Material und Methoden

3.1. Rekombinante Proteine

Das in dieser Arbeit verwendete rekombinante Flagellin A von *Lysteria monozytogenes* (FlaA, Acc. No: NC_003210) wurde wie in (131) beschrieben hergestellt. Die Herstellung des rekombinanten Birkenpollenallergens Bet v 1 (Acc. No: X15877.1) erfolgte gemäß (132). Das Fusionsprotein FlaA:Betv1 wurde per cDNA Fusion der beiden Komponenten FlaA und Bet v 1 erstellt (97) und alle Proteine als 6-fach His-getaggte Konstrukte in den Expressionsvektor pET15b kloniert, in *E. coli* DE3 Expressionszellen exprimiert und mittels zwei-stufiger Affinitätschromatographie aus den Inklusionbodies aufgereinigt. Alle Proteine wiesen einen Reinheitsgrad >95%, eine korrekt gefaltete Sekundärstruktur und einen Endotoxingehalt < 1,14 pg/µg Protein (rFlaA), < 0,48 pg/µg Protein (rBet v 1), und < 1,7 pg/µg Protein (rFlaA:Betv1) auf. Die Proteine standen für die hier vorgestellte Doktorarbeit bereits aus Vorstudien zur Verfügung. Arbeitsschritte in Bezug auf die Erstellung sowie die Aufreinigung und Überprüfung der strukturellen Integrität aller genannten rekombinanten Proteine wurden nicht durch den Doktoranden selbst durchgeführt. Die oben genannten Erkenntnisse beruhen auf Vorarbeiten zu dieser Dissertation.

3.2. BCA-Proteinmessung

Proteinkonzentrationen der verwendeten rekombinanten Proteine wurden nach dem Auftauen bzw. Rekonstituieren für jede neue Charge kontrolliert. Hierzu erfolgte jeweils ein BCA-Test (Bicinchoninsäure, Pierce, BCA Protein Assay Kit Ref#23227, Lot#21753) nach den Vorgaben des Herstellers. Auf einer 96-Well-Platte wurden eine Standard-Verdünnungsreihe mit 8 Stufen (2000 µg/ml - 25 µg/ml BSA (bovines Serum-Albumin)) und einer Negativkontrolle sowie die zu testenden Proben jeweils in Tripilkaten zu 25 µl pro Well vorgelegt. Anschließend wurden jedem Well 200 µl der

frisch angesetzten Reagenzlösung (50:1 Verhältnis Stammlösung A:Stammlösung B) hinzugefügt, die Platte anschließend abgedeckt und bei 37°C für 30 Minuten inkubiert.

Stammlösung A:

10 g/L Natriumbicarbonat, 20 g/L Natriumcarbonat, 1,6 g/L Natriumtartrat, 4 g/L Natriumhydroxid, 9,5 g/L Natriumhydrogencarbonat, pH-Wert auf 11,25 mit Natriumhydroxid eingestellt

Stammlösung B:

40 g/L Kupfersulfat-Pentahydrat

Die Messung beruht dabei auf der sogenannten Biuret-Reaktion (133), bei der Peptidbindungen von Proteinen in alkalischem Milieu Cu^{2+} -Ionen zu Cu^{1+} -Ionen reduzieren (bei Raumtemperatur vor allem durch die Aminosäurereste Cystein, Cystin, Tryptophan oder Tyrosin), so dass ein Farbumschlag der Lösung zu dunkelviolett auftritt. Nach kurzem Abkühlen der Platte auf Raumtemperatur wurde die Extinktion der jeweiligen Wells am ELISA-Reader (SpectraMax Plus 384, Molecular Devices, San Jose; USA) bei 562 nm bestimmt. Durch Abgleich mit dem Standard konnte so die Proteinmenge der jeweiligen rekombinanten Proteinlösung quantitativ bestimmt und bestätigt werden.

3.3. Mäuse

Alle verwendeten Mäuse (BALB/c Jackson Laboratories, Bar Harbor, Maine, USA) wurden unter spezifisch pathogenfreien Bedingungen in den Tierställen des Paul-Ehrlich-Institutes gehalten und die Experimente unter Einhaltung der in Deutschland geltenden Tierschutzgesetze durchgeführt.

3.4. Gewinnung von mDCs aus Mausknochenmark und Zellkultur

Die Mäuse wurden euthanasiert und Tibia sowie Femur in einer Sterilwerkbank präpariert. Anschließend wurden die Knochen eines Beines für 30 Sekunden in 70% Ethanol sterilisiert und die Epiphysen mittels Schere entfernt, ohne die Knochen zu zerbrechen. Danach wurden die Knochen mit 4 ml Medium (RPMI 1640, Gibco, Karlsruhe, Deutschland) in einer Petrischale ausgespült. Hierzu wurde eine sterile Kanüle (Sterican®, Braun, 26G) in den Knochenmarkskanal eingeführt, um diesen dann mit ausreichend Druck durchzuspülen. Die in 8 ml gelösten Zellen eines jeden Beines wurden nach mehrmaligem Auswaschen der Petrischalen in 15 ml Falcons (Cellstar®, Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich) überführt und bei Raumtemperatur und 1200 Umdrehungen pro Minute (RPM) für 5 Minuten zentrifugiert. Die Überstände wurden verworfen, das entstandene Pellet aufgeschüttelt und die roten Blutzellen in 1,5 ml 0,86% Amoniumchlorid (Sigma Aldrich, Steinheim, Deutschland) lysiert. Um die Reaktion zu beenden, wurden Zellen und Amoniumhydrochlorid nach einer Minute erneut mit 9 ml Medium gewaschen, wie oben zentrifugiert und die Überstände verworfen. Die gesamten Zellen einer Maus wurden dann in 6 ml Kulturmedium (RPMI Medium 1640 (Fisher Scientific, Schweden) mit zusätzlich 10% FCS (*Fetal Calf Serum*, Sigma-Aldrich), Natriumpyruvat (1 mM, Sigma-Aldrich), HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, 10 mM, PEI), Penicillin (100 U/ml, PEI), Streptomycin (1 mM, PEI), L-Glutamin (1 mM, PEI), 2-Mercaptoethanol (0,01 mM, Sigma-Aldrich) überführt und die Zellzahl der Suspensionen anschließend mikroskopisch bestimmt. Hierzu wurden 20 µl der jeweiligen Zelllösungen in einem 1:8 Verhältnis in Trypanblau 0,4% (Sigma-Aldrich) in PBS (phosphatgepufferte Salzlösung: 1,5 mM KH_2PO_4 , 8 mM NaHPO_4 , 137 mM NaCl, 3 mM KCl pH 7,2; PEI) verdünnt und in einer Zählkammer (Neubauer Optic Labor, Lancing, UK; 0,1 mm Tiefe, 0,0025 mm²) über vier Quadranten ausgezählt und arithmetisch gemittelt. Je nach Anzahl wurden die Zellen wie folgt auf TC-Zellkulturflaschen (Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland) verteilt und mit 100 ng/ml GM-CSF (PEI) zum Wachstum angeregt: Bis zu einer Zellzahl von $<1,5 \times 10^7$ Knochenmarkszellen wurden diese in einer T25-Kulturflasche in 5 ml Kulturmedium ausgesät. Bei einer Zellzahl zwischen $1,5 \times 10^7$ und $3,0 \times 10^7$ Zellen wurde eine T75-Kulturflasche mit 15 ml Kulturmedium verwendet. Ab einer Zellzahl $>3,0 \times 10^7$ wurde eine T175-Kulturflasche mit 35 ml Kulturmedium verwendet (siehe Tabelle 2).

Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank (Heraeus Co2 Incubator, BBD 6220, Thermo Scientific, Waltham, USA) bei 37°C, 5% CO₂ und 80% relativer Luftfeuchte für 8 Tage inkubiert.

Tabelle 2 – Einteilung der Zellkulturen nach Zellzahl/ml

Zellzahl (total)	Kulturflasche	Kulturvolumen	GM-CSF Menge pro Flasche
<1,5x10 ⁷	T25	5 ml	25 µl
1,5 – 3,0x10 ⁷	T75	15 ml	75 µl
>3,0x10 ⁷	T175	35 ml	175 µl

An Tag 3 wurden für T25-Kulturen 3 ml, für T75-Kulturen 5 ml und für T175-Kulturen 12 ml Kulturmedium ausgetauscht (siehe Tabelle 3). Hierzu wurden jeder Kultur das beschriebene Volumen unter sterilen Bedingungen an einer Werkbank entnommen. Die darin enthaltenen Zellen wurden bei Raumtemperatur und 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert, die entstandenen Überstände verworfen, das Pellet aufgeschüttelt und in den jeweils benötigten Mengen an Kulturmedium gelöst. Nach Zugabe von GM-CSF (siehe Tabelle 3) wurden die Zellen wieder in ihre jeweiligen Kulturflaschen überführt und im Inkubator gelagert. Nach dem gleichen Vorgehen wurden an Tag 4 und Tag 7 abermals für T25-Kulturen 5 ml, für T75-Kulturen 12ml und für T175-Kulturen 18 ml Kulturmedium ausgetauscht. Am 8. Tag wurden die Zellen durch auf- und abpipettieren geerntet und wie unter den Abschnitten „Stimulation von mDCs mit rFlaA:Betv1“ und „Stimulation von mDCs mit rFlaA:Betv1 und Inhibitoren“ beschrieben stimuliert.

Tabelle 3 – Protokoll zum Austausch des Kulturmediums und zur Stimulation mit GM-CSF nach Zellzahl/ml

Kulturflasche	Tag 3 (30% des Mediums)		Tag 4 und 7 (50% des Mediums)	
	Medium	GM-CSF	Medium	GM-CSF
T25	2 ml	+ 10 µl	3 ml	+ 15 µl
T75	5 ml	+ 25 µl	8 ml	+ 40 µl
T175	12 ml	+ 60 µl	18 ml	+ 90 µl

3.5. Toxische und intrinsische Aktivität der verwendeten Inhibitoren

Um auszuschließen, dass Messergebnisse bei Stimulation der mDCs mit den verschiedenen Inhibitoren auf einem direkten Einfluss der Inhibitoren beruhen, wurden alle Inhibitoren in Bezug auf ihre zytotoxische, immunogene und stoffwechselrelevante Wirkung sowie auf ihre optimale Wirkungskonzentration hin untersucht. Als Orientierung diente der von den jeweiligen Herstellern vorgeschlagene Konzentrationsbereich. BALB/c mDCs wurden in Nährmedium mit den jeweiligen Inhibitoren in unterschiedlichen Konzentrationen über 24 Stunden inkubiert. Danach wurden die Zellen samt Medium unter mehrmaligem Spülen des jeweiligen Wells abpipettiert, in 1,5 ml Eppendorf-Gefäßen überführt und bei Raumtemperatur für 6 Minuten bei 6000 RPM zentrifugiert. Die zellfreien Überstände wurden zu 220 µl auf 96-Well-Platten aufgeteilt, beschriftet und zur späteren Auswertung bei -20°C eingefroren (s.u.). Die Zell-Pellets wurden dem Protokoll des Farbstoffherstellers entsprechend in 0,5 ml PBS (PEI) gelöst, in FACS-Röhrchen überführt und mit 1 µl *Fixable Viability Dye* eFluor® 780 (eBioscience™, Thermo Fisher Scientific, Deutschland) pro Probe auf einem Vortexer durchmischt. Die Proben wurden anschließend bei 4°C unter Lichtschutz für 30 Minuten inkubiert. Durch Hinzugabe von 1 ml FACS-Puffer (PBS + 10 mg/ml bovines Serumalbumin (BSA) + 0,3% Natriumsäure + 24 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)) und erneutem Zentrifugieren (5 Minuten, 1200 RPM, Raumtemperatur) wurden überschüssige Farbstoffreste entfernt. Es folgte das Lösen der Pellets in 200 µl FACS-Puffer und Fixierung mit 50 µl 4% PFA (Paraformaldehyd, PEI) je Probe. Die Toxizitätsmessung am FACS-Gerät erfolgte zeitnah nach dem Fixieren (ca. 15 min). Ergebnisse sind den Abbildungen 1 bis 3 im Anhang zu entnehmen.

Um sicherzustellen, dass keiner der verwendeten Inhibitoren eine ihm eigene immunogene oder stoffwechselrelevante Wirkung auf die mDCs hatte, wurden die aus dem oben beschriebenen Versuchsaufbau gewonnenen Überstände auf eine Sekretion der Zytokine IL-1β, IL-6, IL-10, IL-12, TNF-α sowie auf Restglukose im Medium und auf den Warburg-Effekt hin überprüft (Ergebnisse nicht gezeigt). Das Vorgehen entsprach dabei den unter „Zytokinanalyse mittels ELISA“ und „Analyse der Glukosekonzentration im Zellkulturmedium“ beschriebenen Protokollen.

3.6. Stimulation von mDCs mit rFlaA:Betv1

Am 8. Tag nach Gewinnung der BALB/c mDCs aus murinem Knochenmark wurde die Zellkonzentration der Kulturen - wie bereits beschrieben - lichtmikroskopisch bestimmt. Nach Zentrifugation der Zellen wurde durch Hinzugabe der entsprechenden Menge an Nährmedium die Zellzahl auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt (nachfolgend als Standardkonzentration bezeichnet). In jedes für den Versuchsaufbau benötigte Well wurden 500 μ l Zellsuspension übertragen. Die Zellen wurden dann jeweils in Duplikaten mit den verschiedenen Stimulanzen (rBet v 1; rFlaA; rFlaA + Bet v 1 oder rFlaA:Betv1) in einer 3-stufigen Verdünnung (siehe Tabelle 4) in äquimolarer Menge versetzt, wobei die Stimulanzen selbst in 2-facher Konzentration in 500 μ l Kulturmedium gelöst waren. Es ergab sich somit eine Stimulation von 5×10^5 Zellen/ml mit äquimolarer Menge der verschiedenen Proteine. Zudem wurden Duplikate für die Negativkontrolle (500 μ l Zellsuspension + 500 μ l Medium) sowie die Positivkontrolle (500 μ l Zellsuspension + 10 μ g LPS (10 μ l einer LPS-Konzentration von 10 μ g/ml, Sigma-Aldrich) + 490 μ l Kulturmedium angelegt. Der gesamte Versuchsaufbau wurde für 72 Stunden bei 37°C, 5% CO₂ und 80% relativer Luftfeuchte in einem Brutschrank (Heraeus, BBD 6220, Thermo Scientific, Waltham, USA) inkubiert.

Tabelle 4 – Protokoll für die Stimulation von Zellen in Standardkonzentration mit den einzelnen Proteinen, der Mixtur und dem Fusionsprotein

Probe	Probenkonzentration [$\mu\text{g}/\text{ml}$]	Probenvolumen [μl]	Kulturmedium [μl]	Verdünnung
Negativkontrolle			500	
LPS	10	10	490	
rBet v 1	10	500		unverdünnt
rBet v 1	1	500		1:10
rBet v 1	0,1	500		1:100
rFlaA	17,4	500		unverdünnt
rFlaA	1,74	500		1:10
rFlaA	0,174	500		1:100
rFlaA + rBet v 1	17,4 + 10	500		unverdünnt
rFlaA + rBet v 1	1,74 + 1	500		1:10
rFlaA + rBet v 1	0,174 + 0,1	500		1:100
rFlaA:Betv1	27,4	500		unverdünnt
rFlaA:Betv1	2,74	500		1:10
rFlaA:Betv1	0,274	500		1:100

3.7. Stimulation von mDCs mit rFlaA:Betv1 und Inhibitoren

Für die Inhibitor-Versuche wurden die Zellen in Standardkonzentration für 90 Minuten mit den Inhibitoren in den jeweils angegebenen Konzentrationen in Duplikaten im Brutschrank vorinkubiert. Anschließend wurden äquimolare Mengen von rFlaA + rBet v 1 oder rFlaA:Betv1 hinzugegeben. Nach weiteren 72 Stunden Inkubation wurden das Ausmaß des Warburg-Effekts photometrisch und die Zytokinausschüttung mittels ELISA bestimmt (siehe Abbildung 9).

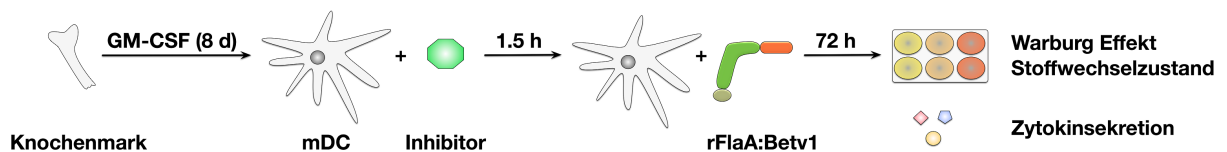


Abbildung 9 – Protokoll für die Stimulation der mDCs mit rFlaA:Betv1 und den verschiedenen Inhibitoren zur Bestimmung der Zytokinsekretion und des Stoffwechselzustands

3.8. Zytokinanalyse mittels ELISA

Die Messung der Zytokinsekretion in den Überständen der stimulierten mDCs erfolgte mittels ELISA. Hierzu wurden 96-Well ELISA-Platten (Saarstedt, Nümbrecht, Deutschland) je nach Bedarf mit 50 µl der jeweiligen Fangantikörper in Coating-Puffer befüllt. Verbliebene Wells wurden mit 50 µl *Aqua dest.* (PEI) beladen, um eine gleichmäßige Wärmeverteilung während der Inkubationszeit zu garantieren. Die Verdünnung der Fang-Antikörper erfolgte den Herstellerangaben entsprechend in ihrem jeweiligen Coating-Puffer (z.B. in einer Verdünnung von 1:250 für BDOptEIA-Kits (BD Bioscience) für Fang- und Detektionsantikörper oder 1:500 für eBioscience Fang- und Detektionsantikörper, außer IL-1 β -Detektionsantikörper: 1:1000, siehe auch Tabelle 5). Die behandelten Platten wurden mit einer Plastikabdeckung verschlossen und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Anschließend wurden die Platten mit Waschpuffer dem vorgegebenen Programm folgend gewaschen (ELX405 Auto Plate Washer, BioTek, USA). Alle verbleibenden Bindungsstellen der ELISA-Platten wurden mit 220 µl PBS (PEI) + 10% FCS (Sigma-Aldrich) für eine Stunde bei Raumtemperatur geblockt. Nach dem erneuten Waschen der Platten wurden jeweils die zu untersuchenden Proben sowie ein Standard in

Duplikaten aufgetragen. Die Standards wurden dabei den Herstellerangaben folgend in einer 7-stufigen 1:2-Verdünnungsreihe in PBS + 10% FCS verdünnt. Alle ungenutzten Wells wurden mit PBS + 10% FCS aufgefüllt (50 µl pro Well). Proben zur Bestimmung von IL-6 und TNF- α wurden zudem vor dem Auftragen zusätzlich in PBS + 10% FCS verdünnt (IL-6: 1:100, TNF- α : 1:10), um eine quantitative, photometrische Auswertung zu ermöglichen. Vorversuche hatten gezeigt, dass diese Zytokine nach Stimulation mit dem Fusionsprotein in größeren Mengen ausgeschüttet werden, so dass eine Differenzierung und Quantifizierung der Messwerte nur nach Verdünnung der Proben möglich waren. Diese Verdünnungen wurden in der Auswertung rechnerisch berücksichtigt. Proben und Standards (50 µl pro Well) inkubierten für mindestens 2 Stunden bei Raumtemperatur. Nach erneutem maschinelltem Waschen wurden die Detektions-Antikörper in der jeweiligen Verdünnung hinzugefügt. Bei allen Messungen mit eBioscience Antikörpern sowie den BD Biosciences Kits für IL-1 β und IL-12 wurden die Detektions-Antikörper zunächst alleine aufgetragen. Nach einer Stunde Inkubationszeit bei Raumtemperatur und einem weiteren Waschschriff wurde dann Streptavidin-HRP (*Horseradish peroxidase*, in den jeweiligen Kits enthalten, siehe auch Tabelle 5) hinzugegeben und weitere 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Bei allen anderen, nicht zuvor genannten BD Biosciences Kits wurde das Streptavidin-HRP gleichzeitig mit den Detektions-Antikörpern aufgetragen und eine Stunde bei Raumtemperatur belassen (Verdünnung für Streptavidin-HRP bei BD Biosciences Kits 1:250, bei eBioscience 1:2000). Anschließend wurden die Platten lichtgeschützt mit TMB (Tetramethylbenzidin, Carl Roth Chemikalien, Karlsruhe, Deutschland) entwickelt (100 µl pro Well). Die Reaktion wurde mit 25% Schwefelsäure (Carl Roth Chemikalien, 50 µl pro Well) bei ausreichendem Farbumschlag (spätestens nach 5-10 Minuten) beendet. Die Proben wurden mittels ELISA Reader (SpectraMax Plus 384), SoftMaxPro 6.3 (Molecular Devices, San Jose, USA) und Messung der optischen Dichte (OD) bei 450 nm quantitativ ausgewertet.

Folgende Fang- und Detektionsantikörper kamen in der vorgelegten Doktorarbeit zur Anwendung:

Tabelle 5 – Übersicht: In der ELISA verwendete Fang- und Detektionsantikörper

Interleukin	Fang-Antikörper	Verdünnung	Detektions-Anti-körper	Verdünnung
BD BioScience, USA				
IL-1β	Rat anti mouse IL-1 β , Cat. 51-26661E	1:250	Biotin anti mouse IL-1 β , Cat. 51-26662E	1:250
IL-6	Rat anti mouse IL-6, Cat. 51-26531E	1:250	Biotin anti mouse IL-6, Cat. 51-26532E	1:250
IL-10	Rat anti mouse IL-10, Cat. 51-26571E	1:250	Biotin anti mouse IL-10, Cat. 51-26572E	1:250
IL-12p70	Rat anti mouse IL-12p70, Cat. 51-26611E	1:250	Biotin anti mouse IL-12p70, Cat. 51-26612E	1:250
TNF-α	Rat anti mouse TNF- α , Cat. 51-9004717	1:250	Biotin anti mouse TNF- α , Cat. 51-9004718	1:250
Entwicklung: Mit dem jeweils im Kit mitgelieferten Streptavidin-HRP Antikörper (z.B. BD Bioscience, USA, Cat. 51-9002813, 1:250 verdünnt in PBS + 10% FCS) und TMB als Substrat.				
Interleukin	Fangantikörper	Verdünnung	Detektionsanti-körper	Verdünnung
eBioscience, Deutschland				
IL-1β	Purified (capture) anti mouse IL-1 β , Cat. 14-7012-81/85	1:500	Biotin anti mouse IL-1 β , Cat. 13-7112-81/85	1:1000
IL-6	Purified (capture) anti mouse IL-6, Cat. 14-7061-85	1:500	Biotin anti mouse IL-6, Cat. 13-7062-85	1:500
IL-10	Purified anti mouse IL-10, Cat. 14-7101-85	1:500	Biotin anti mouse IL-10, Cat. 13-7102-85	1:500
IL-12p70	Purified IL-12p70 anti mouse, Cat. 14-7122-85	1:500	Biotin anti mouse, Cat. OC186250	1:500
TNF-α	Purified anti mouse TNF- α , Cat. 14-7325-85	1:500	Biotin anti mouse TNF- α , Cat. 13-7326-85	1:500
Entwicklung: Streptavidin HRP Antikörpers (eBioscience, Cat. 554066, 1:2000 verdünnt in PBS + 10% FCS) mit TMB als Substrat.				

3.9. Bestimmung des Warburg-Effekts

Der Warburg-Effekt beruht auf einer Dysregulation des Energiestoffwechsels, bei der Zellen trotz ausreichender Verfügbarkeit von Sauerstoff die vorhandene Glukose nicht über den Citratzyklus in den Mitochondrien, sondern in einer „aneroben Glykolyse“ im Cytoplasma zu Laktat umsetzen (99). Die resultierende Ansäuerung des Zellmediums kann aufgrund des in dem Medium enthaltenen pH-Indikators durch einen Farbumschlag von rosa zu gelb in verschiedenen Abstufungen optisch festgestellt werden. Zur Quantifizierung dieses Farbumschlags wurde der Warburg-Effekt in dieser Studie durch den Kehrwert der photometrisch bestimmten optischen Dichte (OD) des Mediums bei einer Wellenlänge von 570 nm angegeben. Ursache bzw. Funktionalität des Warburg-Effekts sind Gegenstand aktueller Forschungen (104), (105).

3.10. Analyse der Glukosekonzentration im Zellkulturmedium

Es wurde der Glukosegehalt der Kulturmedien von BALB/c mDC-Kulturen nach 90-minütiger Prä-Inkubation mit den verschiedenen Inhibitoren und anschließender 72-stündiger Stimulation mit 27,4 µg rFlaA:Betv1 bestimmt. Hierzu wurde das *Glucose (GO) Assay Kit* (Sigma, Product Code: GaGO-20) verwendet. Den Anweisungen des Herstellers entsprechend wurde ein Standard mit aufsteigender Glukosekonzentration (20 µg/ml bis 120 µg/ml in 20 µg/ml-Schritten) sowie eine Negativkontrolle (deionisiertes H₂O, PEI) zu je 40 µl auf einer 96-Well Platte vorgelegt. Die Proben wurden in einer 1:30-Verdünnung zu je 40 µl aufgetragen, um den vom Hersteller geforderten Zielbereich einer Glukosekonzentration zwischen 20-80 µg/ml abzubilden. Um die Reaktion zu starten, wurde die o-Dianisidin-Reagenz mit Glukose-Oxidase/Peroxidase-Lösung in einem Verhältnis von 1:50 unter Lichtschutz vermischt und zu je 80 µl zur Negativkontrolle, zum Standard und zu den Proben hinzugefügt. Nach 10-minütiger Inkubation bei 37°C wurde die Reaktion durch Zugabe von jeweils 80 µl 6 M Schwefelsäure gestoppt. Die Intensität des hierbei entstandenen rosa Farbumschlags wurde im Spektrometer bei einer

Wellenlänge von 540 nm ausgemessen und ist direkt proportional zur Glukosekonzentration des getesteten Mediums.

Zur Berechnung des metabolischen Index als Ausdruck des Glukoseverbrauchs wurde folgende Formel verwendet:

$$\text{Metabolischer Index [\%]} = \frac{2 \text{ mg/dl} - (\text{Glukosekonzentration der Probe})}{2 \text{ mg/dl}} \times 100$$

2 mg/dl entspricht hierbei jeweils der Glukosekonzentration im RPMI1640-Nährmedium.

3.11. SDS-PAGE

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese) wurde nach der Methode von Laemmli (134) in reduzierter und nicht-reduzierter Form durchgeführt. Die mit den Gelen zu befüllenden Formen wurden auf ihre Sauberkeit hin überprüft und den Herstellerangaben entsprechend zusammengebaut. Da pro Halterung 2 Gele gegossen wurden, beziehen sich die angegebenen Mengen immer auf einen Ansatz mit 2 bzw. 3 Gelen (zu jeweils 5 ml). Ein Auslaufen des Trenngels bei Undichtigkeiten der Gussform konnte so unmittelbar kompensiert und ein kompletter Versuchsaufbau mit 2 Gelen pro Halterung sichergestellt werden. Für Trenngele mit einem Acrylamidanteil von 13% (in Bezug auf ein Gelvolumen von 15 ml) wurden 4,75 ml *Aqua dest.* (PEI), 6,5 ml 30% Acrylamidlösung (Carl Roth Chemikalien), 3,75 ml 1,5 M TRIS (Tris(hydroxymethyl)-Amoniummethan + HCl (pH 6,8) + 0,4% SDS)-Puffer sowie 150 µl 10%-ige SDS-Lösung (Natriumdodecylsulfat, PEI) und 75 µl 10% APS (Ammoniumpersulfat, Carl Roth Chemikalien) in einem 25/50 ml Becherglas vermischt.

Für die Sammelgele (5% Acrylamidanteil bei einem Gelvolumen von 6 ml) wurden 3,5 ml *Aqua dest.*, 1 ml 30% Acrylamidlösung, 1,5 ml 1 M TRIS (+ HCl (pH 6,8) + 0,4% SDS-Puffer) sowie 60 µl 10% SDS-Lösung, 30 µl 10% APS und 6 µl Pyronin Y (1%, Sigma-Aldrich) als Farbstoff in einem separaten Becherglas zusammengeführt.

Nachdem beide Gellösungen vorbereitet waren, wurde zunächst dem Trenngel der TEMED (N,N'-Tetramethyldiamin, Carl Roth Chemikalien) Starter/Katalysator hinzugefügt, die Lösung schnell und ausreichend gemischt und zu je ca. 5 ml in die Formen gegossen. Um den Oberrand der Gele zu begradigen, wurden vor der vollständigen Polymerisation der Gele 1,5 ml Isopropanolol auf den oberen Rand jedes Gels pipettiert. Anschließend polymerisierten die Gele für mindestens 30 Minuten bei Raumtemperatur aus. Nach dem Aushärten wurde das Isopropanolol von den erstarrten Gelen abgekippt und kleinere Reste mit einem Filterpapierstreifen aufgesaugt. Es folgte die Zugabe von TEMED zu der Sammelgellösung, die dann nach ausreichendem Durchmischen zu 1-2 ml auf jedes Trenngel aufgetragen wurde. Anschließend wurde ein Kamm in das noch nicht erstarrte Sammelgel eingesetzt, um 10 beladbare Taschen in das Gel zu formen. Nach 15-30 Minuten war das Sammelgel erstarrt und der Kamm konnte vorsichtig entfernt werden.

Folgende Proben wurden analysiert:

Tabelle 6 – Charge und Konzentration der in dieser Studie verwendeten Proteine

Protein	Charge	Konzentration	1µg Protein/Volumen (Probenvolumen)
rFlaA	07/15ND	445 µg/ml	2,247 µl
rBet v 1	03/16ND (SW)	465 µg/ml	2,150 µl
rFlaA + rBet v 1	S.o.	S.o.	2,247 µl + 2,150 µl
rFlaA:Betv1	0412P3	470 µg/570 ml	1,26 µl

Es wurden zwei Probenreihen (siehe Tabelle 7) angesetzt mit jeweils vier Proben (s.o.) zu 1 µg Protein (1x Probenvolumen) und vier Proben zu 2 µg Protein (2x Probenvolumen). Jede Probe der nicht-reduzierenden Probenreihe wurde mit 15 µl SDS-Laufpuffer (4-fach konzentriert, 19,2 M Glycin, 5 M TRIS (pH 6,8), 10% [w/v] SDS) gemischt. Die Proben der reduzierenden Probenreihe wurde mit 15 µl SDS-Laufpuffer (4-fach konzentriert) und 1 µl DTT (Dithiothreitol, Molekula, München, Deutschland) versetzt. Alle Proben denaturierten bei 95°C und 500 RPM für 5 Minuten in einem vorgeheizten Thermomixer (Thermomixer Compact, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). In der Zwischenzeit wurden die Gele den Herstellerangaben entsprechend in ihre Halterungen eingespannt und das beladene Halterungssystem

bis zu den Markierungen mit SDS-Laufpuffer (1-fach konzentriert) aufgefüllt, so dass sowohl Gele als auch Elektroden vollständig vom Laufpuffer bedeckt waren.

Nach Abschluss der Inkubation wurden die Proben und Marker (M, 7 µl/Tasche, Invitrogen SeeBlue® Tris-Glycin-Marker, Cat#LC5925) wie folgt in die 10 Geltaschen pipettiert (jeweils eine reduzierte und eine nicht-reduzierte Probenreihe):

Tabelle 7 – Beladung der SDS-Gele

Tasche # (Ladungsmenge)	1 (7 µl)	2 (1 µg)	3 (1 µg)	4 (1 µg)	5 (1 µg)
Probe	M	rFlaA	rBet v 1	rFlaA + rBet v 1	rFlaA:Betv1
Tasche # (Ladungsmenge)	6 (7 µl)	7 (2 µg)	8 (2 µg)	9 (2 µg)	10 (2 µg)
Probe	M	rFlaA	rBet v 1	rFlaA + rBet v 1	rFlaA:Betv1

Unter einer angelegten Spannung von 100 V wurden die Proteine für 10-15 Minuten im Sammelgel auf einer Linie eingestellt (Fokussierung). Danach durchwanderten die Proteine bei einer Spannung von 180 V die Trenngele für 20-40 Minuten. Dieser Arbeitsschritt wurde mehrfach kontrolliert und ggf. abgebrochen, bevor der vorgelegte Laufmarker (Pyronin Y) nach unten aus dem Gel herauswandern konnte.

Nach Abschluss des Trennprozesses wurden die Gele intakt und unter Erhaltung des Sammelgels mit einem Plastikspatel aus ihrer Glashalterung gelöst und mindestens dreimal für 5 - 10 Minuten in einem destillierten Wasserbad ausgewaschen (jeweils mit frischem *Aqua dest.*). Anschließend wurden die Gele in einer Glasschale mit der Proteinfärbelösung (GelCode® Blue Safe Protein, Thermo Fisher) bedeckt und eine Stunde lang auf einer Schwenkplatte entwickelt. Danach wurde die Färbelösung abgekippt und die blaue Hintergrundfärbung der Gele erneut mit ausreichend destilliertem Wasser ausgewaschen. Die entwickelten Gele wurden luftblasenfrei zwischen zwei Plastikfolien eingeschlagen und mittels Scanner (CanoScan 8400F, Canon, Tokio, Japan) bildlich dokumentiert (siehe Abbildung 10).

3.12. Western-Blot Analysen

Für die Western-Blot-Lysate wurden mDCs am Tag 8 der Kultur aus dem Nährmedium abzentrifugiert und mit den jeweils angegebenen Inhibitorkonzentrationen oder Inhibitor-frei in 5 ml RPMI 1640 mit 10% FCS-Anteil für 3 Stunden bei 37°C, 5%CO₂ in einer T25-Kulturflasche unter Glukosekarenz kultiviert. Anschließend wurden die Zellen erneut abzentrifugiert und in der entsprechenden Menge RPMI ohne Zusätze in einer Konzentration von 1*10⁷ Zellen/ml resuspendiert. Je 100 µl dieser Zelllösung (entsprechend 1*10⁶ Zellen) wurde in FACS-Röhrchen aufgeteilt und mit 100 µl einer 2-fach konzentrierten Stimulationslösung versetzt (1*10⁶ Zellen/200 µl). Es wurden zwei Stimulationslösungen in RPMI angesetzt, die entweder (1) rFlaA (17,4 µg/ml) und rBet v 1 (10 µg/ml) oder (2) rFlaA:Betv1 (27,4 µg/ml) enthielten. Die Stimulationslösungen wurden dann jeweils 2-stufig in einem 1:3-Verhältnis mit RPMI verdünnt (jeweils 600 µl Stimulationslösung + 1200 µl RPMI). Es ergaben sich somit pro Stimulationsansatz (rFlaA + rBet v 1 oder rFlaA:Betv1) drei unterschiedliche Konzentrationen (1:1 (equimolar zu 5 µg/ml rBet v 1), 1:3 (equimolar zu 1,6 µg/ml rBet v 1), 1:9 (equimolar zu 0,55 µg/ml rBet v 1)) verglichen mit der Ausgangskonzentration. Die Glukose-deprivierten mDCs und die Stimulationslösungen wurden vor dem Zusammenführen für 10 Minuten bei 37°C vorgewärmt und nach dem Mischen sofort für 30 Minuten bei 37°C und 5% CO₂ im Brutschrank inkubiert. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit 1 ml eiskaltem PBS (PEI) gewaschen, bei 1200 RPM für 5 Minuten zentrifugiert und die Überstände abgekippt. Alle Proben wurden mit 200 µl Lysat-Lösung (62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8 bei 25°C + 2% w/v SDS + 10% Glycerol + 50 mM DTT + 0,01% Bromophenolblau) versetzt und anschließend für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Die Lysate wurden in Zell-Lysat-Homogenisierern (QIAshredder, Quiagen, Hilden, Deutschland) für 2 Minuten bei 13000 RPM zentrifugiert und nach Entfernung der Schredder-Säule bei -80°C eingefroren.

Zur Detektion der jeweiligen Proteine wurden das iBind System (Thermo Fisher Scientific) und Antikörper (*mTOR Regulation Antibody Sampler Kit*, *mTOR Substrates Antibody Sampler Kit*, *MAPK Family Antibody Sampler Kit*, *NFκB Pathway Sampler Kit*, Kontrolle: *Loading Control Antibody Sampler Kit (HRP*

Conjugate)) von Cell Signaling Technologies (Cambridge, UK) sowie Nitrozellulose-Membrane verwendet. Die Molekulargewichte der detektierten Proteine sind in Tabelle 8 aufgeführt.

Tabelle 8 – Im Western Blot detektierte Proteine mit ihrem erwarteten Molekulargewicht

Kontrollen		mTOR		NFκB		MAPK	
Histon H3	17 kDa	Phospho-p70S6 Kinase	70 kDa	Phospho-p38 MAPK	43 kDa	Phospho-NFκBp65	65 kDa
GAPDH	37 kDa			Phospho-SAP/JNK MAPK	46,5 kDa	IkB-α	40 kDa
				Phospho-p42/44-ERK MAPK	42/44 kDa	Phospho-IκB-α	40 kDa

Als Ladungskontrollen wurden Histon H3 (nukleäres Kontrollprotein) und GAPDH (zytoplasmatisches Kontrollprotein, Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase) verwendet. Die Detektion erfolgte mittels AceGlow™ Substrat (VWR, Darmstadt, Deutschland) unter Verwendung eines Fusion-Fx7 Spectra Chemolumineszenzreaders (Vilber Lourmat, Eberhardzell, Deutschland). Die Banden-Intensität wurde mittels ImageJ (imagej.nih.gov) bestimmt und auf die Werte der unstimulierten Kontrollzellen als RLU (Relative Luminometer *Units*) normalisiert.

3.13. Inhibitoren

Folgende Inhibitoren wurden in dieser Studie verwendet:

I. mTOR-Inhibitoren

Rapamycin (CAS:53123-88-9, InvivoGen, San Diego, USA):

Rapamycin ist als selektiver Inhibitor der Ser/Thr-Proteinkinase mTOR beschrieben (135). mTOR nimmt eine Schlüsselrolle in der Regulation des Zellmetabolismus ein. Hierbei fungiert der mTOR-Komplex als zentraler Regulator zwischen Zellproliferation unter adäquaten Bedingungen oder Zellzyklusarrest und Autophagie bei Stress oder Nährstoffmangel (101). Mechanistisch wird durch Inhibition des

mTOR-Komplexes die Zellproliferation direkt inhibiert, da so die Wachstumssignale, die über mTOR integriert werden, keine Wirkung auf den Zellmetabolismus erzielen (101). Aufgrund dieses Wirkmechanismus' und den daraus resultierenden antiproliferativen und immunsuppressiven Eigenschaften hat sich Rapamycin (Sirolimus®) bereits in der klinischen Anwendung etabliert. So wird es unter anderem zur Reduktion von Abstoßungsreaktionen nach Nierentransplantationen eingesetzt (136).

II. Inflammasom-Inhibitoren

Glyburid (auch: Glibenclamid, CAS: 10238-21-8, InvivoGen):

Diese der Gruppe der Sulfonylharn-Stoffe zuzuordnende Verbindung wird zur Behandlung des Typ II Diabetes mellitus eingesetzt. Die antidiabetogene Wirkung beruht dabei auf einer Blockade der ATP-abhängigen Kalium-Kanäle endokriner Pankreaszellen. Die so entstehende Depolarisierung führt zu einer vermehrten Insulinausschüttung, welche erhöhten Blutzuckerspiegeln entgegenwirkt (137). Des Weiteren kommt es aufgrund des reduzierten Kalium-Effluxes zu einer gehemmten Ausreifung von pro-IL-1 β sowie der Caspase-1 (138), die eine Schlüsselrolle in der Funktion der Inflammasom-vermittelten Immunaktivierung spielt (139).

AC-YVAD-CMK (CAS: 178503-78-6, InvivoGen):

AC-YVAD-CMK ist ein irreversibler Inhibitor der Caspase-1 mit zusätzlicher, wenn auch reduzierter Hemmung der Caspasen 4 und 5 (140). Eine Hemmung verschiedener Inflammasom-Subtypen (u.a. NLRP1b, NLRP3, NLRC4) konnte bereits beschrieben werden (141).

Z-VAD-FMK (CAS: 187389-52-2, InvivoGen):

Durch Blockade des katalytischen Zentrums verschiedener Caspasen wirkt Z-VAD-FMK als irreversibler und unspezifischer Pan-Caspasen-Inhibitor (142).

VX-765 (CAS: 273404-37-8, InvivoGen):

VX-765 ist eine Inhibitor-Vorstufe, die durch cytoplasmatische Esterasen in seine wirksame Form VRT-043198 überführt wird. In dieser aktivierten Form konnte eine Inhibition insbesondere der Caspase-1 und -4 gezeigt werden (143).

III. NF κ B-Inhibitoren

BAY11-7082 (CAS: 19542-67-7, InvivoGen):

Durch die irreversible Hemmung der TNF- α -induzierten I κ B α -Phosphorylierung führt BAY11-7082 zur Inaktivierung von NF κ B (144). Hieraus resultiert die Repression einer Vielzahl pro-inflammatorischer Gene und Signalkaskaden.

Triptolid (CAS: 152121-30-7, InvivoGen):

Für Triptolid (PG490) ist eine Inhibition der Transkriptionsfaktoren NF κ B sowie NFAT (nukleärer Faktor aktivierter T-Zellen) beschrieben (145). Neben den daraus resultierenden immunsuppressiven und anti-inflammatorischen Effekten (145) können auch anti-tumorale Eigenschaften beobachtet werden (146),(147). Der Wirkstoff selbst findet schon seit längerem Anwendung in der traditionellen chinesischen Medizin (TCM) zur Therapie verschiedener Autoimmunerkrankungen (148).

Dexamethason (CAS: 50-02-2, InvivoGen):

Dexamethason (Prednisolon) ist als synthetisches Glukokortikoid ein in der Klinik weit verbreitetes Therapeutikum. Durch die aus der Blockade von MAPKs sowie NF κ B resultierenden Repression einer Vielzahl pro-inflammatorischer Gene besitzt Dexamethason stark anti-inflammatorische Eigenschaften (149).

TPCA-1 (CAS: 507475-17-4, Abcam, Cambridge, UK):

Die Inhibition des NF κ B-Signalwegs durch TPCA-1 beruht auf der Phosphorylationshemmung der *upstream* gelegenen IKK β . Zudem konnte in jüngeren Studien auch eine Blockade der STAT3-Phosphorylierung beschrieben werden (150).

BMS-345541 (CAS: 445430-58-0, Abcam):

BMS-345541 ist als Inhibitor von IKK α und IKK β beschrieben, wobei eine deutlich höhere Affinität zu IKK β besteht. Durch die Inhibition der IKKs wird der natürliche NF κ B-Hemmer I κ B weniger stark abgebaut (siehe Abbildung 8). Es resultiert somit eine Inhibition des NF κ B-Signalweges (151).

IV. MAP-Kinase-Inhibitoren

A-769662 (CAS: 844499-71-4, InvivoGen):

A-769662 ist ein potenter, reversibler Aktivator der AMPK (AMP-abhängige Kinase), welche wiederum die mTOR-Signalkaskade inhibiert. Somit wird von A-769662 sowohl Zellmetabolismus als auch -proliferation beeinflusst (152). Zudem wurden anti-inflammatorische Eigenschaften beschrieben, die durch Hemmung der Aktivierung der JNK (c-Jun N-terminale Kinase) als Vertreter der MAP-Kinasen erklärt sind (105).

SB202190 (CAS: 152121-30-7, InvivoGen):

Als p38 α / β -Inhibitor wird SB202190 häufig eingesetzt, um die physiologische Rolle der MAP-Kinasen zu erforschen (153).

U0126 (CAS: 109511-58-2, Cell Signaling Technologies, Leiden, Niederlande):

U0126 ist ein hochselektiver Inhibitor der Kinase MEK (MAP/ERK (*Extracellular-signal regulated kinases*) Kinase) 1 und MEK 2 (154). Diese Kinasen sind den MAP-Kinasen (MAPK, ERK1/2) in der Phosphorylierungskaskade unmittelbar vorangeschaltet (155) und nehmen somit eine Schlüsselrolle in der Verarbeitung extrazellulärer Signale ein.

SP600125 (CAS: 129-56-6, InvivoGen):

SP600125 ist als selektiver, reversibler und ATP-kompetitiver Inhibitor der c-Jun N-terminalen Kinasen 1, 2 und 3 beschrieben. Die JNK-Kinasen als eine Untergruppe der MAPK spielen eine wichtige Rolle bei Immunreaktionen sowie bei der Vermittlung des programmierten Zelltodes (156).

4. Ergebnisse

4.1. rFlaA:Betv1 bildet hochmolekulare Aggregate aus und bewirkt eine deutlich stärkere mDC-Aktivierung als die einfache Mixtur der Einzelproteine

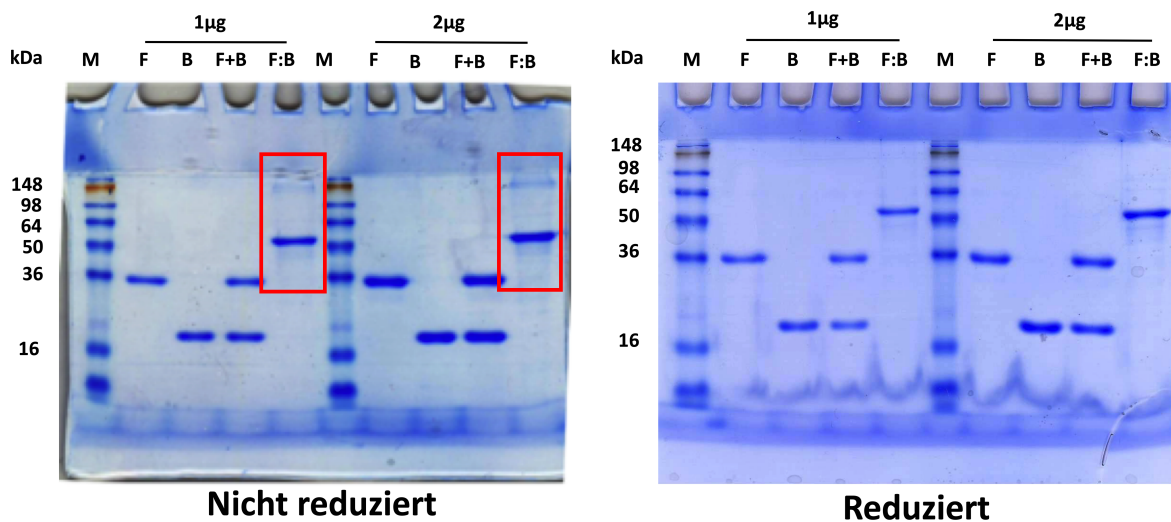


Abbildung 10 – Nicht-reduzierte und reduzierte SDS-PAGE. Aufgetragen wurden rFlaA (F), Betv1 (B), rFlaA+Betv1 (F+B) und rFlaA:Betv1 (F:B) mit einer Ladungsmenge von 1 bzw. 2 µg Protein, Invitrogen SeeBlue® Tris-Glycin-Marker (M).

In beiden Gelen ist der Marker den Vorgaben des Herstellers entsprechend in gleichmäßige, scharfe Banden separiert (Abbildung 10, M) und erlaubt somit die Abschätzung des molekularen Gewichts der untersuchten Proteinproben anhand der angegebenen Skalierung. Alle Banden zeigen für die jeweiligen Probenvolumina (1 µg oder 2 µg) eine gleichmäßig ausgeprägte Färbung und deuten somit auf eine einheitliche Beladung des jeweiligen Gels hin. Sowohl für rFlaA (F) und rBet v 1 (B) als auch für deren Mixtur (rFlaA + rBet v 1, F+B) zeigen sich eindeutige, einzelne Banden bei 36 kDa (rFlaA) und 20 kDa (rBet v 1) in beiden Gelen. Weder in reduziertem noch in nicht-reduziertem Zustand lässt sich eine Wechselwirkung zwischen den beiden Proteinkomponenten der Mixtur erkennen, da sich auch hier eindeutig nur die zwei für die beiden Proteine jeweils charakteristischen Banden

ausbilden (Abbildung 10, F+B). Für das Fusionsprotein rFla:Betv1 (F:B) zeigt sich in beiden Gelen bei etwa 56 kDa eine Bande. Auffällig ist hier jedoch, dass sich im nicht-reduzierten Gel bei der 1 µg F:B Probe eine weitere Bande (≥ 148 kDa) andeutet, die bei der 2 µg F:B Probe noch deutlicher hervortritt (Abbildung 10, rote Rechtecke). Diese ist im reduzierten Gel bei F:B weder für ein Probenvolumen von 1 µg noch von 2 µg zu erkennen (Abbildung 10, F:B, reduziertes Gel).

Die aus dem Knochenmark von BALB/c Mäusen gewonnenen mDCs wurden nach dem in Abbildung 11 A dargestellten Schema mit den verschiedenen Proteinen in den angegebenen Konzentrationen (siehe Abbildung 11 B) stimuliert. Anschließend wurde die Zytokinnsekretion von IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α und IL-10 bestimmt (Abbildung 11 B).

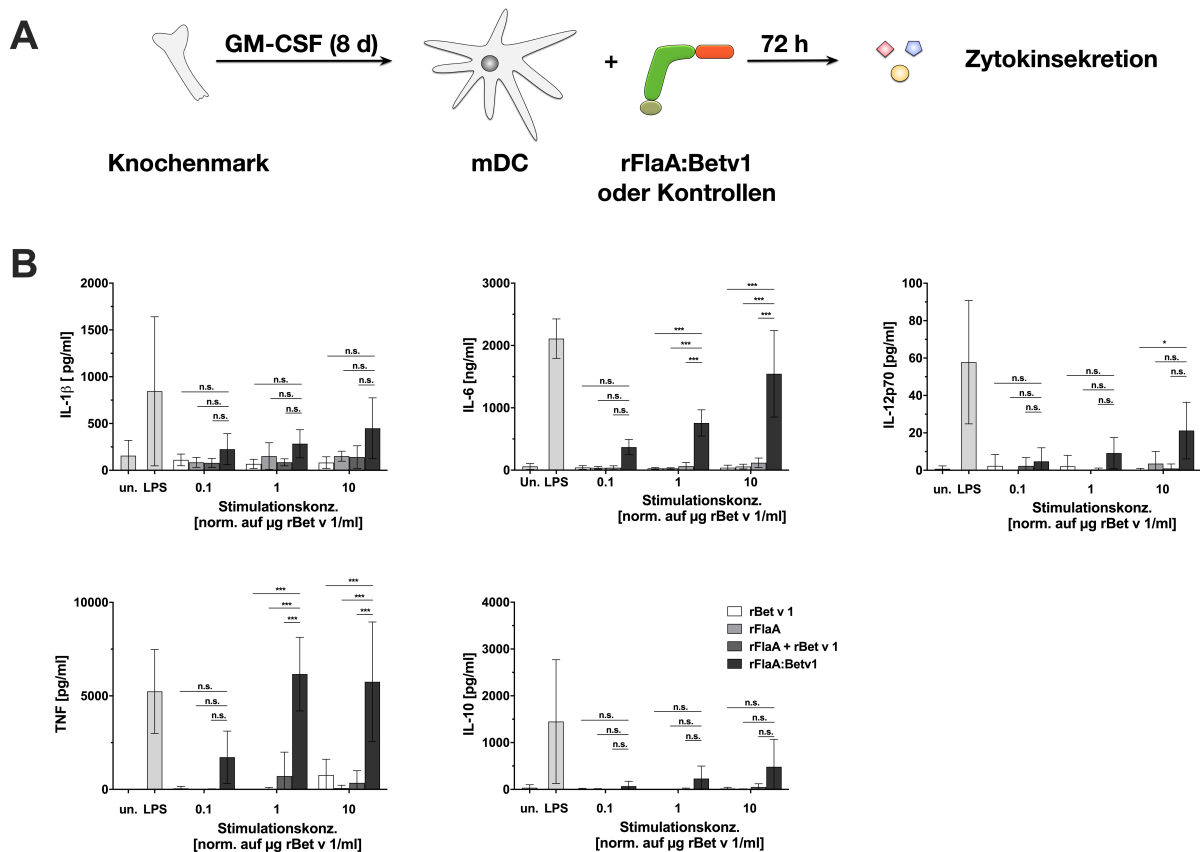


Abbildung 11 – Die Stimulation von mDCs mit rFlaA:Betv1 führt zu einer deutlich stärkeren Zytokinausschüttung als die Stimulation mit den einzelnen Proteinen oder der Proteinmischung. 5×10^5 BALB/c mDCs wurden entweder mit rFlaA, rBet v 1, rFlaA + rBet v 1 oder rFlaA:Betv1 in den angegebenen equimolaren Mengen für 72h stimuliert (A). ELISA-Messung der Zytokinausschüttung in den Überständen nach 72h Stimulation (B). Alle Daten sind das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung (B). Statistische Signifikanz: n.s. - nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Während die Stimulation der mDCs mit rFlaA, rBet v 1 oder rFlaA + rBet v 1 keine Effekte auf die Zytokinsekretion erkennen lassen (Abbildung 10 B), zeigen die mDCs nach Stimulation mit dem Fusionsprotein eine eindeutig erhöhte Sekretion sowohl der pro- (IL-1 β , IL-6, IL-12, TNF- α) als auch der anti-inflammatorischen Zytokine (IL-10). Insbesondere IL-10, das bei Stimulation mit den einzelnen Proteinkomponenten (rFlaA, rBet v 1) oder deren Mixtur (rFlaA + rBet v 1) in nur sehr geringem Umfang ausgeschüttet wird (Abbildung 11 B), zeigt eine über alle verwendeten rFlaA:Betv1-Konzentrationen (0,274 μ g/ml; 2,74 μ g/ml und 27,4 μ g/ml) eine dosisabhängige Sekretionszunahme (Abbildung 11 B). Auch die IL-12-Freisetzung deutet eine dosisabhängige Zunahme unter rFlaA:Betv1-Stimulation an, erreicht dabei aber aufgrund der hohen Messwertschwankungen der einzelnen Experimente nur bei einer rFlaA:Betv1-Konzentration von 27,4 μ g/ml im Vergleich zu 10 μ g/ml rBet v 1 statistische Signifikanz ($p = 0,0408$; Abbildung 11 B). Ein ähnlicher Effekt lässt sich auch für IL-1 β beobachten. Hier deutet sich eine dosisabhängige, rFlaA:Betv1-induzierte IL-1 β -Freisetzung an, die aber ebenfalls keine Signifikanz erreicht (Abbildung 11 B). Außerdem führen die Stimulationen mit den nicht-fusionierten Proteinen bereits in den niedrigsten verwendeten Konzentrationen (rFlaA: 0,174 μ g/ml; Betv1: 0,1 μ g/ml; rFlaA + rBet v 1: 0,174 μ g/ml + 0,1 μ g/ml) zu einer basalen IL-1 β -Freisetzung, die bei steigender Stimulanzkonzentration unverändert bleibt (Abbildung 11 B).

Für IL-6 zeigt sich ebenfalls bereits bei der niedrigsten rFlaA:Betv1-Konzentration (0,274 μ g/ml) ein deutlicher Freisetzungsanstieg (Abbildung 11 B), der hier im Vergleich zu den einzelnen Proteinen oder der Mixtur allerdings noch keine Signifikanz erreicht (0,274 μ g/ml rFlaA:Betv1 vs. 0,174 μ g/ml rFlaA: $p = 0,1677$; 0,274 μ g/ml rFlaA:Betv1 vs. 0,1 μ g/ml rBet v 1: $p = 0,188$; 0,274 μ g/ml rFlaA:Betv1 vs. 0,174 μ g/ml rFlaA+ 0,1 μ g/ml rBet v 1: $p = 0,1735$). Unter Stimulation mit den beiden höheren rFlaA:Betv1-Dosierungen (2,74 μ g/ml bzw. 27,4 μ g/ml) lässt sich dann für rFlaA:Betv1 eine eindeutige, dosisabhängige und hochsignifikante Verstärkung (alle p -Werte $< 0,001$) der IL-6-Freisetzung im Vergleich zu den einzelnen Proteinen oder zur Mixtur erkennen (Abbildung 11 B). Auch die TNF- α -Ausschüttung ist unter Stimulation mit 0,274 μ g/ml rFlaA:Betv1 im Vergleich zu rFlaA ($p = 0,0715$), rBet v 1 ($P = 0,085$) und rFlaA + Betv1 ($p = 0,0725$) erhöht, erreicht dabei aber aufgrund der hohen Schwankung der Messwerte keine statistische Signifikanz (Abbildung 11 B). Mit rFlaA:Betv1-Konzentrationen von 2,74 μ g/ml bzw.

27,4 µg/ml steigt die TNF- α -Freisetzung dann sprunghaft auf das 3,6- (0,274 µg/ml rFlaA:Betv1 TNF- α : 1719,12 pg/ml vs. 2,74 µg/ml rFlaA:Betv1 TNF- α : 6167,52 pg/ml) bzw. das 3,35-fache (2,74 µg/ml rFlaA:Betv1 TNF- α : 1719,12 pg/ml vs. 27,4 µg/ml rFlaA:Betv1 TNF- α : 5753,27 pg/ml) der unter Stimulation mit 0,274 µg/ml rFlaA:Betv1 freigesetzten Menge an (Abbildung 11 B). Auch hier ist die TNF- α -Freisetzung für die Stimulationen mit 2,74 µg/ml und 27,4 µg/ml rFlaA:Betv1 im Vergleich zu den korrespondierenden Stimulationen mit rFlaA, Betv1 oder rFlaA + rBet v 1 stets klar signifikant erhöht (alle p-Werte < 0,001; Abbildung 11 B).

Es zeigt sich also über alle Messungen eine dosisabhängige Erhöhung sowohl der pro- als auch der anti-inflammatorischen Zytokinfreisetzung durch die mDCs nach der Stimulation mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1. Im Vergleich zu den einzelnen Proteinkomponenten (rFlaA, rBet v 1) oder deren Mixtur (rFlaA + rBet v 1) ist dabei rFlaA:Betv1-induzierte Zytokinfreisetzung über alle getesteten Zytokine und Konzentrationen hinweg eindeutig erhöht (Abbildung 11 B).

4.2. Die durch rFlaA:Betv1 induzierte Aktivierung des Zellstoffwechsels von mDCs sowie die Freisetzung anti-inflammatorischer, nicht aber pro-inflammatorischer Zytokine ist mTOR-abhängig

Für Rapamycin und rFlaA:Betv1 konnte bereits in Vorarbeiten (97) eine Zytotoxizität der hier verwendeten Konzentrationen ausgeschlossen werden. Wie durch Schülke *et al.* (97) bereits beschrieben, zeigt sich bei Stimulation der mDCs mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 eine ausgeprägte Aktivierung des Zellmetabolismus, charakterisiert durch einen Anstieg des Glukoseverbrauchs, einen ausgeprägten Warburg-Effekt (Abbildung 12 A-C) sowie eine verstärkte Zytokinausschüttung (Abbildung 12 D). In Bezug auf den Warburg-Effekt, den Glukoseumsatz und die Ausschüttung des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 zeigt sich eine signifikante, dosisabhängige Hemmung der Zellaktivität durch die Vorbehandlung der mDCs mit Rapamycin (Abbildung 12 A-D). Die gezeigten Versuche bestätigen bereits die in Schülke *et al.* 2018 publizierten Ergebnisse, diese wurden durch den Doktoranden aber der Vollständigkeit und des besseren Verständnisses halber wiederholt.

Grundlegend findet sich eine hochsignifikant ($p < 0,001$ in allen gezeigten Messungen) stärker ausgeprägte Aktivierung der mDCs nach Stimulation mit rFlaA:Betv1 im Vergleich zur equimolaren Mischung beider Einzelproteine rFlaA + rBet v 1 (Abbildung 12 C, D).

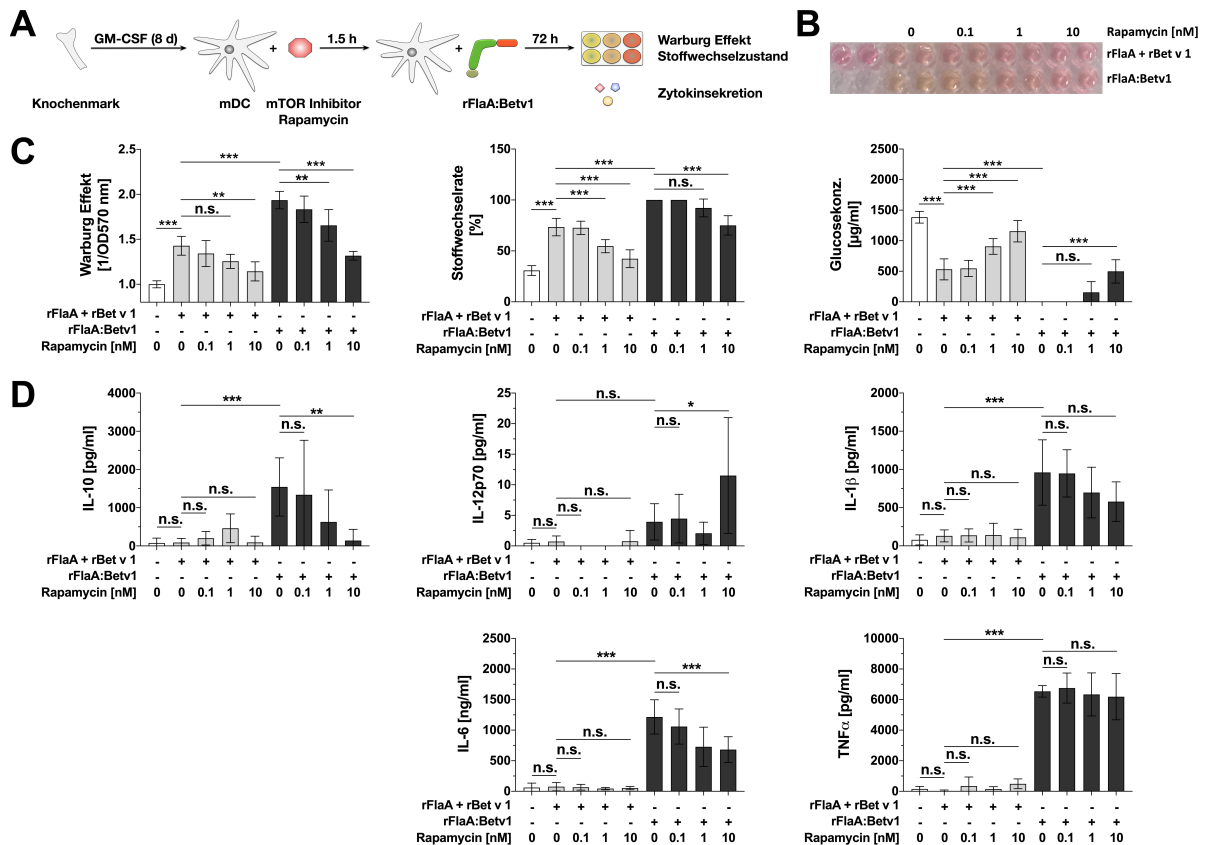


Abbildung 12 – rFlaA:Betv1 induziert eine mTOR-abhängige Aktivierung des Zellmetabolismus und der IL-10 Sekretion in Maus mDCs. 5×10^5 BALB/c mDCs wurden mit den angegebenen Konzentrationen von Rapamycin für 90 Minuten vorbehandelt und dann mit entweder $17,4 \mu\text{g}$ rFlaA + $10 \mu\text{g}$ rBet v 1 oder $27,4 \mu\text{g}$ rFlaA:Betv1 (d.h. in equimolaren Mengen) für zusätzliche 72h stimuliert. Versuchsaufbau (A), Fotodokumentation des Warburg-Effekts (B), Zellstoffwechsel-Analyse (C). ELISA-Messung der Zytokinausschüttung in den Überständen nach 72h Stimulation (D). Alle Daten sind das Mittel aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung (C+D) oder ein repräsentatives Ergebnis aus einem von drei Experimenten (B). Statistische Signifikanz: n.s. - nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Während sich bei Stimulation mit dem Proteingemisch (rFlaA + rBet v 1) bereits bei niedrigen Rapamycinkonzentrationen (1 nM) ein Rückgang der Metabolismusaktivierung (Stoffwechselrate sinkt von 73,4% ohne Rapamycin auf 54,66% bei Vorinkubation mit 1 nM Rapamycin ($p < 0,001$)) jeweils bei Stimulation mit rFlaA + rBet v 1, Abbildung 12 C) zeigt, so ist dieser Effekt bei der Stimulation mit

dem Fusionsprotein (rFlaA:Betv1) erst in höheren Inhibitorkonzentrationen (ab 10 nM Rapamycin Senkung der Stoffwechselrate von 100% ohne Rapamycin auf 75,08% mit 10 nM Rapamycin, $p < 0,001$, jeweils bei Stimulation mit rFlaA:Betv1) signifikant (Abbildung 12 C).

Dies unterstreicht die ausgeprägten immun- und stoffwechselaktivierenden Eigenschaften des Fusionsproteins. Der Warburg-Effekt zeigt hierbei die gleiche Dynamik. Der Farbumschlag als Zeichen der Ansäuerung des Mediums lässt sich bei der Stimulation mit rFlaA + rBet v 1 konzentrationsabhängig mit Rapamycin hemmen (Abbildung 12 B, C), wobei er signifikant schwächer ausgeprägt ist als nach Stimulation mit rFlaA:Betv1 (rFlaA + rBet v 1 im Vergleich zu rFlaA:Betv1, jeweils ohne Inhibitor, $p < 0,001$; Abbildung 12 C). Bei einer Rapamycin-Konzentration von 10 nM lässt sich der Warburg-Effekt nach Stimulation mit rFlaA + rBet v 1 nahezu vollständig unterdrücken (rFlaA + rBet v 1 ohne Rapamycin: $1/OD_{570nm} = 1,3$ vs. rFlaA + rBet v 1 + 10 nM Rapamycin: $1/OD_{570nm} = 1,02$; $p = 0,0011$; Abbildung 12 B, C). Bei der Stimulation mit dem Fusionsprotein zeigt sich bereits bei einer Rapamycin-Konzentration von 1 nM ein signifikant weniger stark ausgeprägter Warburg-Effekt (rFlaA:Betv1 ohne Rapamycin: $1/OD_{570nm} = 1,93$ vs. rFlaA:Betv1 + Rapamycin 1 nM: $1/OD_{570nm} = 1,65$; $p = 0,0014$), wohingegen die Restglukose im Medium (und somit der metabolische Index) noch nicht signifikant verändert sind (rFlaA:Betv1 ohne Rapamycin: 0,00 µg/ml Glukose vs. rFlaA:Betv1 + Rapamycin 1 nM: 155,53 µg/ml Glukose, $p = 0,5757$; Abbildung 12 C).

In Übereinstimmung mit den in Vorstudien beschriebenen Befunden (97) ist für alle hier getesteten Zytokine festzustellen, dass nach Stimulation mit dem Proteingemisch (rFlaA + rBet v 1) im Vergleich zum Fusionsprotein (rFlaA:Betv1) keine signifikante Zytokinsekretion erfolgt (Abbildung 12 D), was die verstärkte Immunogenität des Fusionsproteins bestätigt. Die geringen detektierbaren Zytokinmengen für IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 und TNF- α bei rFlaA + rBet v 1 Stimulus scheinen dabei nicht durch den mTOR-Inhibitor beeinflusst zu sein (Abbildung 12D). Die IL-10-Sekretion nach rFlaA:Betv1-Stimulation hingegen zeigt einen eindeutig signifikanten, mit steigender Rapamycin-Konzentration abnehmenden Verlauf und lässt sich bei Rapamycin-Konzentrationen von 10 nM fast bis auf das Ausgangsniveau unstimulierter Zellen supprimieren (im Mittel von 1543,4 pg/ml bei nicht-inhibierter Stimulation mit rFlaA:Betv1 auf 142,1 pg/ml bei rFlaA:Betv1 + 10 nM Rapamycin, $p = 0,0017$; Abbildung 12 D). Die rFlaA:Betv1-

induzierte IL-12p70-Freisetzung scheint bei Rapamycinkonzentrationen von 0,1 nM und 1 nM weitestgehend unbeeinflusst, wobei sich für letztgenannte ein vermutbarer, wenn jedoch nicht signifikanter Inhibitionseffekt zeigt (rFlaA:Betv1 ohne Rapamycin: 3,94 pg/ml IL-12p70 vs. rFlaA:Betv1 + Rapamycin 1 nM: 2,07 pg/ml IL-12p70, $p = 0,9935$; Abbildung 12 D). Ab einer Konzentration von 10 nM kommt es hingegen zu einer signifikanten, 2,92-fach höheren IL-12p70 Freisetzung (rFlaA:Betv1 ohne Rapamycin: 3,94 pg/ml IL-12p70 vs. rFlaA:Betv1 + Rapamycin 10 nM: 11,52 pg/ml IL-12p70, $p = 0,0161$; Abbildung 12 D). In Übereinstimmung mit den von Schülke *et al.* publizierten Ergebnissen (97) zeigt sich auch hier eine inverse Korrelation zwischen IL-10-Suppression und erhöhter IL-12p70-Ausschüttung (Abbildung 12 D). Der IL-1 β -Verlauf deutet eine dosisabhängige Sekretionshemmung durch den Inhibitor an, der jedoch keine statistische Signifikanz erreichte (rFlaA:Betv1 ohne Rapamycin: 960,54 ng/ml IL-1 β vs. rFlaA:Betv1 + Rapamycin 10 nM: 579,71 ng/ml IL-1 β , $p = 0,3791$; Abbildung 12 D). Ein ähnlicher Verlauf kann für die IL-6 Sekretion beobachtet werden. Auch hier stellt sich ein dosisabhängiger Hemmeffekt ein, welcher für die Konzentration von 1 nM (rFlaA:Betv1 ohne Rapamycin: 1216,57 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + Rapamycin 1 nM: 727,96 ng/ml IL-6, $p < 0,001$; in Abbildung 12 D nicht dargestellt) und 10 nM Rapamycin (rFlaA:Betv1 ohne Rapamycin: 1216,57 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + Rapamycin 10 nM: 682,67 ng/ml IL-6, $p < 0,001$) statistisch signifikant war (Abbildung 12 D). Bei der nächst höheren Inhibitor-Konzentration (10 nM Rapamycin) zeigt sich keine signifikant höhere Zunahme der Sekretionshemmung für IL-6. Im Vergleich zu rFlaA:Betv1-stimulierten mDCs ohne Rapamycin-Vorbehandlung lässt sich die IL-6-Freisetzung durch Rapamycin im Mittel um ca. 43,88% senken (gemittelt aus drei unabhängigen Experimenten von 1216,63 ng/ml ohne Rapamycin auf 682,67 ng/ml mit 10 nM Rapamycin, $p < 0,001$; Abbildung 12 D). In Bezug auf die rFlaA:Betv1-induzierte TNF- α -Sekretion ist auch bei hohen Inhibitorkonzentrationen kein Einfluss auf die Ausschüttung des Zytokins erkennbar (Abbildung 12 D).

In Übereinstimmung mit den Vorergebnissen kann so gezeigt werden, dass die Sekretion des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 durch Inhibition des mTOR-Signalwegs gehemmt werden kann, während die Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine nicht (TNF- α) oder nur in geringem Maße (IL-1 β , IL-6) beeinflusst wird (Abbildung 12 D). Nur bei IL-12p70 zeigt sich bei der höchsten hier verwendeten Rapamycin-Konzentration eine Erhöhung der Zytokinfreisetzung (Abbildung 12 D).

Sowohl die anti-inflammatorische Zytokinsekretion als auch die Stoffwechselaktivierung der mDCs nach Stimulation mit dem Fusionsprotein werden dabei mTOR-abhängig reguliert (Abbildung 12 B-D).

Im Folgenden sollte deshalb weiter untersucht werden, ob das Inflammasom, die NF κ B- oder die MAPK-Signalkaskade zu der rFlaA:Betv1-induzierten pro-inflammatorischen Zytokinsekretion beitragen und wie diese möglicherweise die Aktivierung des Zellmetabolismus beeinflussen. Das Inflammasom ist dabei als ein Multiproteinkomplex beschrieben, der eine Schlüsselrolle in der Prozessierung pro-inflammatorischer Reize und in der Sekretion von IL-1 β übernimmt. Da diese auch bei den mDCs nach Stimulation mit dem Fusionsprotein erhöht ist, wurde überprüft, ob das Inflammasom in die Sekretion der pro-inflammatorischen Zytokine oder in die Stoffwechselaktivierung der Zellen involviert ist.

4.3. Die durch rFlaA:Betv1 induzierte Aktivierung des Zellstoffwechsels von mDCs sowie die Freisetzung anti- und pro-inflammatorischer Zytokine ist Inflammasom-unabhängig

Alle verwendeten Inflammasom-Inhibitoren wurden auf ihre Zytotoxizität hin getestet (Anhang Abbildung 2). Für ZVAD und VX-765 mussten die getesteten Konzentrationen toxizitätsbedingt unterhalb der vom Hersteller angegebenen Wirkkonzentration (maximal empfohlen: ZVAD 10 µg/ml, VX-765 50 µg/ml; maximal verwendet: ZVAD 1 µg/ml, VX-765 5 µg/ml) gewählt werden. Die anderen Maximalkonzentrationen entsprechen der vom Hersteller empfohlenen höchsten Wirkkonzentration. Um einen immunogenen, toxischen oder stoffwechselrelevanten Effekt der Inhibitoren oder ihrer Trägersubstanz selbst (Dimethylsulfoxid, DMSO) auszuschließen, wurden für alle Inhibitorkonzentrationen sowie die verwendeten DMSO-Mengen (zw. 0,3 - 3 µl/ml) die Zytokinsekretion, die Zahl toter Zellen, die Restglukosekonzentration und der Warburg-Effekt jeweils ohne rFlaA:Betv1-Stimulus bestimmt. Es konnten hierbei keine Einflüsse durch die Inhibitoren oder DMSO alleine auf Zytokinsekretion, Warburg Effekt oder Zellstoffwechsel festgestellt werden (Ergebnisse nicht dargestellt). Insgesamt zeigen die Inflammasom-Inhibitoren keinen oder nur einen sehr geringen Effekt auf die mDCs nach Stimulation mit dem Fusionsprotein sowohl bezogen auf die Stoffwechselaktivierung (Abbildung 13 B) als auch auf die Zytokinsekretion (Abbildung 14).

Zusätzlich zeigen die getesteten Inflammasom-Inhibitoren keinen Einfluss auf die rFlaA:Betv1-induzierte Stoffwechselaktivierung der BALB/c mDCs, auch nicht in den (hier dargestellten) jeweils höchsten verwendeten, nicht toxischen Konzentrationen (Abbildung 13 B). In allen Experimenten konnte die Vorinkubation mit den Inflammasom-Inhibitoren den rFlaA:Betv1-induzierten, vollständigen Verbrauch der Glukose aus dem Zellkulturmedium nicht verhindern (es ergibt sich ein unveränderter metabolischer Index von 100%, Abbildung 13 B).

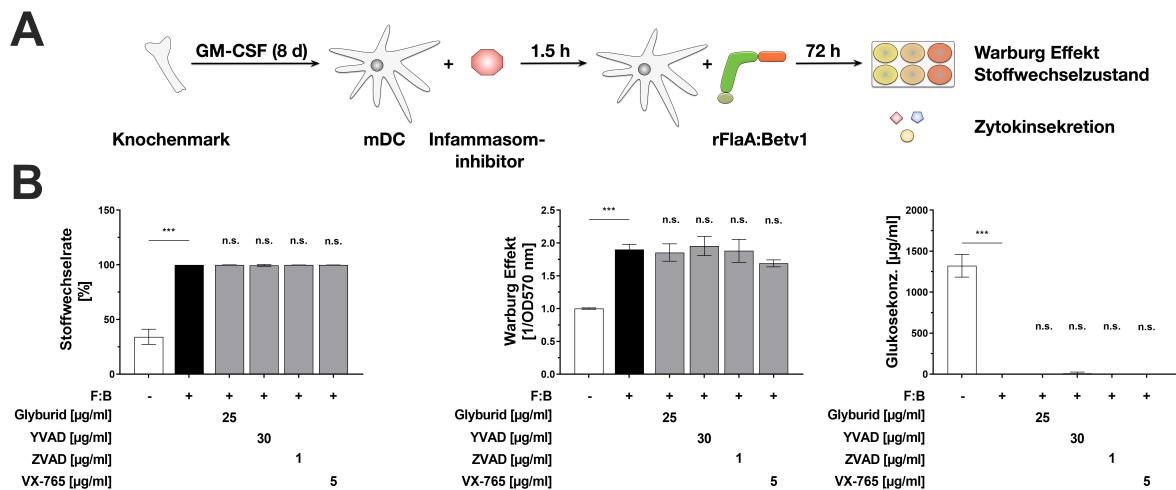


Abbildung 13 – rFlaA:Betv1 induziert in Maus mDCs eine vom Inflammasom unabhängige Aktivierung des Zellmetabolismus. 5×10^5 BALB/c mDCs wurden mit den angegebenen Inhibitorkonzentrationen 90 Minuten vorbehandelt und anschließend mit $27,4 \mu\text{g}$ rFlaA:Betv1 für weitere 72h stimuliert. Versuchsaufbau (A). Einfluss der Inhibitoren auf den Zellmetabolismus (jeweils für die höchste verwendete, nicht toxische Inhibitorkonzentration dargestellt) (B). Alle Daten sind der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz: n.s. - nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Beschriftung zur Abbildung auf Seite 63:

Abbildung 14 – rFlaA:Betv1 induziert in Maus mDCs eine vom Inflammasom weitestgehend unabhängige Zytokinausschüttung. 5×10^5 BALB/c mDCs wurden mit den angegebenen Inhibitorkonzentrationen 90 Minuten vorbehandelt und anschließend mit $27,4 \mu\text{g}$ rFlaA:Betv1 für weitere 72h stimuliert. Zytokinausschüttung unter Einfluss der angegebenen Inflammasom-Inhibitor-Konzentrationen 72h Post-Stimulation. Alle Daten sind der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz: n.s. - nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

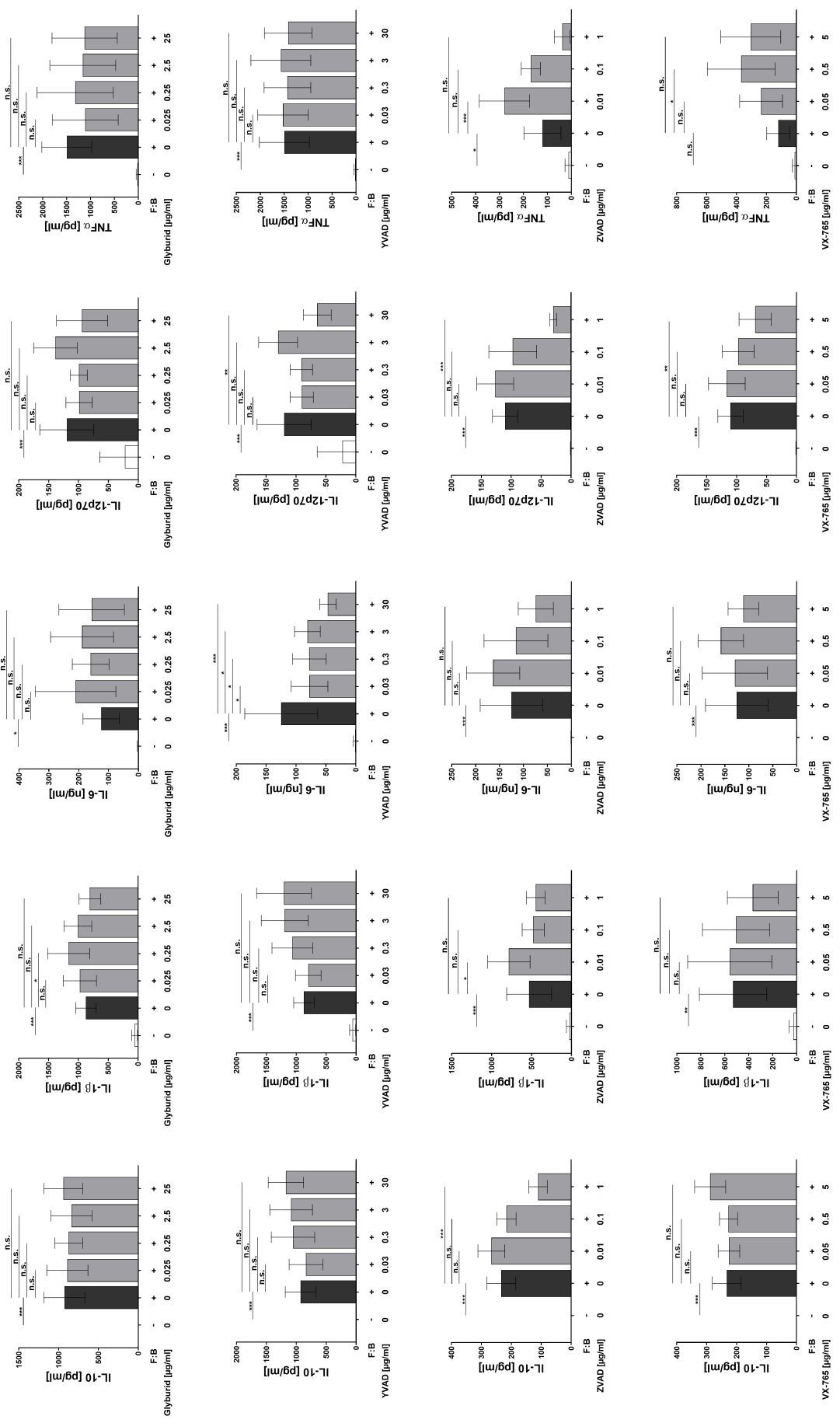


Abbildung 14 – rFlaA:Betv1 induziert in Maus mDCs eine vom Inflammasom weitestgehend unabhängige Zytokinausschüttung.

Interessanterweise zeigen die verwendeten Inflammassom-Inhibitoren im Wesentlichen keinen Einfluss auf die IL-1 β -Freisetzung nach Fusionsprotein-Stimulus (Abbildung 14). Für Glyburid ist in einer Konzentration von 0,25 $\mu\text{g/ml}$ sogar ein leichter IL-1 β -Anstieg (im Mittel rFlaA:Betv1: 873,49 pg/ml IL-1 β vs. rFlaA:Betv1 + 0,25 $\mu\text{g/ml}$ Glyburid: 1164,72 pg/ml IL-1 β , $p = 0,0246$) im Vergleich zur nicht-inhibierten Kontrolle zu beobachten (Abbildung 14).

Ein ähnlicher Effekt ist auch bei ZVAD in einer Konzentration von 0,01 $\mu\text{g/ml}$ (im Mittel rFlaA:Betv1: 531,03 pg/ml IL-1 β vs. rFlaA:Betv1 + 0,01 $\mu\text{g/ml}$ Glyburid: 785,33 pg/ml IL-1 β , $p = 0,0374$) festzustellen, während in höheren Konzentrationen keine signifikanten Effekte auf die IL-1 β -Sekretion gemessen werden können (Abbildung 14). Bezüglich der rFlaA:Betv1-induzierten IL-6 Sekretion zeigen Glyburid, ZVAD und VX-765 keine signifikanten Effekte (Abbildung 14). YVAD inhibiert die IL-6-Freisetzung bereits in der niedrigsten verwendeten Konzentration (im Mittel rFlaA:Betv1: 124,75 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 0,03 $\mu\text{g/ml}$ YVAD: 77,52 ng/ml IL-6, $p = 0,0176$) und ebenso in den beiden nächst höheren (im Mittel rFlaA:Betv1: 124,75 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 0,3 $\mu\text{g/ml}$ YVAD: 77,84 ng/ml IL-6, $p = 0,0186$ bzw. vs. rFlaA:Betv1 + 3 $\mu\text{g/ml}$ YVAD: 81,06 pg/ml IL-6, $p = 0,0321$; Abbildung 14). In einer Konzentration von 30 $\mu\text{g/ml}$ YVAD ist ein weiterer Rückgang der IL-6-Freisetzung um 42,15% (rFlaA:Betv1 + 3 $\mu\text{g/ml}$ YVAD: 81,06 ng/ml vs. rFlaA:Betv1 + 30 $\mu\text{g/ml}$ YVAD: 46,86 ng/ml) im Vergleich zur nächst niedrigeren Inhibition (3 $\mu\text{g/ml}$ YVAD) zu beobachten (Abbildung 14).

Die IL-12-Sekretion betreffend, lässt sich bei Glyburid und YVAD ein ähnlicher Effekt beobachten. In der zweithöchsten Konzentration (2,5 $\mu\text{g/ml}$ Glyburid bzw. 3 $\mu\text{g/ml}$ YVAD) kommt es zu einem statistisch nicht signifikanten Anstieg (im Mittel rFlaA:Betv1: 119,80 pg/ml IL-12p70 vs. rFlaA:Betv1 + 2,5 $\mu\text{g/ml}$ Glyburid: 138,64 pg/ml IL-12p70, $p = 0,7349$ bzw. vs. rFlaA:Betv1 + 30 $\mu\text{g/ml}$ YVAD: 129,90 pg/ml IL-12p70, $p = 0,9544$; Abbildung 14) und in der höchsten (25 $\mu\text{g/ml}$ Glyburid bzw. 30 $\mu\text{g/ml}$ YVAD) dann zu einem Abfall der IL-12-Sekretion (im Mittel rFlaA:Betv1: 119,80 pg/ml IL-12p70 vs. rFlaA:Betv1 + 25 $\mu\text{g/ml}$ Glyburid: 94,37 pg/ml IL-12p70, $p = 0,7128$ bzw. vs. rFlaA:Betv1 + 30 $\mu\text{g/ml}$ YVAD: 64,49 pg/ml IL-12p70, $p = 0,0039$; Abbildung 14). Auch ZVAD und FX-765 zeigen jeweils nur in der höchsten getesteten Konzentration (im Mittel rFlaA:Betv1: 110,35 pg/ml IL12-p70 vs. rFlaA:Betv1 + 1 $\mu\text{g/ml}$ ZVAD: 30,03 pg/ml IL-12p70, $p < 0,001$ bzw. vs. rFlaA:Betv1 + 5 $\mu\text{g/ml}$ VX-765: 69,06 pg/ml IL12-p70, $p = 0,0074$) eine signifikante Reduktion der IL-12-

Sekretion (Abbildung 14). Glyburid und YVAD zeigen keinerlei Effekte auf die TNF- α -Freisetzung nach rFlaA:Betv1 Stimulation (Abbildung 14). ZVAD hingegen führt in einer Konzentration von 0,01 $\mu\text{g/ml}$ zunächst zu einer mehr als 2-fachen Erhöhung der TNF- α -Freisetzung (im Mittel rFlaA:Betv1: 120,86 $\mu\text{g/ml}$ TNF- α vs. rFlaA:Betv1 + 0,01 $\mu\text{g/ml}$ ZVAD: 279,54 $\mu\text{g/ml}$ TNF- α , $p = 0,0003$; Abbildung 14), die sich in den höheren ZVAD-Konzentrationen (0,1 $\mu\text{g/ml}$ ZVAD bzw. 1 $\mu\text{g/ml}$ ZVAD) wieder zurückbildet und gegenüber der Positivkontrolle keine Signifikanz mehr erreicht (Abbildung 14). VX-765 führt ebenfalls zum Anstieg der TNF- α -Freisetzung, die sich bei einer Konzentration von 0,5 $\mu\text{g/ml}$ VX-765 mit der Verdreifachung (im Mittel von rFlaA:Betv1: 120,86 $\mu\text{g/ml}$ TNF- α vs. rFlaA:Betv1 + 0,5 $\mu\text{g/ml}$ VX-765: 368,99 $\mu\text{g/ml}$ TNF- α) der sezernierten TNF- α -Menge als signifikant erweist ($p = 0,0256$; Abbildung 14).

Zusammengefasst lassen sich für Glyburid keine wesentlichen Effekte auf die Zytokinausschüttung von mDCs nach Stimulation mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 feststellen (Abbildung 14). Auch YVAD hat mit Ausnahme der leichten inhibierenden Wirkung auf IL-6 keinen Effekt auf die Zytokinausschüttung (Abbildung 14). ZVAD zeigt in hoher Konzentration (1 $\mu\text{g/ml}$) eine Inhibition der IL-10- sowie der IL12p70-Freisetzung und in niedriger Konzentration (0,01 $\mu\text{g/ml}$) eine Erhöhung der IL-1 β - und TNF- α -Freisetzung (Abbildung 14). VX-765 zeigt einen leichten inhibierenden Effekt auf die IL-12p70-Sekretion in höchster Konzentration (5 $\mu\text{g/ml}$) und eine leichte Verstärkung der TNF- α -Freisetzung in mittlerer Konzentration (0,5 $\mu\text{g/ml}$, Abbildung 14). Keiner dieser Inhibitoren zeigt dabei einen Einfluss auf den durch das Fusionsprotein ausgelösten Anstieg der Stoffwechselrate und der aeroben Glykolyse (Warburg-Effekt) in den BALB/c mDCs (Abbildung 13 B). Eine tragende Rolle des Inflammasoms in der Vermittlung der pro-inflammatorischen Zytokinausschüttung erscheint durch diese Ergebnisse eher unwahrscheinlich.

Wie beschrieben konnte durch Schülke *et al.* (97) bereits gezeigt werden, dass die Immunaktivierung von mDCs nach Stimulation mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 MyD88-abhängig ist. Daher wurden die *downstream* von MyD88 gelegenen Signalproteine (JNK, p38, ERK) sowie NF κ B auf eine Verwicklung in die Stoffwechselaktivierung und Zytokinfreisetzung der mDCs nach Fusionsprotein-Stimulation hin untersucht (vgl. Abbildung 8).

4.4. Eine Inhibition des Transkriptionsfaktors NF κ B reduziert sowohl die rFlaA:Betv1-induzierte pro- als auch die anti-inflammatorische Zytokinsekretion aus mDCs

Alle verwendeten NF κ B-Inhibitoren wurden auf ihre Zytotoxizität hin getestet (Anhang Abbildung 2). Für Triptolid und BAY-11 mussten die getesteten Konzentrationen toxizitätsbedingt unterhalb der vom Hersteller angegebenen Wirkkonzentration gewählt werden (maximal empfohlen: Triptolid 100 nM, BAY-11 10 μ M; maximal verwendet: Triptolid 10 nM, BAY-11 1 μ M). Für TPCA-1 und BMS-345541 wurde maximal das 3-fache der angegebenen mittleren inhibitorischen Konzentration (IC_{50}) verwendet (TPCA-1 IC_{50} = 17,9 nM, BMS-345541 IC_{50} = 0,3 μ M; maximal verwendet: TPCA-1 60 nM, BMS-345541 1 μ M). Die maximale für Dexamethason verwendete Wirkkonzentration (40 ng/ml) wurde den Herstellerangaben entsprechend gewählt. Auch hier konnten toxische (siehe Anhang Abbildung 2), immunogene oder stoffwechselrelevante (Ergebnisse nicht dargestellt) Effekte der Inhibitoren bzw. des Lösungsmittels (DMSO; 0,1 - 3 μ l) selbst auf die mDCs in den angegebenen Konzentrationen ausgeschlossen werden.

Interessanterweise zeigt sich bei Inhibition von NF κ B durch Vorinkubation mit Triptolid eine zusätzliche Hemmung der Zellaktivierung und damit des Glukoseverbrauchs (Abbildung 15 B). Dexamethason, BAY-11, TPCA-1 und BMS-345541 lassen keinen Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der mDCs nach rFlaA:Betv1-Stimulation erkennen (Abbildung 15 B). In Bezug auf die Zytokinsekretion zeigen die verwendeten Inhibitoren unterschiedliche Effekte (Abbildung 16).

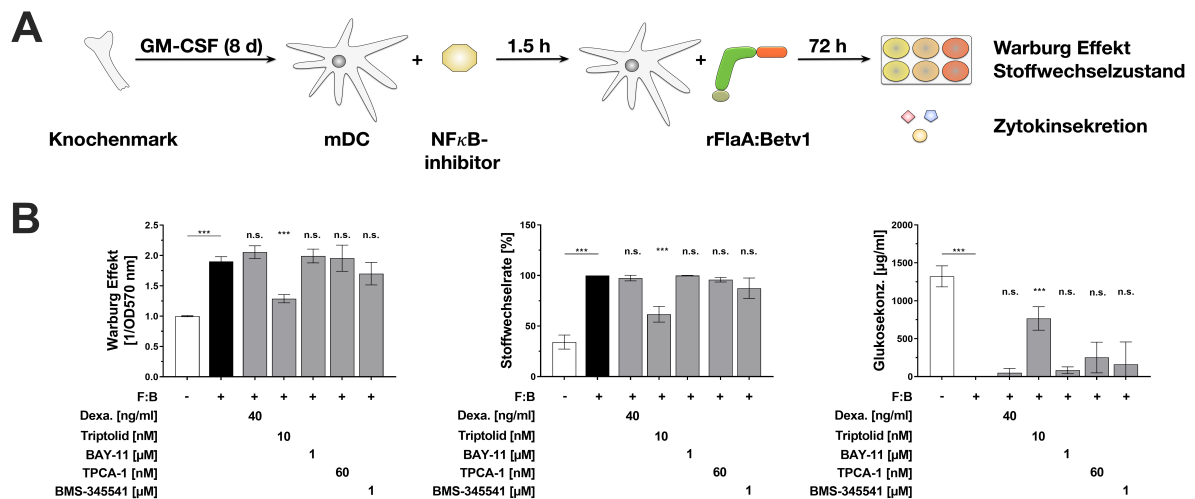


Abbildung 15 – Eine Inhibition des Transkriptionsfaktors NFκB reduziert die rFlaA:Betv1-induzierte metabolische Aktivität von mDCs. 5×10^5 BALB/c mDCs wurden mit den angegebenen Inhibitorkonzentrationen 90 Minuten vorbehandelt und dann mit $27,4 \mu\text{g}$ rFlaA:Betv1 für 72h stimuliert. Versuchsaufbau (A). Einfluss der Inhibitoren auf den Zellmetabolismus (jeweils für die höchste verwendete, nicht toxische Inhibitorkonzentration dargestellt) (B). Alle Daten sind der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz: n.s. - nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Beschriftung zur Abbildung auf Seite 68:

Abbildung 16 – Eine Inhibition des Transkriptionsfaktors NFκB reduziert die rFlaA:Betv1-induzierte Zytokinsekretion von mDCs. 5×10^5 BALB/c mDCs wurden mit den angegebenen Inhibitorkonzentrationen 90 Minuten vorbehandelt und dann mit $27,4 \mu\text{g}$ rFlaA:Betv1 für 72h stimuliert. Zytokinausschüttung unter Einfluss der angegebenen NFκB-Konzentrationen 72h Post-Stimulation. Alle Daten sind der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz: n.s. - nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

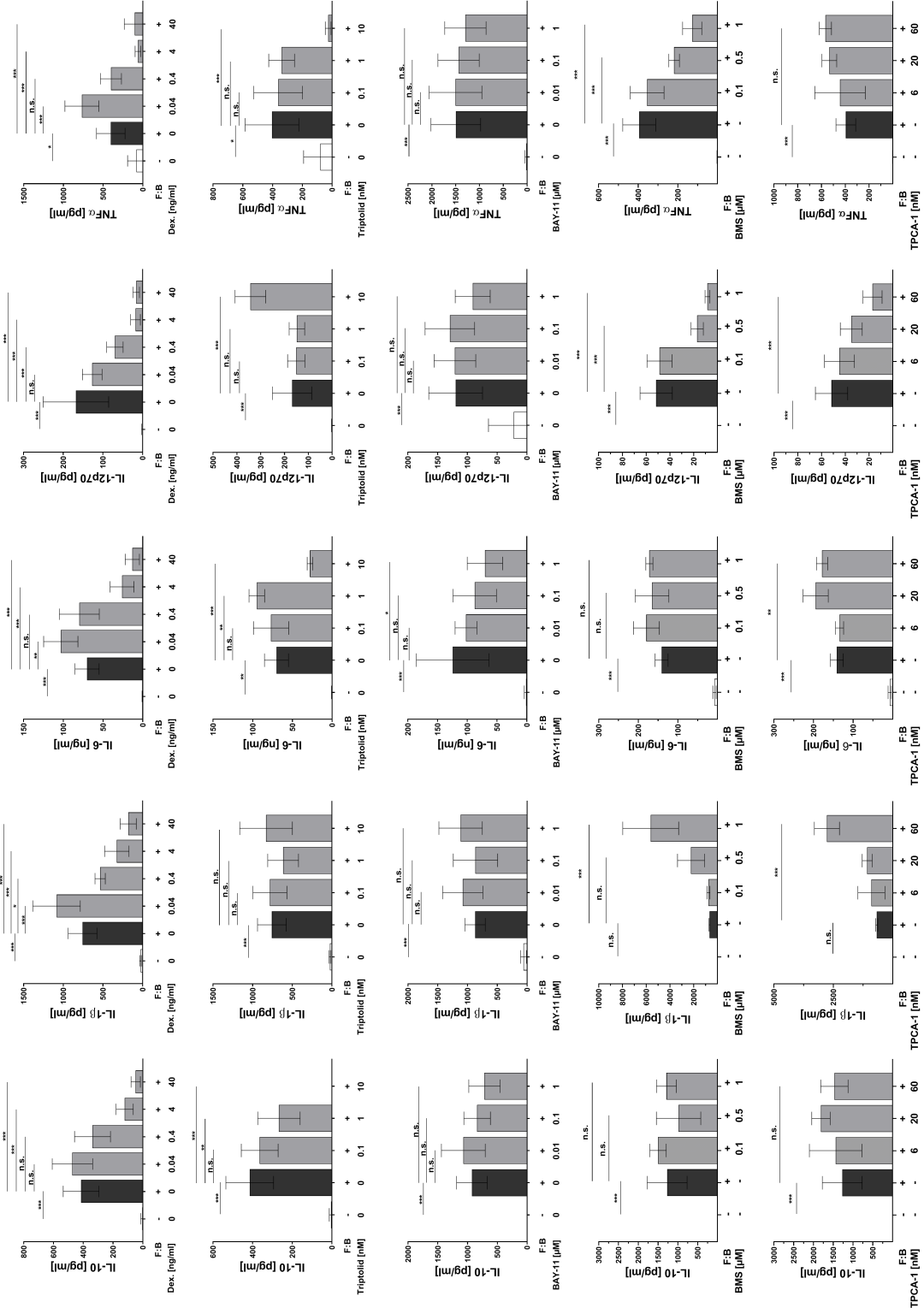


Abbildung 16 – Eine Inhibition des Transkriptionsfaktors NFκB reduziert die rFlA:Betv1-induzierte Zytokinsekretion von mDCs.

So lässt sich die rFlaA:Betv1-induzierte IL-10-Freisetzung mit Dexamethason in einer Konzentration von 40 ng/ml im Vergleich zur nicht-inhibierten Messung um den Faktor 8,5 reduzieren (im Mittel rFlaA:Betv1: 414,92 pg/ml IL-10 vs. rFlaA:Betv1 + 40 ng/ml Dexamethason: 48,33 ng/ml, $p < 0,001$) und nimmt im direkten Vergleich zur 10-fach niedrigeren Konzentration (4 ng/ml) im Mittel nochmals um 60,31% ab (rFlaA:Betv1 + 4 ng/ml Dexamethason: 122,05 pg/ml vs. rFlaA:Betv1 + 40 ng/ml Dexamethason: 48,33 pg/ml, Abbildung 16). Bei Triptolid ist eine signifikante IL-10-Supprimierung ab einer Inhibitorkonzentrationen von 1 nM zu beobachten (im Mittel rFlaA:Betv1: 414,92 pg/ml IL-10 vs. rFlaA:Betv1 + 1 nM Triptolid: 267,62 pg/ml, $p = 0,0028$). Bei der höchsten verwendeten Konzentration (10 nM) kommt es zu einer vollständigen Unterdrückung der Ausschüttung des anti-inflammatorischen Zytokins (Abbildung 16).

Die durch rFlaA:Betv1 induzierte IL-1 β -Sekretion erhöht sich zunächst unter Inhibition mit 0,04 ng/ml Dexamethason um das 1,4-fache im Vergleich zur Positivkontrolle (im Mittel rFlaA:Betv1: 757,88 pg/ml IL-1 β vs. rFlaA:Betv1 + 0,04 ng/ml Dexamethason: 1085,30 pg/ml IL-1 β , $p < 0,001$; Abbildung 16). Bei höheren Dexamethason-Konzentrationen zeigt sich dann eine dosisabhängige Reduktion der IL-1 β -Freisetzung. Im Vergleich zur Inhibitor-freien rFlaA:Betv1-Stimulation sinkt diese auf 70% für 0,4 ng/ml Dexamethason (im Mittel rFlaA:Betv1: 757,88 pg/ml IL-1 β vs. rFlaA:Betv1 + 0,4 ng/ml Dexamethason: 536,07 pg/ml IL-1 β , $p = 0,0136$), auf 43% für 4 ng/ml Dexamethason (im Mittel rFlaA:Betv1: 757,88 pg/ml IL-1 β vs. rFlaA:Betv1 + 4 ng/ml Dexamethason: 326,06 pg/ml IL-1 β , $p < 0,001$) und auf 24% für 40 ng/ml Dexamethason (im Mittel rFlaA:Betv1: 757,88 pg/ml IL-1 β vs. rFlaA:Betv1 + 40 ng/ml Dexamethason: 181,94 pg/ml IL-1 β , $p < 0,001$; Abbildung 16). Triptolid und BAY-11 lassen hierbei keinen Einfluss auf die rFlaA:Betv1-induzierte IL-1 β Sekretion erkennen (Abbildung 16).

Die Hemmung der rFlaA:Betv1-induzierten IL-6-Freisetzung durch die untersuchten NF κ B-Inhibitoren ähnelt der von IL-10: Unter der niedrigsten verwendeten Dexamethasonkonzentration kommt es zunächst zu einem Anstieg der IL-6 Freisetzung um 47,16% (im Mittel rFlaA:Betv1: 70,18 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 0,04 ng/ml Dexamethason: 103,28 ng/ml IL-6, $p = 0,0044$; Abbildung 16). Bei Konzentrationen von 4 und 40 ng/ml Dexamethason fällt die IL-6-Menge dann auf 37,12% (im Mittel rFlaA:Betv1: 70,18 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 4 ng/ml Dexamethason: 26,05 ng/ml IL-6, $p < 0,001$) bzw. 18,82% (im Mittel rFlaA:Betv1:

70,18 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 40 ng/ml Dexamethason: 13,21 ng/ml IL-6, $p < 0,001$) der nicht-inhibierten Kontrollen ab (Abbildung 16).

Triptolid hingegen zeigt erst in der höchsten verwendeten, nicht-toxischen Konzentration (10 nM Triptolid) eine signifikante IL-6-Hemmung um ca. 60% verglichen mit rFlaA:Betv1-stimulierten Zellen (im Mittel rFlaA:Betv1: 70,18 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 10 nM Triptolid: 27,95 ng/ml IL-6, $p < 0,001$; Abbildung 16). Auch BAY-11 zeigt in höchster getesteter Dosierung (1 μ M BAY-11) eine statistisch signifikante Reduktion der IL-6-Freisetzung um den Faktor 0,56 im Vergleich zur nicht-inhibierten Stimulation mit rFlaA:Betv1 (im Mittel rFlaA:Betv1: 124,75 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 1 μ M BAY-11: 70,46 ng/ml IL-6, $p = 0,0113$; Abbildung 16).

Auch die von rFlaA:Betv1 induzierte Sekretion der Zytokine IL-12p70 und TNF- α verhalten sich in Bezug auf ihre Hemmung durch Dexamethason ähnlich: Bereits ab einer Konzentration von 4 ng/ml Dexamethason ist die rFlaA:Betv1-induzierte Freisetzung beider Zytokine soweit supprimiert (im Mittel rFlaA:Betv1: 168,10 pg/ml IL-12p70 vs. rFlaA:Betv1 + 4 ng/ml Dexamethason: 17,9 pg/ml IL-12p70, $p < 0,001$ und im Mittel rFlaA:Betv1: 404,16 pg/ml TNF- α vs. rFlaA:Betv1 + 4 ng/ml Dexamethason: 61,20 pg/ml TNF- α , $p < 0,001$), dass keine zusätzlichen Effekte bei 10-fach höherer Inhibitor-dosis (40 ng/ml Dexamethason) messbar sind (Abbildung 16).

Die Triptolid-bedingte Inhibition der TNF- α -Sekretion folgt dem bereits bei IL-10 und IL-6 beobachteten Muster. Während in den Konzentrationen von 0,1 und 1 nM Triptolid noch keine TNF- α -Hemmung gemessen werden kann, zeigt sich ab einer Konzentration von 10 nM Triptolid ein starker Abfall der TNF- α -Freisetzung auf 6,64% der nicht-inhibierten Stimulation (im Mittel rFlaA:Betv1: 404,16 pg/ml TNF- α vs. rFlaA:Betv1 + 10 nM Triptolid: 26,85 pg/ml TNF- α , $p < 0,001$, Abbildung 16). IL-12p70 wird unter Triptolid-Einwirkung ab einer Konzentration von 10 nM Triptolid sprunghaft vermehrt freigesetzt (2-fach erhöht verglichen mit rFlaA:Betv1 stimulierten Zellen, im Mittel rFlaA:Betv1: 168,10 pg/ml IL-12p70 vs. rFlaA:Betv1 + 10 nM Triptolid: 343,33 pg/ml IL-12p70, $p < 0,001$), während auch hier die Konzentrationen von 0,1 und 1 nM Triptolid keinen Einfluss auf die Sekretion im Vergleich zur nicht-inhibierten rFlaA:Betv1-stimulierten mDCs erkennen lassen (Abbildung 16).

Zusammenfassend geht die Inhibition von NF κ B also mit einer Reduktion sowohl der pro- als auch der anti-inflammatorischen Zytokinsekretion der mDCs nach Stimulation mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 einher (Abbildung 16). Triptolid

inhibiert neben der rFlaA:Betv1-induzierten Zytokinausschüttung als einziger getesteter NF κ B-Inhibitor auch die beobachtete Aktivierung des Zellstoffwechsels (Abbildung 1). Da es sich bei Dexamethason, Triptolid und BAY-11 um eher unspezifische NF κ B-Inhibitoren handelt und die bisherigen Ergebnisse eine Verwicklung der NF κ B-Kaskade in die Zytokinausschüttung vermuten lassen, wurden in zusätzlichen Inhibitionsversuchen rFlaA:Betv1-stimulierte mDCs mit den spezifischeren IKK-Inhibitoren TPCA-1 oder BMS-345541 (BMS in Abbildung 16) vorbehandelt und die mDCs auf ihren Stoffwechselstatus (Abbildung 15 B) und den Einfluss auf die rFlaA:Betv1-induzierte Zytokinsekretion untersucht (Abbildung 16).

Hierbei zeigten weder TPCA-1 noch BMS-345541 einen Effekt auf die rFlaA:Betv1-vermittelte Aktivierung des Zellstoffwechsels in den untersuchten mDCs (Abbildung 15 B). Der Glukoseverbrauch konnte sowohl durch eine TPCA-1-Konzentration von 60 nM (im Mittel rFlaA:Betv1: 87,89 μ g/ml Restglukose vs. rFlaA:Betv1 + 60 nM TPCA-1 μ M: 83,37 μ g/ml Restglukose, $p > 0,9999$) als auch durch die höchste BMS-345541-Konzentration (im Mittel rFlaA:Betv1: 87,89 μ g/ml Restglukose vs. rFlaA:Betv1 + 1 μ M BMS-345541: 252,10 μ g/ml Restglukose, $p = 0,1209$) reduziert werden (Abbildung 15 B).

Beide Substanzen weisen darüber hinaus ein ähnliches Inhibitionsprofil bei den rFlaA:Betv1-induzierten Zytokinen auf, wobei BMS-345541 im Gegensatz zu TPCA-1 eine zusätzliche TNF- α -Inhibition zeigt (Abbildung 16). Das anti-inflammatorische IL-10 (im Mittel rFlaA:Betv1: 1273,23 pg/ml IL-10 vs. rFlaA:Betv1 + 1 μ M BMS-345541: 1290,40 pg/ml IL-10, $p > 0,9999$ sowie vs. rFlaA:Betv1 + 60 nM TPCA: 1472,49 pg/ml IL-10, $p = 0,9308$) wird dabei nicht durch die IKK-Hemmung der beiden Inhibitoren beeinflusst (Abbildung 16). Des Weiteren verursachen TPCA-1 und BMS-345541 jeweils einen starken Anstieg der IL-1 β -Sekretion in den höchsten verwendeten Konzentrationen. Für 60 mM TPCA-1 erhöht sich die IL-1 β -Freisetzung dabei um den Faktor 4,1 (im Mittel rFlaA:Betv1: 674,65 pg/ml IL-1 β vs. rFlaA:Betv1 + 60 nM TPCA-1: 2771,88 pg/ml IL-1 β , $p < 0,001$; Abbildung 16). Unter Inhibition mit 1 μ M BMS-345541 steigt die freigesetzte IL-1 β -Menge sogar auf das 8,34-fache der nicht-inhibierten Stimulation an (im Mittel rFlaA:Betv1: 674,65 pg/ml IL-1 β vs. rFlaA:Betv1 + 1 μ M BMS-345541: 5626,85 pg/ml IL-1 β , $p < 0,001$; Abbildung 16). Auch die IL-6-Sekretion steigt unter IKK-Inhibition mit TPCA-1 um 26,47% (im Mittel rFlaA:Betv1: 141,19 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 60 nM TPCA: 178,57 ng/ml IL-6, $p = 0,0093$) und BMS-345541 um 22,00% (im Mittel rFlaA:Betv1: 141,19 ng/ml IL-6 vs.

rFlaA:Betv1 + 1 μ M BMS-345541: 172,25 ng/ml IL-6, $p = 0,1675$) leicht an (Abbildung 16).

Die IL-12-Sekretion der mDCs nach rFlaA:Betv1 Stimulation lässt sich sowohl mit TPCA-1 als auch mit BMS-345541 dosisabhängig reduzieren. Bei einer TPCA1-Konzentration von 60 nM sinkt diese auf ein Drittel (33,06%) der bei nicht-inhibierter Stimulation freigesetzten IL-12-Menge (im Mittel rFlaA:Betv1: 51,60 pg/ml IL-12p70 vs. rFlaA:Betv1 + 60 nM TPCA: 17,06 pg/ml IL-12p70, $p < 0,001$; Abbildung 16). Durch BMS-345541-Inhibition fällt die IL-12p70-Freisetzung bereits bei einer Konzentration von 0,5 μ M um 66,84% im Vergleich zur nicht-inhibierten Kontrolle ab (im Mittel rFlaA:Betv1: 51,60 pg/ml IL-12p70 vs. rFlaA:Betv1 + 0,5 μ M BMS-345541: 17,11 pg/ml IL-12p70, $p < 0,001$; Abbildung 16). Bei doppelter Inhibitormenge (1 μ M BMS-345541) reduziert sich das freigesetzte IL-12 nochmals weiter auf 16,38% der in der Kontrolle bestimmten Menge (im Mittel rFlaA:Betv1: 51,60 pg/ml IL-12p70 vs. rFlaA:Betv1 + 1 μ M BMS-345541: 8,45 pg/ml IL-12p70, $p < 0,001$; Abbildung 16).

Während TPCA-1 allerdings keinen Einfluss auf die TNF- α -Sekretion der stimulierten mDCs erkennen lässt, ist für BMS-345541 eine klare dosisabhängige TNF- α -Supprimierung zu erkennen, die in höchster Inhibitor-Dosierung (1 μ M BMS-345541) zu einer TNF- α -Reduktion von 67,68% im Vergleich zur nicht-inhibierten Stimulation führt (im Mittel rFlaA:Betv1: 395,35 pg/ml TNF- α vs. rFlaA:Betv1 + 1 μ M BMS-345541: 127,76 pg/ml TNF- α , $p < 0,001$).

Die IKK-Inhibitoren zeigen also eine wesentlich spezifischere Beeinflussung der proinflammatorischen Zytokinsekretion mit Suppression der rFlaA:Betv1-induzierten IL-12-Sekretion, einer vermehrten IL-1 β -Sekretion und einer nur bei BMS-345541 zu beobachtenden TNF- α -Inhibition (Abbildung 16). Sowohl der Zellstoffwechsel als auch die anti-inflammatorische IL-10-Sekretion zeigen sich IKK-unabhängig (Abbildung 16).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass neben NF κ B weitere Signalweg *downstream* von MyD88 (vgl. Abb. 8) in die Immunaktivierung der mDCs nach rFla:Betv1-Stimulation involviert sind. Im Folgenden wird daher die Rolle der p38, der SAP/JNK und der p42/44 (ERK) MAPK bei der Fusionsprotein-induzierten mDC-Aktivierung genauer untersucht.

4.5. Der MAP-Kinase-Signalweg ist nach rFlaA:Betv1-Stimulation sowohl in die pro- als auch in die anti-inflammatorische Zytokinausschüttung involviert

Alle verwendeten MAPK-Inhibitoren wurden auf ihre Zytotoxizität hin getestet (Anhang Abbildung 3). Für A-769662 (A-7) und SP600125 mussten die getesteten Konzentrationen toxizitätsbedingt unterhalb der vom Hersteller angegebenen Wirkkonzentration gewählt werden (maximal empfohlen: A-7: 300 μ M, SP600125: 50 μ M; maximal verwendet: A-7 30 μ M, SP600125 25 μ M). Die maximalen für U0126 und SB202190 verwendeten Konzentrationen (U0126: 10 μ g/ml, SB202190: 60 μ M) wurden den Herstellerangaben entsprechend gewählt. Auch hier konnten immunogene, toxische (Anhang Abbildung 3) oder stoffwechselrelevante Effekte der Inhibitoren bzw. des Lösungsmittels (DMSO; 1 und 5 μ l) selbst auf die mDCs in den angegebenen Konzentrationen durch Kontrollexperimente ausgeschlossen werden (Ergebnisse nicht dargestellt).

Die verwendeten MAP-Kinase-Inhibitoren zeigen insgesamt hemmende aber auch verstärkende Effekte auf die Zytokinausschüttung von mDCs nach Stimulation mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 (Abbildung 18). Interessanterweise ist unter SAP/JNK-Inhibition ebenfalls eine partielle Hemmung der Stoffwechselaktivierung zu beobachten (Abbildung 17 B).

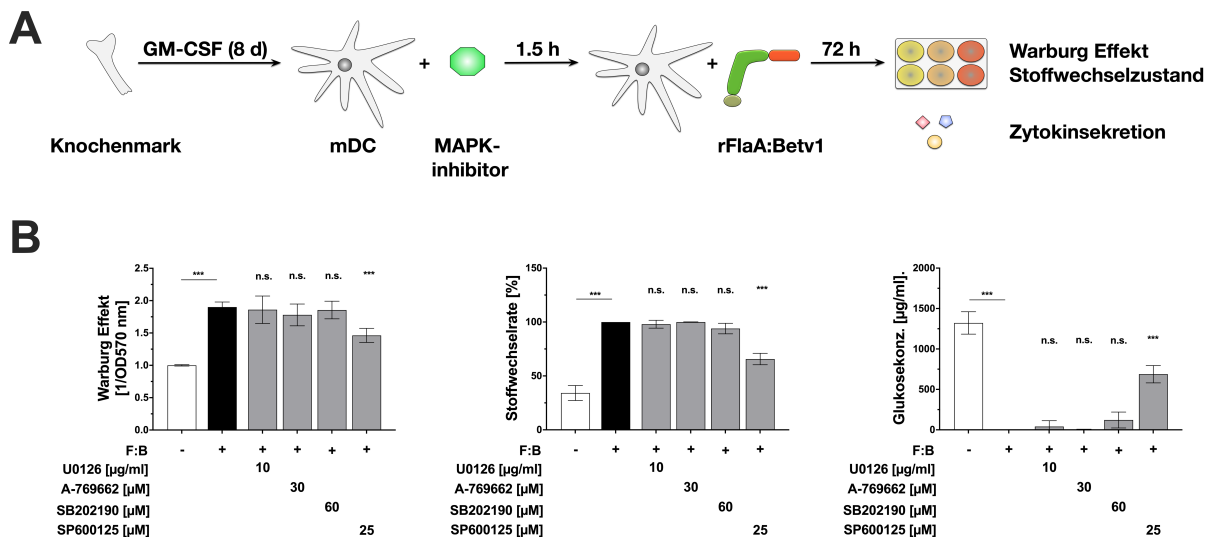


Abbildung 17 – Nur die Inhibition der SAP/JNK MAPK zeigt Einfluss auf die Stoffwechselaktivität der rFlaA:Betv1 stimulierten mDCs. 5×10^5 BALB/c mDCs wurden mit den angegebenen Inhibitorkonzentrationen 90 Minuten vorbehandelt und dann mit $27,4 \mu\text{g}$ rFlaA:Betv1 für zusätzliche 72h stimuliert. Versuchsaufbau (A). Zellmetabolismus (jeweils höchste verwendete, nicht toxische Inhibitorkonzentration ist dargestellt) (B). Alle Daten sind der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz: n.s. - nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Beschriftung zur Abbildung auf Seite 75:

Abbildung 18 – Der MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg ist nach rFlaA:Betv1-Stimulation sowohl in die pro- als auch in die anti-inflammatorischen Zytokinausschüttung involviert. 5×10^5 BALB/c mDCs wurden mit den angegebenen Inhibitorkonzentrationen 90 Minuten vorbehandelt und dann mit $27,4 \mu\text{g}$ rFlaA:Betv1 für zusätzliche 72h stimuliert. Zytokinausschüttung unter Einfluss der angegebenen MAPK-Inhibitorkonzentrationen 72h nach Stimulation mit rFlaA:Betv1. Alle Daten sind der Mittelwert aus drei unabhängigen Experimenten \pm Standardabweichung. Statistische Signifikanz: n.s. - nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

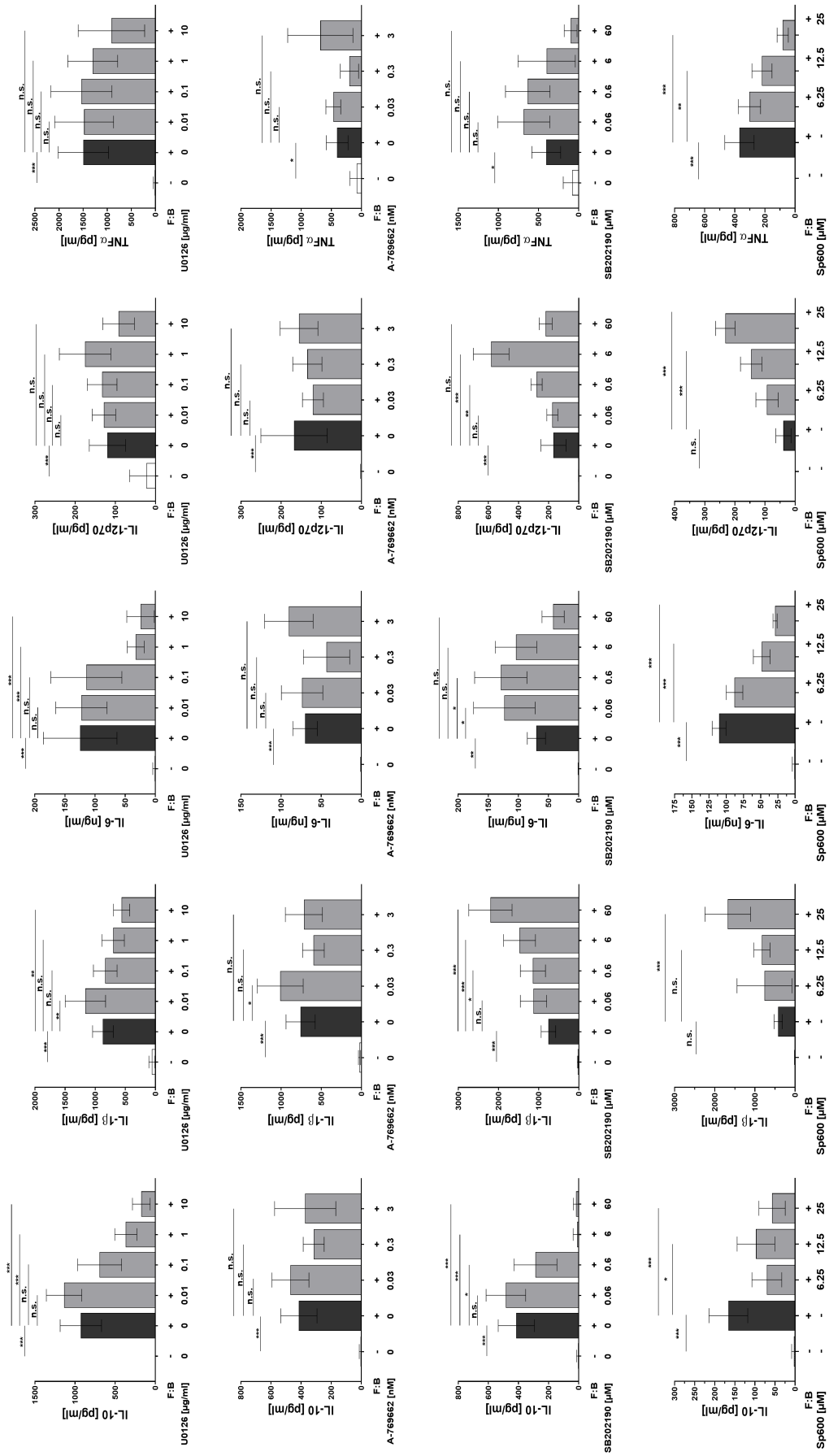


Abbildung 18 – Der MAP-Kinase-Signaltransduktionsweg ist nach rFlaA:Betv1-Stimulation sowohl in die pro- als auch in die anti-inflammatorischen Zytokinausschüttung involviert.

U0126 zeigt eine dosisabhängige Suppression der IL-10-Sekretion, die ab einer Inhibitorkonzentration von 1 µg/ml Signifikanz erreicht (im Mittel rFlaA:Betv1: 928,56 pg/ml IL-10 vs. rFlaA:Betv1 + 1 µg/ml U0126: 367,56 pg/ml IL-10, $p < 0,001$) und bei 10-fach höherer Dosierung (10 µg/ml U0126) nochmals um 42,49% abnimmt (im Mittel rFlaA:Betv1 + 1 µg/ml U0126: 367,56 pg/ml IL-10 vs. rFlaA:Betv1 + 10 µg/ml U0126: 174,63 pg/ml IL-10, $p < 0,001$; Abbildung 18). Bei Vorinkubation der rFlaA:Betv1-stimulierten Zellen mit SB202190 kommt es ab Inhibitorkonzentrationen von 0,6 µM zur signifikanten Reduktion der rFlaA:Betv1-induzierten IL-10 Sekretion (im Mittel rFlaA:Betv1: 414,92 pg/ml IL-10 vs. rFlaA:Betv1 + 0,6 µM SB202190: 287,68 pg/ml IL-10, $p = 0,0384$, Abbildung 18). In Konzentrationen von 6 µM bzw. 60 µM ist eine nahezu vollständige Suppression der rFlaA:Betv1-induzierten IL-10 Sekretion zu beobachten (im Mittel rFlaA:Betv1: 414,92 pg/ml IL-10 vs. rFlaA:Betv1 + 6 µM SB202190: 10,86 pg/ml IL-10 und rFlaA:Betv1 + 60 µM SB202190: 16,73 pg/ml IL-10, jeweils $p < 0,001$; Abbildung 18).

Der JNK MAPK-Inhibitor SP600125 (SP in Abbildung 18) inhibiert die IL-10 Ausschüttung bereits in der niedrigsten Konzentration (im Mittel rFlaA:Betv1: 166,30 pg/ml IL-10 vs. rFlaA:Betv1 + 6,25 µM SP600125: 70,48 pg/ml IL-10, $p < 0,001$; in Abbildung 18 nicht dargestellt). Mit 25µM SP600125 lässt sich die rFlaA:Betv1 induzierte IL-10-Freisetzung um 65,46% im Vergleich zur nicht-inhibierten Stimulation senken (im Mittel rFlaA:Betv1: 166,30 µM IL-10 vs. rFlaA:Betv1 + 25 µM SP600125: 57,43 µM, $p < 0,001$; Abbildung 18).

Auch die IL-1β-Ausschüttung der mDCs nach rFlaA:Betv1-Stimulus lässt sich durch MEK-Inhibition mit U0126 dosisabhängig senken, wobei erst ab einer Konzentration von 10 µg/ml signifikante Unterschiede zu rFlaA:Betv1-stimulierten Zellen auftreten (im Mittel rFlaA:Betv1: 873,49 pg/ml IL-1β vs. rFlaA:Betv1 + 10 µg/ml U0126: 562,72 pg/ml IL-1β, $p = 0,0031$; Abbildung 18). Interessanterweise verhält sich die IL-1β-Freisetzung bei Inhibition der p38-MAPK mit SB202190 genau umgekehrt. So kommt es bereits ab einer Konzentration von 6 µM zu signifikant erhöhten IL-1β-Werten im Vergleich mit rFlaA:Betv1-stimulierten mDCs (im Mittel rFlaA:Betv1: 757,88 pg/ml IL-1β vs. rFlaA:Betv1 + 6 µM SB202190: 1477,87 pg/ml IL-1β, $p < 0,001$; Abbildung 18). Diese steigen mit zunehmender Inhibitorkonzentration (60 µM SB202190) bis auf das 2,9-fache der rFlaA:Betv1-stimulierten Positivkontrolle an (im Mittel rFlaA:Betv1: 757,88 pg/ml IL-1β vs. rFlaA:Betv1 + 60 µM SB202190: 2202,70 pg/ml IL-1β, $p < 0,001$; Abbildung 18). Ein ähnlicher Effekt zeigt sich bei SAP/JNK-Inhibition mit

SP600125. Hier erhöht sich die IL-1 β -Freisetzung unter SP600125 Einwirkung in der höchsten verwendeten Konzentration (25 μ M SP600125) sprunghaft auf das 3,98-fache der nicht-inhibierten Stimulation (im Mittel rFlaA:Betv1: 421,46 pg/ml IL-1 β vs. rFlaA:Betv1 + 25 μ M SP600125: 1678,17 pg/ml IL-1 β , $p < 0,001$; Abbildung 18).

Die rFlaA:Betv1-induzierte IL-6-Freisetzung lässt sich ebenfalls durch den p42/44-Inhibitor U0126 beeinflussen. Während in den niedrigeren Konzentrationen (0,01 μ g/ml und 0,1 μ g/ml U0126) keine Suppression der rFlaA:Betv1-induzierten IL-6 Sekretion zu beobachten ist (Abbildung 18), kommt es bei den Konzentrationen 1 und 10 μ g/ml U0126 zu einer sprunghaften Abnahme der freigesetzten IL-6 Menge um 73,87% (im Mittel rFlaA:Betv1: 124,75 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 1 U0126 μ g/ml: 32,60 ng/ml IL-6, $p < 0,001$) bzw. 80,26% (im Mittel rFlaA:Betv1: 124,75 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 10 μ g/ml U0126: 24,62 ng/ml IL-6, $p < 0,001$; Abbildung 18).

Unter SB202190-Einwirkung deutet sich in den Konzentrationen von 0,06 μ M (im Mittel rFlaA:Betv1: 70,18 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 0,06 μ g/ml SB202190: 123,40 ng/ml IL-6, $p = 0,0249$), 0,6 μ M (im Mittel rFlaA:Betv1: 70,18 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 0,6 μ g/ml SB202190: 129,28 ng/ml IL-6, $p = 0,0105$) und 6 μ M (im Mittel rFlaA:Betv1: 70,18 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 6 μ g/ml SB202190: 104,11 ng/ml IL-6, $p = 0,2525$; jeweils Abbildung 18) eine Erhöhung der rFlaA:Betv1 - induzierten IL-6-Freisetzung an. Für die Vorinkubation der rFlaA:Betv1-stimulierten mDCs mit 60 μ M SB202190 erscheint die IL-6-Sekretion dann wieder, wenn auch nicht signifikant, erniedrigt (im Mittel rFlaA:Betv1: 70,18 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 60 μ g/ml SB202190: 42,40 ng/ml IL-6, $p = 0,4341$). Die Hemmung der IL-6 Freisetzung durch SP600125 verhält sich ähnlich zu der von SB202190, wobei bei SP600125 ab Konzentrationen von 12,5 μ M mit einer Reduktion der IL-6-Freisetzung um 56,04% (im Mittel rFlaA:Betv1: 110,38 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 12,5 μ M SP600125: 48,52 ng/ml, $p < 0,001$) ausgeprägte statistische Signifikanz erreicht wird (Abbildung 18). Durch Verwendung der doppelten Inhibitor dosierung (25 μ M SP600125) sinkt die IL-6-Menge weiter auf 26,44% des bei nicht-gehemmter Stimulation gemessenen Ausgangswertes (im Mittel rFlaA:Betv1: 110,38 ng/ml IL-6 vs. rFlaA:Betv1 + 25 μ M SP600125: 29,18 ng/ml, $p < 0,001$; Abbildung 18).

Auch die rFlaA:Betv1-induzierte IL-12-Sekretion zeigt bei einer Inhibition der p38-MAPK mit SB202190 und der p42/44-MAPK mit U0126 ähnliche Effekte. Während die Messwerte für U0126 im Inhibitionsverlauf bereits eine IL-12-Ausschüttungsspitze um die zweithöchste Konzentration (1,47-fache Erhöhung gegenüber

rFlaA:Betv1-stimulierten mDCs, im Mittel rFlaA:Betv1: 119,80 pg/ml IL-12p70 vs. rFlaA:Betv1 + 1 µg/ml U0126: 175,54 pg/ml IL-12p70, $p = 0,0567$) andeuten, zeigt diese sich bei 6 µM SB2021090 sehr deutlich (Abbildung 18). So ist ab einer Konzentration von 0,6 µM SB2021090 bereits ein leichter IL-12-Anstieg zu verzeichnen (im Mittel rFlaA:Betv1: 168,10 pg/ml IL-12p70 vs. rFlaA:Betv1 + 0,6 µM SB202190: 280,80 pg/ml IL-12p70, $p = 0,0042$), der einen um mehr als das 3-fache der Positivkontrolle erhöhten Spitzenwert bei 6 µM (3,46-fache Erhöhung gegenüber rFlaA:Betv1-stimulierten mDCs, im Mittel rFlaA:Betv1: 168,10 pg/ml IL-12p70 vs. rFlaA:Betv1 + 6 µM SB202190: 581,70 pg/ml IL-12p70, $p < 0,001$) erreicht, um dann bei 60 µM wieder auf das Niveau der rFlaA:Betv1-stimulierten Kontrolle abzufallen (Abbildung 18). Die SAP/JNK-Inhibition mit SP600125 führt zu einer dosisabhängigen Zunahme der IL-12-Freisetzung um das 3,74-fache der nicht-inhibierten Messung in mittlerer Dosierung (im Mittel rFlaA:Betv1: 38,98 pg/ml IL-12p70 vs. rFlaA:Betv1 + 12,5 µM SP600125: 145,92 pg/ml IL-12p70, $p < 0,001$) und um das 5,80-fache in höchster SP600125-Konzentration (im Mittel rFlaA:Betv1: 38,98 pg/ml IL-12p70 vs. rFlaA:Betv1 + 25 µM SP600125: 232,08 pg/ml IL-12p70, $p < 0,001$; Abbildung 18).

Die TNF- α -Sekretion zeigt sich sowohl durch p42/44-Inhibition mit U0126 als auch durch SB202190 reduziert, wobei dieser Effekt erneut bei einer Vorbehandlung der Zellen mit dem p38-MAPK-Inhibitor SB202190 stärker ausgeprägt ist. Die TNF- α -Reduktion erreicht jedoch für beide Inhibitoren (U0126, SB202190) in keinem Fall eine Signifikanz.

Im Falle von SP600125 ist die dosisabhängige TNF- α -Suppression klar zu erkennen. Sie erreicht bereits ab einer SP600125-Konzentration von 12,5 µM eindeutige Signifikanz (im Mittel rFlaA:Betv1: 369,45 pg/ml TNF- α vs. rFlaA:Betv1 + 12,5 µM SP600125: 220,17 pg/ml TNF- α , $p = 0,0018$) und sinkt unter der Hemmung mit 25 µM SP600125 auf 22,35% der bei nicht-inhibierter Stimulation freigesetzten TNF- α -Menge ab (im Mittel rFlaA:Betv1: 369,45 pg/ml TNF- α vs. rFlaA:Betv1 + 25 µM SP600125: 82,56 pg/ml TNF- α , $p < 0,001$; Abbildung 18).

Zusammenfassend lassen die MAP-Kinase-Inhibitoren - abgesehen von A-7 - eine klar dosisabhängige Suppression der IL-10-Sekretion von mDCs nach rFlaA:Betv1-Stimulation erkennen (Abbildung 18). Auch die pro-inflammatorische Zytokinsekretion von IL-6 und TNF- α wird durch die getesteten MAPK-Inhibitoren unterdrückt, wobei die letztere insbesondere bei SAP/JNK-Inhibition klar erkennbar

wird (Abbildung 18). Interessanterweise zeigen sich bezüglich der rFlaA:Betv1-induzierten IL-1 β -Sekretion gegenläufige Effekte der Inhibitoren, da die IL-1 β -Freisetzung nach Vorbehandlung mit dem p42/44 MAPK-Inhibitor U0126 abnimmt und nach Vorbehandlung mit dem p38 MAPK-Inhibitor SB202190 und dem SAP/JNK MAPK-Inhibitor Sp600125 stark ansteigt (Abbildung 18). Für alle Inhibitoren außer A-7 zeigt sich außerdem ein Anstieg der rFlaA:Betv1-induzierten Freisetzung von IL-12 (Abbildung 18). A-7 zeigt keinen Einfluss auf die Zytokinsekretion (Abbildung 18) der mDCs und nur der SAP/JNK-Inhibitor Sp600125 inhibiert die Stoffwechselaktivierung der mDCs durch das Fusionsprotein rFlaA:Betv1 (Abbildung 17 B).

4.6. Sowohl die MAPKs als auch NF κ B sind in die Aktivierung der mDCs nach rFlaA:Betv1-Stimulation involviert

Zur Bestätigung der erhaltenen Ergebnisse wurde der Phosphorylierungszustand der drei Haupt-MAP-Kinase-Typen, NF κ B und des NF κ B-Inaktivators I κ B α sowie des mTOR-Zielproteins p70 S6 Kinase in rFlaA + Bet v 1- und rFlaA:Betv1-stimulierten mDCs miteinander verglichen (Abb. 19 B) Zusätzlich wurde der Einfluss der Inhibitoren Triptolid (T), SB202190 (S), U0126 (U), Dexamethason (D), TPCA1 (TC), BMS-345541 (B) und SP600125 (SP) auf die rFlaA:Betv1-vermittelte mDC Aktivierung untersucht (Abb. 19 B). Die Ladekontrollen bestätigen die Vorlage gleichmäßiger Proteinmengen in allen Messungen. Die Stimulation der mDCs mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 führt im Gegensatz zu der Stimulation mit der Mischung beider Einzelproteine zu einer verstärkten Phosphorylierung der p38 MAPK, der p42/44 MAPK, der SAP/JNK, der p70 S6K sowie von NF κ Bp65 und I κ B α unter gleichzeitiger Abnahme von nicht-phosphorylierten I κ B α (Abb. 19 B). Diese Ergebnisse bestätigen eine Beteiligung der MAP-Kinase-, des NF κ B- sowie des mTOR-Signaltransduktionswege an der Fusionsprotein-abhängigen Aktivierung der mDCs.

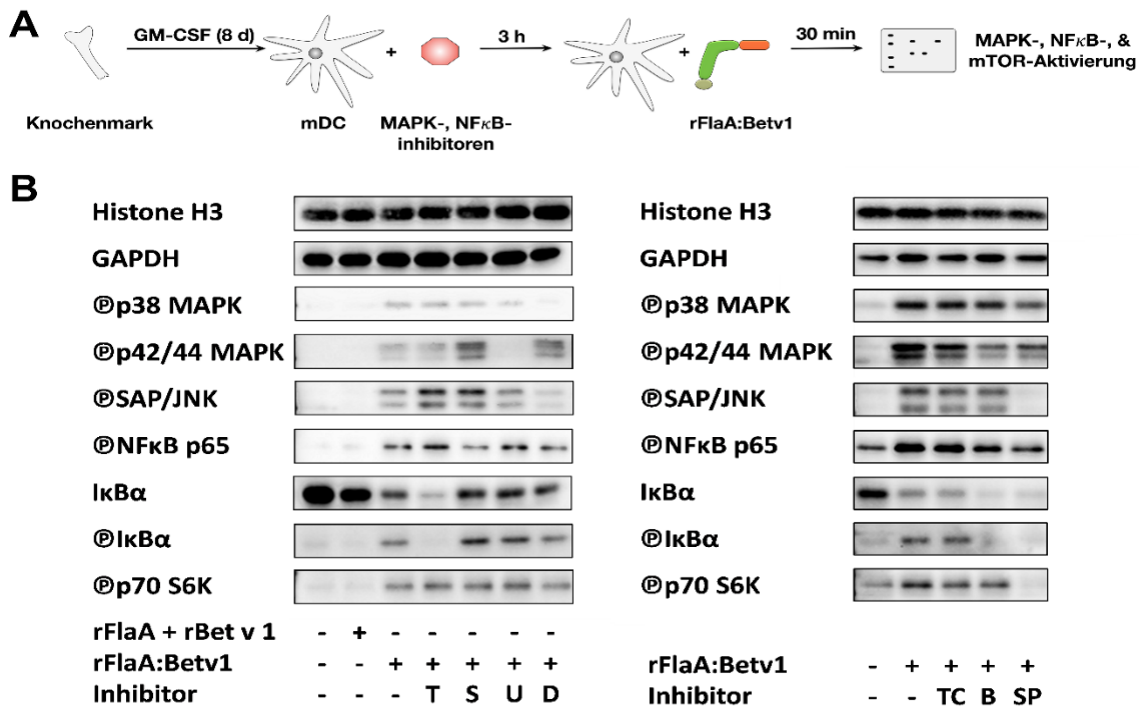


Abbildung 19 – Sowohl MAPKs als auch NFκB tragen zur rFlaA:Betv1-induzierten mDC-Aktivierung bei. Nur die JNK MAPK trägt zur mTOR-abhängigen Phosphorylierung der p70 S6-Kinase bei: 1×10^6 BALB/c mDCs wurden für 3h mit Triptolid (T, 10 nM), SB202190 (S, 60 μ M), U0126 (U, 10 μ g/ml), Dexamethason (D, 40 ng/ml), TPCA1 (TC, 60 nM), BMS-345541 (B, 1 μ M) und SP600125 (SP, 25 μ M) unter Glukose-Deprivation kultiviert, gewaschen und anschließend mit rFlaA:Betv1 für 30 Minuten stimuliert. Zellen ohne Inhibitorvorbehandlung wurden zusätzlich mit equimolaren Mengen an rFlaA rBet v 1 oder rFlaA:Betv1 stimuliert. Versuchsaufbau (A). Die angegebenen Proteine wurden aus den Zell-Lysaten via Western Blot bestimmt (B).

p38

Überraschenderweise zeigt sich eine durch Inhibition mit SB202190 zu erwartende selektive Suppression der p38-Phosphorylierung nicht (Abbildung 19). Der SAP/JNK-Inhibitor SP600125 und vor allem Dexamethason hingegen lassen eine Reduktion der p38-Phosphorylierung erkennen (Abbildung 19). Alle anderen Inhibitoren (TPCA1, BMS-345541, Triptolid, U0126) zeigen keinen Einfluss auf die p38-Aktivierung (Abbildung 19 B).

p42/44

Erwartungsgemäß führt die Vorbehandlung mit dem hochselektiven p42/44 MAPK Inhibitor U0126 zur Unterdrückung der rFlaA:Betv1-induzierten p42/44-Phosphorylierung (Abbildung 19 B). Auch die beiden getesteten IKK-Inhibitoren (BMS-345541, TPCA-1) zeigen eine Suppression der p42/44 MAP-Kinase-Phosphorylierung ohne Einfluss auf die anderen getesteten MAP-Kinasen (p38, SAP/JNK, Abbildung 19 B). Dexamethason, Triptolid, SP600125 und SB202190 beeinflussen die p42/44 MAPK-Phosphorylierung nur in geringem Maße (SP600125) oder überhaupt nicht (Dexamethason, Triptolid, SB202190, Abbildung 19 B).

SAP/JNK und p70 S6K

Die zu erwartende Unterdrückung der SAP/JNK-Phosphorylierung durch Inhibition mit SP600125 zeigt sich deutlich und geht mit einer reduzierten Aktivierung der mTOR-Effektor-Kinase p70 S6 einher (Abbildung 19 B). Auch eine Vorbehandlung der rFlaA:Betv1-stimulierten Zellen mit Dexamethason lässt eine leichte Inhibition der SAP/JNK-Phosphorylierung erkennen, hat dabei aber keinen Einfluss auf die p70 S6-Kinase-Aktivität (Abbildung 19 B). Während der p42/44 Inhibitor U0126 zu einer erhöhten SAP/JNK-Phosphorylierung führt, zeigen die verbleibenden Inhibitoren (TPCA1, BMS-345541, Triptolid, SB202190) keinen Einfluss auf die SAP/JN- oder die p70 S6-Kinase (Abbildung 19 B). Hier ist also zu erkennen, dass unter allen getesteten Inhibitoren nur die selektive Hemmung der SAP/JNK mit SP600125 einen zusätzlichen, inhibitorischen Einfluss auf die p70 S6-Kinase hat (Abbildung 19 B).

NF κ B und I κ B α

Eine Vorbehandlung der mDCs mit dem NF κ B-Inhibitor Triptolid unterdrückt die rFlaA:Betv1-vermittelte I κ B α -Phosphorylierung und geht mit einer Reduktion des phosphorylierten I κ B α bei gleichzeitig leicht erhöhter Phosphorylierung von NF κ Bp65 einher (Abbildung 19 B). Überraschenderweise ist für Dexamethason keine eindeutige Suppression von NF κ Bp65, I κ B α oder Phospho-I κ B α zu erkennen (Abbildung 19 B). Hingegen zeigt sich der zu erwartende Rückgang der NF κ Bp65-Aktivierung bei BMS-345541 und TPCA-1 deutlich (Abbildung 19 B). Allerdings tritt nur bei Inhibition mit BMS-345541 auch eine Reduktion von I κ B α sowohl in der phosphorylierten als auch in der nicht-phosphorylierten Form auf (Abbildung 19 B).

Zudem zeigt sich die I κ B α -Phosphorylierung sowohl durch den p38 Inhibitor SB202190 als auch durch den p42/44 Inhibitor U0126 erhöht (Abbildung 19 B). Dabei hat keiner der beiden letztgenannten MAPK-Inhibitoren einen Einfluss auf die Phosphorylierung von NF κ Bp65- oder I κ B α (Abbildung 19 B). Der SAP/JNK-Inhibitor SP600125 lässt eine deutliche Reduktion der NF κ Bp65- sowie eine Erhöhung der I κ B α -Phosphorylierung erkennen (Abbildung 19 B).

Es ist hier also eindeutig zu erkennen, dass sowohl die MAPK-, die NF κ B- und die mTOR-Signaltransduktionskaskaden in die Aktivierung der mDCs durch das Fusionsprotein rFlaA:Betv1 verwickelt sind (Abbildung 19 B). Die dabei beobachteten Inhibitor-unspezifischen Phosphorylierungshemmungen, wie etwa die Inhibition sowohl des MAPK- als auch des mTOR-Signaltransduktionsweges durch den SAP/JNK-spezifischen Inhibitor SP600125, verdeutlichen dabei, dass die einzelnen Signalkaskaden nicht strikt voneinander getrennt aktiviert werden (Abbildung 19 B). Es gilt daher die Vernetzung dieser Signalwege unter Integration der hier erhobenen Ergebnisse sowie der aktuellen Literatur zu identifizieren, um die intrazellulären Mechanismen der rFlaA:Betv1-vermittelten mDC-Aktivierung nachvollziehen zu können.

5. Ergebnisdiskussion

5.1. Einleitung

Es konnte wiederholt in verschiedenen Krankheitsmodellen gezeigt werden, dass es sich bei Fusionsproteinen aus dem TLR5-Liganden Flagellin und verschiedenen Antigenen um potente Impfstoff-Kandidaten handelt (93),(94). Die Vorteile ergeben sich dabei aus der unkomplizierten Herstellung aufgrund des Proteincharakters sowie den ausgeprägten immunmodulatorischen und vor allem immunaktivierenden Eigenschaften solcher Fusionsproteine, selbst in Verbindung mit ansonsten nur schwach immunogenen Antigenen (71),(72),(90),(91),(92),(95),(96). Hieraus leitet sich eine Vielzahl potentieller Einsatzgebiete für diese Impfstoffkandidaten bei verschiedensten Krankheitsbildern ab, wobei sich Allergien mangels effektiver, schneller und sicherer Behandlungsoptionen bei gleichzeitig großer Patientenzahl als ein Gebiet hervortun, das besonders von der Erschließung neuer Therapiestrategien profitieren könnte. Die in klinischen Studien belegte Wirksamkeit und Sicherheit eines Fusionsproteins aus Flagellin C (aus *Salmonella*) und dem Influenza A Antigen M2e (93),(94) zeigt dabei beispielhaft das Potential dieser neuen Impfstoffkandidaten und bildet eine wichtige Grundlage für die weitere klinische Erprobung von flagellinhaltigen Fusionsprotein-Impfstoffen.

Die zum Einstieg in die Thematik durchgeführten Experimente (siehe Abbildung 11) konnten die bereits vielfach belegte, überlegene immunstimulierende Wirkung von Fusionsproteinen gegenüber der simplen Mischung der einzelnen Komponenten erneut aufzeigen. Die rFlaA:Betv1-induzierte Zytokinausschüttung in mDCs war im Vergleich zu equimolaren Mengen der einzelnen Proteine (rFlaA oder rBet v 1) oder zur Mixtur beider Komponenten (rFlaA + rBet v 1) für alle gemessenen Zytokine stets deutlich erhöht (Abbildung 11). Während es also ausreichend Belege für die Effektivität dieser Fusionsprotein-Impfstoff-Kandidaten gibt, sind die genauen Mechanismen, durch die die resultierende Immunantwort beeinflusst wird, noch weitestgehend unbekannt. Daher war es Ziel dieser Studie, die intrazellulären Signaltransduktionswege weiter zu entschlüsseln, die bei Stimulation von mDCs mit

dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 für die beobachtete Zytokinausschüttung verantwortlich sind.

5.2. Das Fusionsprotein rFlaA:Betv1 zeigt eine überlegene Immunogenität im Vergleich zur einfachen Mixtur beider Proteine

Schülke *et al.* (97) haben in der direkten Vorarbeit zu dieser Studie bereits beschrieben, dass die anti-inflammatorische IL-10 Sekretion von aus murinem Knochenmark differenzierten mDCs nach Stimulation mit rFlaA:Betv1 (dem gleichen Fusionsprotein, das in der hier vorliegenden Studie verwendet wurde) mechanistisch von einer Aktivierung des mTOR1-Komplexes abhängig ist. Die rFlaA:Betv1-induzierte Aktivierung des mTOR-Komplexes erwies sich dabei wiederum als TLR5-unabhängig, aber MyD88-abhängig (97). Die Regulation der *downstream* von mTOR gelegenen p70 S6-Kinase in mDCs nach rFlaA:Betv1 Stimulation zeigte sich dabei ebenso wie die Steigerung des zellulären Glukosestoffwechsels und die anti-inflammatorische IL-10-Sekretion als Rapamycin-sensitiv (97). Zudem gelang Schülke *et al.* der Nachweis, dass die Aufnahme und anschließende lysosomale Prozessierung des Fusionsproteins einen maßgeblichen Einfluss auf die Metabolismusaktivierung und Zytokinsekretion der mDCs hatte (97). Die Autoren postulierten, dass die verstärkte endosomale Aufnahme des Fusionsproteins in die dendritischen Zellen dabei wahrscheinlich durch extrazelluläre Aggregation der Fusionsproteine zu hochmolekularen Proteinkomplexen begünstigt war (97). Diese Aggregation des Fusionsproteins konnte auch in dieser Studie in der nicht-reduzierenden SDS-PAGE dargestellt werden (Abbildung 10) und war dabei wahrscheinlich ebenfalls auf die Neigung des Flagellins zur automatischen Ausbildung eines Multi-Flagellin-Komplexes im Sinne der Flagellum-Synthese zurückzuführen (31). Durch Hemmung der lysosomalen Ansäuerung und der daraus resultierenden Hemmung der Zytokinsekretion konnte verdeutlicht werden, dass diese TLR5-unabhängige Aufnahme und lysosomale Prozessierung des Fusionsproteins maßgeblich an der resultierenden MyD88-abhängigen Immunantwort beteiligt war (31),(97). Die durch diese alternative Erkennung zu erklärende verbesserte Aufnahme und Prozessierung von Fusionsproteinen aufgrund

ihrer hochmolekularen Struktur sowie die effektivere Präsentation der enthaltenen Antigene durch APCs war auch schon früher von Cuadros *et al.* als mögliche Ursache der zu beobachtenden erhöhten Immunogenität vermutet worden (157). In Übereinstimmung damit konnte für ein Fusionsprotein aus Flagellin und Ovalbumin (rFlaA:Ova) gezeigt werden, dass die intrazelluläre Aufnahme von rFlaA:Ova im Vergleich zum einfachen Gemisch beider Einzelproteine (rFlaA + rOva) um ein Vielfaches erhöht war (31). Gleichzeitig kam es zu einer wesentlich schnelleren Prozessierung des Fusionsproteins, bei der im Vergleich zur Mixtur beider Einzelproteine unterschiedliche Peptidfragmente des Ova-Anteils nachgewiesen werden konnten, während bei der endosomalen Spaltung von rOva alleine im Wesentlichen nur zwei unterschiedliche Fragmente nachweisbar waren (31). Das heißt, es bestanden sowohl quantitative als auch qualitative Unterschiede in der Prozessierung des Antigens nach Fusion mit Flagellin.

Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse also, dass die dem Proteingemisch überlegene immunaktivierende und -modulierende Wirkung der flagellinbasierten Fusionsproteine mit der Ausbildung hochmolekularer Proteinaggregate einhergeht (siehe Abbildung 10), deren veränderte zelluläre Aufnahme und Prozessierung durch die mDCs eine entscheidende Rolle für die Immunantwort spielen.

5.3. Die Stoffwechselaktivierung, der Warburg-Effekt und die anti-inflammatorische IL-10 Sekretion von mDCs nach rFla:Betv1-Stimulation sind mTOR-abhängig

Auch die in dieser Studie durchgeführten Messungen bezüglich der nahezu vollständigen Unterdrückung der IL-10-Sekretion sowie der Inhibition des Warburg-Effekts und der Stoffwechselrate durch Rapamycin (Abbildung 12 C, D) deckten sich mit den von Schülke *et al.* (97) beschriebenen Ergebnissen.

Die vorbeschriebene inverse Korrelation zwischen verstärkter IL-12p70-Freisetzung bei supprimiertem IL-10 (97) war erkennbar, wobei der hier zu beobachtende sprunghafte Anstieg der IL-12-Freisetzung vermutlich mit den schwankenden Messwerten der einzelnen Experimente in Zusammenhang stand (Abbildung 12 C). Überraschenderweise zeigte sich in den hier durchgeführten Experimenten eine

leichte, aber signifikante Reduktion der IL-6-Freisetzung durch Rapamycin (Abbildung 12 C), die von Schülke *et al.* nicht beschrieben wurde (97). Diese Inhibition lässt sich jedoch ebenfalls durch die generell großen Schwankungen (vgl. Messwerte für IL-10 und -IL-12 zwischen dieser Arbeit und Schülke *et al.* (97)) innerhalb der Messreihen für diese Experimente erklären. Zudem belegen weiter unten aufgeführte Ergebnisse, dass die IL-6-Sekretion über andere zelluläre Signalwege gesteuert wird, die vor dem Hintergrund der aktuellen Literatur als wahrscheinlicher erscheinen.

Neben diesem ersten Verständnis der Mechanismen, die zu der anti-inflammatorische Zytokinsekretion der mDCs nach Stimulation mit rFlaA:Betv1 beitragen, sind die Mechanismen der pro-inflammatorischen Zytokinausschüttung noch weitestgehend unverstanden. Daher stand die Untersuchung der Signalkaskaden, die in mDCs nach Stimulation mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 zu einer Ausschüttung der pro-inflammatorischen Zytokine führen, und deren Einfluss auf den Zellmetabolismus im Fokus dieser Studie.

5.4. Das Inflammasom spielt wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle bei der rFlaA:Betv1-vermittelten pro-inflammatorischen Zytokinsekretion

Aufgrund der wichtigen Funktion in der Verarbeitung inflammatorischer Reize durch die Prozessierung von IL-1 β und IL-18 sowie durch die Erkennung von PAMPs und DAMPS stellt das Inflammasom ein vielversprechendes Forschungsgebiet für ein breites Spektrum an Pathogen-assoziierten, metabolischen, neoplastischen, autoimmunen, entzündlichen und auch allergischen Erkrankungen dar (107),(108), (110).

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die rFlaA:Betv1 induzierte Immunmodulation in murinen mDCs weitestgehend TLR5-unabhängig vermittelt wurde (97), sollte hier durch unspezifische Inhibition des Inflammasoms untersucht werden, ob die NLR-Inflammasom-Interleukin-Signaltransduktionsachse zu der rFlaA:Betv1-induzierten pro-inflammatorischen Zytokinausschüttung in den stimulierten mDCs beiträgt.

Neuere Forschungsergebnisse belegen, dass dem *NOD-like receptor, leucine-rich repeat and pyrin domain containing 3* Inflammasom, kurz NLRP3-Inflammasom

(auch: Cryopyrin), eine wichtige Rolle in der Pathogenese allergischer Erkrankungen zukommt (107),(110),(158),(159),(160),(161).

Burchard *et al.* (158) zeigten, dass NLRP3 einen entscheidenden Faktor für die Differenzierung naiver CD4⁺ T-Zellen zu Allergie-vermittelnden Th2-Zellen darstellt. Übereinstimmend waren in einem Ova-induzierten Asthmodell bei *Nlrp3*^{-/-} Mäusen im Vergleich zu Wildtypen weit weniger ausgeprägte asthmaspezifische Symptome und lokale Infiltrationen von Entzündungszellen festzustellen (158), was den potentiellen therapeutischen Ansatzpunkt am Inflammasom für die Allergitherapie durch neue „*Th2 Antwort modulierende Moleküle*“ (158) verdeutlicht. In einem weiteren Mausmodell für schweres, steroid-resistentes Asthma konnte die Wirksamkeit von CRID3, einem NLRP3-Inhibitor, im Sinne einer Reduktion der Atemwegshyperreagibilität bereits belegt werden (159). In der gleichen Studie wurde eine erhöhte Aktivität von IL-1 β - und Inflammasom-assoziierten Genen in Granulozyten nachgewiesen, die aus dem Sputum schwer asthmaerkrankter Patienten isoliert wurden (159). In Übereinstimmung mit Simpson *et al.* (162) war die NLRP3-Expression auch hier bei Patienten mit schwerem, neutrophilem Asthma am stärksten erhöht (159).

Neben Asthma konnten auch Einflüsse des NLRP3-Inflammasoms auf die Pathogenese in weiteren allergischen Erkrankungen wie der allergischen Dermatitis (110),(160),(161) oder der allergischen Rhinitis (163) festgestellt werden. In Übereinstimmung mit den oben beschriebenen Beobachtungen bei Asthmaerkrankungen konnte die wichtige Rolle von NLRP3 in Bezug auf die Ausprägung der T-Zell-Antwort (161),(163) sowie eine Linderung der Symptome durch einen NLRP3-Inhibitor (miR-133b agomir) aufgezeigt werden (163). Während also ein Einfluss des NLRP3-Inflammasoms auf die Entwicklung allergischer Erkrankungen vielfach belegt werden konnte, ist der genaue Mechanismus, der zur Aktivierung dieses Signalwegs führt, noch nicht abschließend geklärt. Neben lysosomaler oder mitochondrialer Schädigung (112) und der Bildung radikaler Sauerstoffspezies (ROS) (112),(161) wird die Regulierung des zellulären K⁺-Effluxes als ein Aktivator des NLRP3-Inflammasoms diskutiert (161),(164),(165).

Abgesehen von diesen Mechanismen hatten Schülke *et al.* (97) zudem bereits die Verwicklung des NLRC4-Inflammasoms in die pro-inflammatorische Zytokinsekretion von mDCs nach rFla:Betv1-Stimulation vermutet. Dabei erkennen NAIP-Rezeptoren (eine Untergruppe der PRRs) intrazelluläres Flagellin oder auch Bestandteile des

T3SS (siehe Abb. 7) und leiten so die Aktivierung des NLRC4-Inflammasoms ein (111),(112),(113).

Während in der Maus zu diesem Zweck verschiedene NAIP-Typen anhand der durch sie erkannten Liganden unterschieden werden können (z.B. NAIP1 für die *Needle*-Untereinheit des T3SS, NAIP2 für die T3SS *Rod*-Untereinheit und NAIP5/6 für Flagellin), kodieren humane Zellen nur ein einziges NAIP (166). Neuste Ergebnisse zeigen jedoch, dass das humane NAIP in der Lage ist verschiedene bakterielle Pathogene zu erkennen, darunter auch Flagellin (166),(167). Daher lassen im Mausmodell gewonnene Erkenntnisse wahrscheinlich auch Rückschlüsse auf den Menschen zu.

Um unabhängig von der großen Anzahl aktivierender Reize eine generelle Beteiligung des Inflammasoms an der pro-inflammatorischen Zytokinsekretion der mDCs nach Stimulation mit rFlaA:Betv1 aufzeigen zu können, wurden hier die eher unspezifischen Inflammasom-Inhibitoren Glyburid (auch: Glibenclamid), AC-YVAD-CMK, Z-VAD-FMK und VX-765 verwendet.

Glyburid, ein häufig in der Typ 2 Diabetes-Therapie eingesetztes Medikament, blockiert ATP-sensitive K⁺-Kanäle und führt somit zu einer Zelldepolarisation, welche in β -Zellen des Pankreas eine verstärkte Insulinausschüttung verursacht (137),(168). Es ist dabei noch nicht abschließend geklärt, ob oder inwieweit die Unterbrechung des Anionen-Transportes durch diesen Inhibitor tatsächlich zur Inflammasomhemmung beiträgt (161),(164),(165),(169). Unabhängig von dieser K⁺-Kanal-Blockade zeigt Glyburid, über einen noch nicht bekannten Mechanismus, inhibitorische Effekte auf die LPS-induzierte NLRP3-Inflammasomaktivierung und IL-1 β -Produktion (168). In unseren Messungen zeigte Glyburid allerdings keinerlei Effekte auf rFlaA:Betv1-stimulierte mDCs weder in Bezug auf die Zytokinsekretion noch auf die Stoffwechselrate (Abbildung 14).

Da es durchaus denkbar war, dass die durch das Fusionsprotein initiierten Signaltransduktionswege eine Glyburid-vermittelte Inflammasomhemmung über eine parallel verlaufende Kaskade (z.B. durch lysosomale Freisetzung von Fusionsproteinbestandteilen) (164) umgehen könnten, wurden in dieser Arbeit auch verschiedene Caspase-Inhibitoren verwendet, da eine Inflammasom-vermittelte Aktivierung inflammatorisch relevanter Caspasen stets über die Aktivierung der Caspase-1 in der Freisetzung von IL-1 β mündet (109),(161),(164),(168) Überraschenderweise hatten auch die hier verwendeten Caspase-Inhibitoren keinen

eindeutigen Effekt auf die IL-1 β -Freisetzung (Abbildung 14) oder die Stoffwechselaktivierung (Abbildung 13 B) der mDCs durch das Fusionsprotein. Z-VAD-FMK, ein irreversibler und unspezifischer Pan-Caspase-Inhibitor (142), zeigte gerade mit der Ausnahme von IL-1 β eine dosisabhängige Reduktion aller anderen Zytokine (IL-6, IL-10, IL-12, TNF- α , Abbildung 14). Y-VAD-CMK und VX-765, die beide spezifischere Caspase-1-Inhibitoren sind (140),(143), führten ebenfalls nur zu einer leichten Reduktion der rFlaA:Betv1-vermittelten IL-12-Sekretion und Y-VAD-CMK noch zu einer zusätzlichen Reduktion der IL-6-Sekretion (Abbildung 14).

Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass das Inflammasom sowie eine Caspase-1-abhängige IL-1 β -Sekretion im Falle der mDC-Aktivierung durch rFlaA:Betv1 keine oder nur eine untergeordnete Rolle spielen. Unter Berücksichtigung der weiter unten aufgeführten Ergebnisse, die eine Zuordnung zwischen den jeweiligen Zytokinen und der aktivierten Signalkaskade zulassen, sind die hier insbesondere bei Z-VAD-FMK zu beobachtenden Zytokinreduktionen (Abbildung 14) am ehesten auf eine unspezifische Inhibition proteolytischer Prozesse zurückzuführen und keiner bestimmten Caspase oder dem Inflammasom zuzuschreiben. Interessanterweise zeigte sich die IL-1 β -Sekretion der mDCs von der Caspase-Aktivität unabhängig und deutet somit auf einen Caspase-unabhängigen Mechanismus der IL-1 β Induktion hin (Abbildung 14).

5.5. Der Transkriptionsfaktor NF κ B vermittelt die rFlaA:Betv1-induzierte mDC Aktivierung

Da bereits gezeigt werden konnte, dass die TLR5-unabhängige Aktivierung der mDCs durch das Fusionsprotein rFlaA:Betv1 maßgeblich durch MyD88 beeinflusst ist (siehe auch Abbildung 8) (97), sollte in weiterführenden Experimenten der Beitrag MyD88-abhängiger Signaltransduktionswege zur beobachteten mDC Aktivierung weiter aufgeschlüsselt werden.

Die durch die Vorbehandlung mit BAY-11 inhibierte, TNF- α -induzierte Phosphorylierung von IKK β und somit die Inhibition von NF κ B (144) zeigt, dass dieser direkte, nicht-kanonische, TNF- α -abhängige Mechanismus der Nf κ B-

Regulation (170) bei der Stimulation von mDCs mit dem Fusionsprotein keinen Einfluss auf die beobachtete Zytokinausschüttung hat (Abbildung 14). Es ist also anzunehmen, dass die autokrine, TNF- α -induzierte I κ B α -Phosphorylierung nicht zur Aktivierung der mDCs durch das Fusionsprotein beiträgt.

Für Triptolid, einer aus der chinesischen Kletterpflanze *Tripterygium wilfordii* (Wilfords Dreiflügel Frucht) gewonnenen Substanz, sind neben NF κ B-Inhibition (145) auch inhibitorische Effekte auf weitere Transkriptionsfaktoren wie den Zellzyklusregulator p53 (171), den nukleären Faktor aktivierter T-Zellen (NFAT) (145) oder den *heat shock* Transkriptionsfaktor 1 (HSF1) (172) beschrieben (173). In Übereinstimmung mit Qui *et al.* (145) zeigt sich auch in den in dieser Arbeit durchgeführten Western Blot Analysen eine durch Triptolid zu erklärende Abnahme von I κ B α und eine damit einhergehende verstärkte NF κ B-Phosphorylierung (Abbildung 19 B). Die inhibierenden Eigenschaften von Triptolid beruhen dabei auf der Reduktion der transkriptionsfördernden Aktivität von NF κ B (145),(174) nach dessen Translokation in den Zellkern und DNA-Bindung. Durch die Inhibition der NF κ B-Aktivität nach dessen Aktivierung erklärt sich eine Inhibition der NF κ B-vermittelten pro-inflammatorischen Effekte durch Triptolid trotz eines messbaren Anstiegs des phosphorylierten NF κ B.

Die Reduktion der pro-inflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α ist zudem durch den Einfluss von Triptolid auf die verschiedenen anderen Transkriptionsfaktoren zu erklären und auch in anderen Studien belegt (173),(174). Während sich bei den hier verwendeten Triptolid-Konzentrationen von maximal 10 nM (höhere Konzentrationen von Triptolid konnten aufgrund toxischer Effekte auf die untersuchten mDCs nicht eingesetzt werden, siehe auch Anhang Abbildung 2) kein Einfluss auf die IL-1 β -Sekretion zeigte, ließ sich bei Matta *et al.* (174) auch die LPS-induzierte IL-1 β -Sekretion in murinen Makrophagen durch die Anwendung von Konzentrationen von 20 nM bzw. 50 nM Triptolid suffizient supprimieren. Es liegt deshalb die Vermutung nahe, dass die hier maximal verwendete Triptolidkonzentration (10 nM) möglicherweise noch zu niedrig ist, um eine IL-1 β -Inhibition zu erzielen. Da die Toxizitätsbestimmung für Triptolid in dieser Studie jeweils in 10-facher Konzentrationssteigerung durchgeführt wurde, um ein möglichst großes Wirkungsspektrum abbilden zu können, besteht dementsprechend ein weiter, toxizitätsblinder Bereich zwischen der maximal verwendeten (10 nM Triptolid) und

der als toxisch festgestellten Konzentration (100 nM Triptolid, siehe auch Anhang Abbildung 2).

Auch eine erhöhte Sensitivität der TNF- α -Inhibition durch Triptolid im Vergleich zur Unterdrückung der rFlaA:Betv1-induzierten IL-6-Sekretion (174) war in unseren Messreihen zu erkennen, wenn auch nicht gesichert statistisch zu belegen. Hier könnte eine kleinschrittigere Konzentrationseinstellung sowohl den genaueren Hemmungsverlauf von TNF- α und IL-6 aufschlüsseln als auch durch genauere Bestimmung der Toxizitätsgrenze und höhere Triptolidkonzentrationen einen möglichen Effekt von Triptolid auf die IL-1 β -Sekretion sichtbar machen.

Der Western Blot zeigte zudem eine leicht erhöhte Phosphorylierung der SAP/JNK MAPK nach Vorbehandlung rFlaA:Betv1-stimulierter mDCs mit Triptolid, während der Phosphorylierungszustand der anderen untersuchten MAP-Kinasen hiervon unbeeinflusst blieb (Abbildung 19 B). Vergleichbar zu der Inhibition von NF κ B findet auch die Hemmung von HSF1 und p53 durch Triptolid auf Transkriptionsebene statt, wobei die Struktur, die DNA-Bindungsaktivität oder die Translokation dieser Faktoren weitestgehend unbeeinflusst sind (145),(171),(172). Außerdem ist für Triptolid eine Induktion des Transkriptionsfaktors p53 beschrieben (171), welcher wiederum in enger Verbindung mit dem JNK-MAPK-Signaltransduktionsweg steht (175). Auch die durch Triptolid nicht beeinflusste Hyperphosphorylierung von HSF1 geschieht in direkter Abhängigkeit von JNK (176). Andere Studien wiederum zeigen eine Hemmung der JNK-Phosphorylierung durch Triptolid in murinen Mikrogliazellen (177) sowie in humanen Synovialzellen bei aktiver rheumatoider Arthritis (178). Übereinstimmend zeigen alle aufgeführten Studien jedoch, dass nur die JNK- und nicht die p38- oder die p42/44(ERK1/2)-MAPK durch Triptolid beeinflusst werden (177),(178), was sich auch in unseren Messungen bestätigt (Abbildung 19 B). Da Triptolid der einzige getestete NF κ B-Inhibitor mit gleichzeitigem Einfluss sowohl auf die SAP/JNK MAPK als auch auf die Stoffwechselaktivierung war (Abbildung 15 B), lässt sich bereits hier eine Beeinflussung der Stoffwechselaktivität der mDCs nach rFlaA:Betv1-Stimulation durch MAPKs vermuten. Exakte Aussagen lassen sich aufgrund der unspezifischen Triptolid-Inhibition sowie des noch relativ unbekanntem Einflusses von Triptolid auf den Glukosehaushalt (173) an dieser Stelle noch nicht treffen. Die spezifische SAP/JNK-Inhibition mit SP600125, die weiter unten beschrieben wird, erwies sich in diesem Zusammenhang als wesentlich aufschlussreicher.

Erwartungsgemäß zeigt sich unter Dexamethason-Einfluss eine dosisabhängige Inhibition aller gemessenen Zytokine. Dexamethason (9-Fluor-16 α -Methyprednisolon) ist ein synthetisches Glukokortikoid, welches aufgrund seiner potenten, anti-inflammatorischen Eigenschaften weitreichenden Einsatz in vielen klinischen Gebieten findet (179),(180),(181). Dabei beruht die Wirkung von Dexamethason auf der gleichzeitigen Inhibition vieler inflammatorischer Signalkaskaden (149),(180),(181), die sich vereinfacht durch drei Mechanismen beschreiben lassen: (I) Zum einen kommt es zu einer direkten genomischen Modifikation, bei der der Komplex aus Glukokortikoid und zytosolischem Glukokortikoid-Rezeptor (GR) in den Zellkern verlagert wird und dort direkten Einfluss auf die Transkription vieler Zielgene nimmt (149),(182),(180). (II) Zum anderen hemmt Dexamethason die nicht-genomische Modifikationen intrazellulärer Signalwege über Membranrezeptoren und *Second-Messenger* Moleküle (149),(183). (III) Der dritte und wohl entscheidende Einfluss von Glukokortikoiden beruht auf einer indirekten genomischen Modifikation. Hierbei interagiert der Glukokortikoid-GR-Komplex nicht direkt mit der nukleären DNA, sondern mit anderen Transkriptionsfaktoren, insbesondere mit NF κ B und dem *activator protein* (AP-1) (149),(180),(181,184). Betrachtet man die genaueren molekularen Mechanismen der NF κ B-Inhibition durch Glukokortikoide bzw. Dexamethason, zeichnet sich ein wesentlich komplexeres Bild (180). So sind etwa direkte Interaktionen zwischen dem aktivierten GR und NF κ B beschrieben, die dessen transkriptionale Aktivität herabsetzen, ohne dabei I κ B α zu beeinflussen (185). Neuere Forschungen konnten für die herabgesetzte Transkriptionsaktivität von NF κ B einen Glukokortikoid-induzierten Leucine Zipper (GILZ, ein DNA bindendes Protein) identifizieren (181), wobei diese Inhibition ebenfalls unabhängig von I κ B α verläuft. In unseren Messungen zeigte sich sogar eine leichte Suppression von I κ B α , während andere Studien eine eindeutige, auf verstärkter I κ B α -Synthese beruhende Inhibition von NF κ B durch Glukokortikoide (186) beschreiben. Zudem sind auch andere Effekte, wie etwa die Inhibition der nukleären Translokation des aktivierten NF κ B-Homodimers durch Dexamethason belegt (184). Außerdem zeigt sich die Dexamethason-Inhibition in ihrer Ausprägung abhängig vom initial stimulierten Rezeptorprofil und den daraus resultierenden Signalkaskaden (184),(187). Forschungsergebnisse belegen zudem die Regulation der NF κ B-Signalkaskade durch ribosomale Proteine. So konnte gezeigt werden, dass das ribosomale Protein S3 (RPS3) als Bindeglied zwischen NF κ B und I κ B α in ruhenden HEK293 Zellen

dient (188) oder dass das ribosomale Protein L3 (rpL3) in Calu-6 Zellen die I κ B α -Stabilität erhöht und somit eine NF κ B-Aktivierung hemmt (189). Berücksichtigt man diese Ergebnisse, erscheint eine Beeinflussung der NF κ B-Signalkaskade durch Interaktion des Fusionsproteins selbst oder durch eines der bei mDC-Aktivierung induzierten Proteine mit ribosomalen Proteinen als weiterer möglicher Einflussfaktor auf die Signalverarbeitung.

Trotzdem war ein Effekt der NF κ B-Inhibition auch hier klar an der Suppression aller gemessenen Interleukine zu erkennen (Abbildung 16), wobei diese bei Anwendung von Dexamethason durch die zusätzliche MAPK-Inhibition umfassender ausfiel als bei Triptolid (nur IL-10, IL-6, TNF- α Sekretion wurden gehemmt, IL-12 hingegen erhöht, Abbildung 16). Zur genaueren Abgrenzung der Beteiligung des NF κ B- und des MAP-Kinase-Signaltransduktionsweges entschieden wir uns für eine spezifischere NF κ B-Inhibition mit den beiden IKK α / β -Inhibitoren BMS-345541 und TPCA-1, da IKKs eine kritische Rolle in der TLR-vermittelten NF κ B-Aktivierung (127) und somit in der pro-inflammatorischen Zytokinsekretion einnehmen (180) (siehe auch Abbildung 7 und 8). Weder BMS-345541 noch TPCA-1 zeigten hierbei einen Einfluss auf die Stoffwechselaktivierung (Abbildung 15 B) der mDCs oder die Phosphorylierung der SAP/JNK und der p38 MAPK oder des mTOR Zielproteins p70 S6K (Abbildung 19 B). Hier fand sich ein weiterer Hinweis darauf, dass die Erhöhung des Glukosestoffwechsels nach Stimulation mit dem Fusionsprotein in Zusammenhang mit der Aktivierung der SAP/JNK steht. Eine tatsächliche Inhibition der Phosphorylierung von NF κ Bp65 ist nach Vorbehandlung der Zellen mit beiden IKK-Inhibitoren (BMS-345541, TPCA-1) feststellbar (Abbildung 19 B). Beide Inhibitoren zeigen zudem eine Hemmung der p42/44 MAPK (Abbildung 19 B).

Bezüglich der Zytokinsekretion lassen beide Inhibitoren keinen Einfluss auf die rFlaA:Betv1-induzierte IL-6 oder IL-10 Sekretion erkennen, während die IL-12-Sekretion supprimiert und die IL-1 β -Ausschüttung erhöht wird (Abbildung 16). BMS-345541 unterdrückt zusätzlich die rFlaA:Betv1-induzierte TNF- α -Sekretion (Abbildung 16). Somit wiesen beide Inhibitoren mit der Ausnahme von TNF- α vergleichbare Muster der Zytokinbeeinflussung auf. Diese Messungen legen unter Berücksichtigung der bei den MAPK gemachten Beobachtungen nahe, dass die NF κ B-Signaltransduktionskaskade nur eine untergeordnete Rolle in der Zytokinproduktion von mDCs nach Stimulation mit rFlaA:Betv1 spielt und im Wesentlichen zur rFlaA:Betv1-vermittelten IL-12-Freisetzung führt. Die erhöhte IL-1 β -

Sekretion trotz NF κ B-Inhibition durch BMS-345541 und TPCA-1 ist möglicherweise durch einen durch die IKK-Inhibition bedingte verstärkte Aktivierung anderer, am ehesten MAPK-abhängiger Signalkaskaden erklärbar. Die Suppression der TNF- α Sekretion durch BMS-345541 lässt sich durch die Inaktivierung von NF κ Bp65 erklären, wobei unklar ist, warum diese bei TPCA-1 nicht auftritt (Abbildung 19 B).

5.6. Die rFlaA:Betv1-vermittelte Aktivierung von MAP-Kinasen trägt wesentlich zur pro- und anti-inflammatorischen Zytokinsekretion bei, während nur die JNK MAP Kinase einen Beitrag zur Aktivierung des Glukosestoffwechsels leistet

MAP-Kinasen werden durch eine Vielzahl verschiedener Reize wie Wachstumsfaktoren, Hormone oder auch über DAMPs und PAMPs aktiviert (129), (130). Durch die Vielzahl der Auslöser bedingt, kommt es zu einer komplexen Vernetzung verschiedener MAPK-Signalkaskaden untereinander, aber auch mit weiteren Signalpfaden wie dem NF κ B- (130) oder dem mTOR-Signalweg (129). Wie an den Western Blot Ergebnissen (Abb. 19 B) zu erkennen war, führte auch die Stimulation mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 zu einer Aktivierung der MAPK-Signalkaskade in BALB/c mDCs charakterisiert durch eine verstärkte Phosphorylierung aller drei Haupt-MAP-Kinasen (p38, p42/44 (ERK) und SAP/JNK, Abbildung 19 B). Die Aktivierung dieser Haupt-MAP-Kinasen führt wiederum zur Aktivierung verschiedener nachgeschalteter Transkriptionsfaktoren und weiterer Proteinkinasen, die auch als *MAPK-activated protein kinases* (MKs, auch MAPKAPK) zusammengefasst werden (129),(130),(190). Forschungsergebnisse belegen, dass unter diesen verschiedenen MKs die ribosomalen p90 S6 Kinasen (RSK) in dendritischen Zellen bei TLR-Stimulation eine Schlüsselrolle in der weiteren Reizverarbeitung einnehmen, da sie sowohl durch die p38- als auch durch die p42/44-MAPK aktiviert werden (190). Ebenso aktivieren p38 und p42/44 die *mitogen- and stress-activated protein kinase* (MSK1), eine weitere MK. MSK1 und RSK wiederum aktivieren den Transkriptionsfaktor *cAMP response element-binding protein* (CREB, siehe Abbildung 7, 8 und 20), der als Knotenpunkt verschiedener intrazellulärer Signalkaskaden eine entscheidende Rolle in der Integration

inflammatorischer Reize einnimmt (129),(190). Ein weiterer zentraler Transkriptionsfaktor, der durch die MAPKs aktiviert wird, ist AP-1 (129). AP-1 und CREB sind dann an der nachgeschalteten Aktivierung zahlreicher pro-inflammatorischer Gene und Prozesse beteiligt (129) (Abbildung 7, 8 und 20).

An dieser Stelle sei erwähnt, dass die Aktivierung der MAPK-Kaskade auch zu einer Aktivierung des NF κ B-Signalwegs führen kann. Das bereits bei der NF κ B-Signalkaskade beschriebene TAK1 (Abb. 8) bildet dabei die Schnittstelle zwischen beiden Signaltransduktionswegen (129). Es aktiviert in seiner Funktion als MAP3K verschiedene MEKs (auch: MAP2K oder MKK: MAPK Kinasen), von denen dann wiederum spezifische MEKs für die Aktivierung der 3 hier beschriebenen Haupt-MAPKs verantwortlich sind (129). Gleichzeitig aktiviert TAK1 - wie bereits beschrieben - die IKKs (128) und steuert somit den NF κ B-Signalweg an. In Übereinstimmung damit zeigte sich bei nicht-inhibierter Stimulation der mDCs mit rFlaA:Betv1 stets eine gleichzeitige Aktivierung beider Signalwege mit verstärkter Phosphorylierung der MAPKs, verstärkter Phosphorylierung von NF κ B und I κ B α sowie eine Reduktion von nicht-phosphorylierten I κ B α (Abb. 19 B).

Die zu erwartende Inhibition der p42/44-MAPK-Phosphorylierung durch U0126 (191) zeigte sich in den Western Blots und ging mit einer gleichzeitigen Suppression der rFlaA:Betv1-vermittelten IL-6 und IL-10-Freisetzung einher (Abbildung 19 B). Die IL-1 β -Sekretion hingegen wurde durch U0126 nur teilweise unterdrückt und es deutete sich eine dosisabhängige Reduktion der TNF- α -Freisetzung an, die allerdings, ebenso wie die erhöhte IL-12-Sekretion, keine statistische Signifikanz erreichte (Abbildung 18). Bei Vorbehandlung mit dem p38 α / β -Inhibitor SB202190 (153) waren mit Ausnahme der rFlaA:Betv1-induzierten IL-1 β -Sekretion, die hier dosisabhängig anstieg, die gleichen Effekte zu beobachten (Abbildung 18). Ein sehr klares und über alle Zytokine signifikantes Bild ergab sich bei einer Inhibition der SAP/JNK-MPAK mit dem Inhibitor SP600125 (156) (Abbildung 18). Unter Abnahme der SAP/JNK-Phosphorylierung sanken die rFlaA:Betv1-vermittelte TNF- α -, IL-6- und IL-10-Sekretion, während IL-1 β und IL-12 anstiegen (Abbildung 18). Besonders auffällig war hier, dass SP600125 als einziger MAPK-Inhibitor eine signifikante, partielle Reduktion der Stoffwechselrate verursachte (Abbildung 17 B). Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass unter den getesteten MAPKs nur die Aktivierung der SAP/JNK-MAPK anteilig zur Aktivierung des Zellmetabolismus der mDCs nach Stimulation mit rFlaA:Betv1 beiträgt. Neuste Forschungsergebnisse von Blanco-

Pérez *et al.* (53) zeigen zudem, dass die Aktivierung des Zellmetabolismus' und der Glukoseverbrauch in murinen mDCs nach Stimulation mit dem TLR-4-Liganden MPLA ebenfalls über die SAP/JNK-MAPK gesteuert wird (53). Es lässt sich daher vermuten, dass diese SAP/JNK-MAPK vermittelte Aktivierung des mDC Stoffwechsels ein genereller Mechanismus der TLR-Signaltransduktionskaskade ist, zumindest bei Ansteuerung der MyD88-abhängigen *Toll-Like-Rezeptoren* (TLR5 ist MyD88-abhängig, TLR4 ist MyD88- und TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon-β*)-abhängig, vgl. Abbildung 8) (119).

Darüber hinaus tragen die Aktivierung der p38-, p42/44-, und JNK MAP-Kinasen zur Fusionsprotein-induzierten IL-10, IL-6 und TNF- α -Freisetzung bei (Abbildung 18, 19 B). Dies ist auch mit den bei Dexamethason gemachten Beobachtungen in Einklang zu bringen: Dort zeigte sich eine Dexamethason-typische (187), reduzierte Phosphorylierung der p38 MAPK sowie eine leichte Reduktion der SAP/JNK MAPK-Phosphorylierung (Abbildung 19 B). Diese Reduktionen erklären sich durch eine erhöhte Enzymaktivität der Glukokortikoid-induzierten MAPK Phosphatase 1 (MKP1), die so verstärkt MAPKs dephosphoryliert und damit inaktiviert (149),(184). Das Glukokortikoid unterdrückte so alle gemessenen Zytokine, ohne bei bestehender SAP/JNK MAPK-Restaktivität Auswirkungen auf die Stoffwechselaktivierung der mDCs zu haben (Abbildung 17 B, 19 B).

A-769662 als JNK MAPK-Inhibitor zeigte in unseren Messungen keinen Einfluss auf die Stoffwechselaktivierung oder die Zytokin-Ausschüttung der mDCs (Abbildung 17 B, 18). Dieser scheinbare Widerspruch zu unseren bisherigen Ergebnissen, die auf einen Zusammenhang zwischen der Aktivierung der SAP/JNK MAPK, der Stoffwechselaktivierung und der Zytokinausschüttung der mDCs hinwiesen, lässt sich durch genauere Betrachtung der Inhibitoreigenschaften aufklären. A-769662 ist primär als Aktivator der AMP-abhängigen Kinase (AMPK) beschrieben (152). Die AMPK selbst dient dabei als intrazellulärer Sensor für den Energiestoffwechsel und als Schalter zwischen einer schnellen, anaeroben Energiegewinnung unter Laktatbildung (Fermentation) und dem langsameren aber energetisch effizienteren oxidativen Metabolismus im Mitochondrium (152). Diese typischerweise bei Tumorzellen zu beobachtende, auch als Warburg-Effekt (99),(105) bezeichnete Glukosefermentation, tritt zudem auch bei starker Aktivierung verschiedener Immunzellen auf (105),(192),(193). So konnte an murinen Makrophagen gezeigt werden, dass die A-769662-induzierte AMPK-Aktivierung und die damit

einhergehende verstärkte Energiegewinnung über die Fettsäure-Oxidation zu einer Reduktion der JNK MAPK Aktivierung führt (194), was wiederum anti-inflammatorische Effekte hat. Auch für murine DCs konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der AMPK einen hemmenden Effekt auf die Zellaktivierung hat (192). In unseren Messungen zeigte sich durch Vorbehandlung der mDCs mit A-769662 jedoch kein Einfluss auf die Metabolismusaktivierung der mDCs nach rFlaA:Betv1-Stimulation und es waren somit auch keine anti-inflammatorischen Effekte im Sinne einer AMPK-Aktivierung, einer Inhibition der SAP/JNK MAPK oder Reduktion der Zytokinsekretion zu erwarten.

Zusammengefasst ging mit der Inhibition der MAPK-Signalkaskade also eine Reduktion der pro-inflammatorischen IL-6- und TNF- α -Sekretion sowie eine Reduktion der anti-inflammatorischen IL-10-Sekretion einher (siehe Abb. 18). Da durch Schülke *et al.* (97) bereits belegt werden konnte, dass die IL-10-Sekretion der mDCs nach rFlaA:Betv1-Stimulation mTOR-abhängig ist (siehe auch Abbildung 12 D), lässt sich eine Interaktion des MAPK und des mTOR-Signalwegs vermuten. Unterstützt wird dies sowohl durch die hier gezeigten Daten als auch durch die von Schülke *et al.* (97) gemachten Beobachtungen, die eine unabhängige Aktivierung des MAPK- und des NF κ B-Signalweges *upstream* des mTOR-Komplexes implizieren. In der Literatur wird dabei besonders eine Interaktion zwischen der p42/44 MAPK/90 kDa ribosomalen S6 Kinase (RSK)-Achse und dem mTOR-Signaltransduktionsweg beschrieben (195).

5.7. Eine Interaktion zwischen den untersuchten Signaltransduktionswegen trägt wesentlich zu der durch das Fusionsprotein verursachten Gesamtimmunantwort bei

Sowohl für p42/44 als auch für die *downstream* davon gelegene RSK sind Interaktionen mit der mTOR-Signalkaskade beschrieben (195),(196),(197). Verschiedene Forschungsergebnisse geben Hinweise darauf, dass der p42/44 (ERK) MAPK-Signaltransduktionsweg mit einer direkten Aktivierung der PI3K und damit einer nachgeschalteten mTOR-Aktivierung einhergeht (198),(195). Des Weiteren führt die p42/44 MAPK/RSK-Aktivierung zu einer Phosphorylierung von TSC-2

(*Tuberous sclerosis 2*, auch: *Tuberin*) (196),(197), wodurch dessen mTORC1-Hemmung aufgehoben und die mTOR-Signalkaskade aktiviert wird (Abbildung 20). Außerdem phosphorylieren die aktivierten ERKs den mTORC1-Aktivator *regulatory associated protein of mTOR* (RAPTOR) direkt und leiten somit eine PI3K-unabhängige mTOR-Aktivierung ein (Abbildung 20) (199). Zuletzt ist zudem eine direkte Aktivierung der *downstream* von mTOR gelegenen p70 S6 Kinase durch die RSK beschrieben (195),(200),(201) (Abbildung 20). Die Hemmung der rFlaA:Betv1-induzierten IL-10 Sekretion durch die hier durchgeführte MAPK-Inhibition wäre allerdings nur dann in Gänze durch die beschriebenen Interaktionen zwischen den beiden Signaltransduktionswegen erklärbar, wenn sich eine direkte Abhängigkeit der mTOR-vermittelten IL-10-Freisetzung von den ko-aktivierenden Stimuli über den MAPK-Signalweg nachweisen ließe. Dies ist anhand der hier erhobenen Daten allerdings nicht möglich. Es sei noch erwähnt, dass sich die nahezu vollständige IL-10-Supprimierung durch den p38 MAPK Inhibitor SB202190 möglicherweise durch dessen, erst in jüngerer Vergangenheit beobachteten, direkten inhibitorischen Einfluss auf den PI3K/mTOR-Signalweg erklären lässt (202).

5.8. Die ausgeprägte rFlaA:Betv1-vermittelte mDC-Aktivierung führt zu einer Veränderung des Zellstoffwechsels mit Ausbildung des Warburg-Effekts

Funktionalität und genaue Ursachen des Warburg-Effekts sind noch nicht vollständig geklärt und Gegenstand aktueller Forschungen (104),(105),(193). Dieser im Vergleich zum oxidativen Glukoseabbau ineffizientere, aber wesentlich schnellere Weg der Energiegewinnung durch Glukosefermentation (104),(105) ist hier wahrscheinlich eine Konsequenz der überaus starken Immunaktivierung der mDCs durch das Fusionsprotein rFlaA:Betv1. Es konnte gezeigt werden, dass TLR-Stimulation in humanen Makrophagen und die daraus resultierende Differenzierung der Zellen hin zum stärker Zytokin-sezernierenden und phagozytierenden M1 Phänotyp mit einem Wechsel des oxidativen Metabolismus hin zur anaeroben Glykolyse verbunden ist (105),(193). Auch für DCs wurde ein wichtiger Zusammenhang zwischen Metabolismusaktivierung und der Effektorfunktion dieser

Immunzellen beschrieben. Die Stoffwechsellumstellung von aerober Glukoseoxidation in den Mitochondrien hin zur Laktatfermentation im Zytosol ist sowohl für die Zytokinsekretion als auch insbesondere für das Überleben der aktivierten DCs essentiell (192),(203). Dieser grundsätzliche Mechanismus der Zellaktivierung ist auch in anderen Immunzellen zu beobachten, scheint dabei aber jeweils Zelltyp-spezifischen Signalkaskaden zu unterliegen (204).

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen bestätigen die schon durch Schülke *et al.* (97) gezeigte entscheidende Rolle des mTOR-Signalwegs in Bezug auf die rFlaA:Betv1-induzierte Stoffwechselaktivierung und IL-10 Sekretion. Die anti-inflammatorischen Eigenschaften von IL-10 können dabei auch auf die Inhibition der Stoffwechselaktivierung der Zellen zurückgeführt werden (205), was an dieser Stelle eine negative Rückkopplung der mDC-Aktivierung durch autokrin sezerniertes IL-10 vermuten lässt. Die Inhibition des Zellmetabolismus über den mTOR-Signaltransduktionweg verläuft dabei über zwei zentrale Transkriptionsfaktoren, nämlich den *Hypoxia-inducible factor 1-alpha* (HIF1 α) (206),(207) sowie den *avian myelocytomatosis virus oncogen cellular homology* (c-Myc). HIF1 α wird dabei intrazellulär unter aneroben Bedingungen stabilisiert und bewirkt eine Aktivierung verschiedener Gene, welche die Energiegewinnung der Zelle von oxidativer Glukoseverwertung hin zu anerober Glykolyse (Fermentation) verschieben (207). Auch c-Myc aktiviert Glykolyse-relevante Gene, induziert aber zudem auch Zielgene für die mitochondriale und damit oxidative Energiegewinnung (207),(208). Es wurde zusätzlich gezeigt, dass mTOR den Transkriptionsfaktor *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT3) an Position Ser727 phosphoryliert und damit essentiell für dessen vollständige Aktivierung ist (209). Hier findet sich daher am wahrscheinlichsten die Erklärung für die rFlaA:Betv1 verursachte IL-10-Sekretion (210). Es lässt sich also annehmen, dass die *downstream* der mTOR-Aktivierung gelegenen, p38-MAPK-, p42/44-MAPK- und NF κ B-unabhängigen Prozesse wiederum durch zwei verschiedene Faktoren gesteuert werden. STAT-3 reguliert hierbei wahrscheinlich die IL-10-Freisetzung, während HIF1a und c-Myc möglicherweise den Zellmetabolismus und somit den Warburg-Effekt steuern.

Interessanterweise waren der Warburg-Effekt und der damit einhergehende Anstieg im Glukosemetabolismus sowohl von der p38- und der p42/44-MAPK als auch von einer NF κ B-Aktivierung unabhängig. Nur die JNK-vermittelte MAPK-Aktivierung ließ zumindest einen partiellen Einfluss auf die Stoffwechselrate der mDCs erkennen.

Eine mögliche Erklärung ist, dass die Metabolismusaktivierung der mDCs nach Stimulation mit rFlaA:Betv1 vor Initiation der Zytokinsekretion über die beobachteten Signalkaskaden geschieht. Außerdem könnten hier nicht beobachtete, alternative Signalwege involviert sein, die parallel und mit Ausnahme der JNK unabhängig von MAP-Kinasen und NF κ B verlaufen, wie beispielsweise die PI3K/AKT-Signalkaskade (siehe Abbildung 20).

6. Zusammenfassung

Abbildung 20 fasst den aktuellen Kenntnisstand über die molekularen Mechanismen, die zu einer *in vitro*-Aktivierung von mDCs durch das Fusionsprotein rFlaA:Betv1 beitragen, zusammen. Sowohl der NF κ B- als auch der MAPK-Signalweg sind in die rFlaA:Betv1-induzierte Zytokinsekretion involviert. Dabei hat jedoch nur die Aktivierung der JNK MAPK Auswirkungen auf den Zellmetabolismus. Durch die erhaltenen Ergebnisse und unter Berücksichtigung der verfügbaren Literatur postulieren wir eine Aufteilung der mTOR-nachgeschalteten Signalkaskade in eine STAT3-abhängige IL-10-Sekretion und eine HIF1 α - und c-Myc-induzierte Stoffwechselaktivierung (Abbildung 20). Die IL-12-Sekretion ist anhand der erhaltenen Ergebnisse wahrscheinlich zum größten Teil NF κ B-abhängig, während die rFlaA:Betv1-vermittelte IL-6- und TNF- α -Sekretion über eine Aktivierung des MAPK-Signalweg verursacht werden (Abbildung 20). Der zusätzliche Einfluss der MAPKs auf die IL-10-Sekretion erklärt sich wahrscheinlich aus deren aktivierenden Einflüssen auf die mTOR-Signalkaskade (Abbildung 20). Die genauen Mechanismen der IL-1 β -Freisetzung bleiben, insbesondere nach dem hier keine Hinweise auf eine Beteiligung des Inflammasoms an der rFlaA:Betv1-vermittelten mDC Aktivierung feststellbar gewesen ist, weiterhin nicht vollständig nachvollziehbar.

Diese Ergebnisse ermöglichen uns ein besseres Verständnis davon, wie die vielversprechenden, flagellinbasierten Impfstoff-Kandidaten die Immunantwort von dendritischen Zellen und damit auch die ausgelöste Gesamtimmunantwort modulieren. Ein besseres Verständnis dieser molekularen Grundlagen ist ein wichtiger Schritt, um die klinische Sicherheit sowie die Wirksamkeit solcher Impfstoffe zu verbessern.

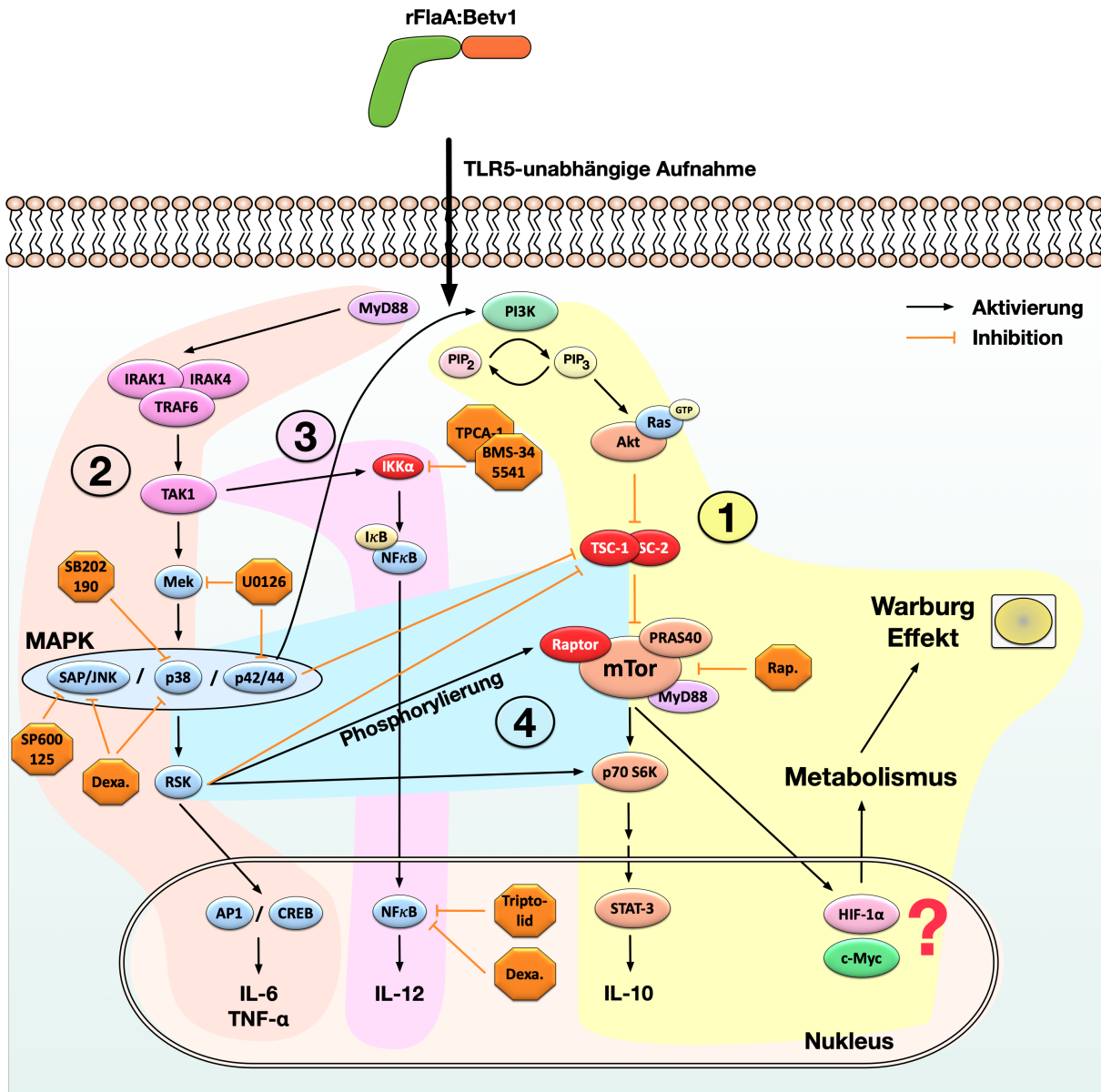


Abbildung 20 – Propagierter Mechanismus der mDC-Aktivierung durch rFlaA:Betv1. Abschnitt 1: Die Stimulation der mDCs mit rFlaA:Betv1 resultiert in einer verstärkten, TLR5-unabhängigen Aufnahme des Fusionsproteins. Die mammalian target of rapamycin complex 1 (mTOR)-vermittelte Aktivierung des Zellmetabolismus' wird vermutlich über den hypoxia-inducible factor 1-alpha (HIF1α) und avian myelocytomatosis virus oncogene cellular homology (c-Myc) vermittelt, während die mTOR-abhängige IL-10 Sekretion über den signal transducer/activator of transcription 3 (STAT3) gesteuert wird (1). Der rFlaA:Betv1-induzierte MAPK-Signaltransduktionsweg verläuft dabei über myeloid differentiation primary response 88 (MyD88), interleukin-1 receptor-associated kinase 1 (IRAK1)/IRAK4/TNF receptor associated Factor 6 (TRAF6)/transforming growth factor beta-activated kinase 1 (TAK1) und steuert die rFlaA:Betv1-vermittelte IL-6- und TNF-α-Freisetzung (2). Über TAK1 aktiviert der MAPK-Signaltransduktionsweg auch die für die IL-12-Sekretion verantwortliche NFκB-Signalkaskade durch die Aktivierung der Inhibitor of κB kinase α/β (IKKα dargestellt), was zu einer Aktivierung und nachgeschalteter Translokation von NFκB in den Zellkern führt (3). Neben den pro-

inflammatorischen Zytokinen (IL-6, TNF- α durch MAPK, IL-12 durch NF κ B) tragen die MAPKs durch Inhibition des *tuberous sclerosis complex 1/2* (TSC-1/2), durch Phosphorylierung des *Regulatory associated protein of mTOR* (RAPTOR) oder durch direkte Aktivierung der ribosomalen p70 S6 Kinase (p70 S6K) über die *Extracellular signal-regulated kinase* (ERK, auch: p42/44) und die ribosomale p90 S6 Kinase (RSK) auch zur IL-10-Freisetzung bei (4). Nur die JNK MAPK trägt hierbei zur Stoffwechselaktivierung durch das Fusionsprotein bei. Ein Einfluss des Inflammasoms auf die Zytokinausschüttung konnte nicht festgestellt werden. Relevante, in dieser Arbeit verwendete Inhibitoren sind in orange hinterlegt. Orangene Pfeile implizieren eine Inhibition, schwarze Pfeile eine Aktivierung nachgeschalteter Faktoren.

IV. Literaturverzeichnis

1. WAO White Book on Allergy: Update 2013 Executive Summary. 2013;
2. Gupta R, Sheikh A, Strachan DP, Anderson HR. Time trends in allergic disorders in the UK. *Thorax*. 1. Januar 2007;62(1):91–6.
3. Langen U, Schmitz R, Steppuhn H. Häufigkeit allergischer Erkrankungen in Deutschland. *Bundesgesundheitsbl*. 1. Mai 2013;56(5):698–706.
4. Sicherer SH, Leung DYM. Advances in allergic skin disease, anaphylaxis, and hypersensitivity reactions to foods, drugs, and insects in 2014. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1. Februar 2015;135(2):357–67.
5. Gupta R, Sheikh A, Strachan DP, Anderson HR. Burden of allergic disease in the UK: secondary analyses of national databases. *Clinical & Experimental Allergy*. 2004;34(4):520–6.
6. Dunbar-Jacob J, Mortimer-Stephens MK. Treatment adherence in chronic disease. *Journal of Clinical Epidemiology*. 1. Dezember 2001;54(12, Supplement 1):S57–60.
7. Kiel MA, Röder E, Gerth van Wijk R, Al MJ, Hop WCJ, Rutten-van Mölken MPMH. Real-life compliance and persistence among users of subcutaneous and sublingual allergen immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1. August 2013;132(2):353-360.e2.
8. Jutel M, Agache I, Bonini S, Burks AW, Calderon M, Canonica W, u. a. International consensus on allergy immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1. September 2015;136(3):556–68.
9. Klimek L, Pfaar O, Bousquet J, Senti G, Kündig T. Allergen immunotherapy in allergic rhinitis: current use and future trends. *Expert Review of Clinical Immunology*. 2. September 2017;13(9):897–906.
10. Burks AW, Calderon MA, Casale T, Cox L, Demoly P, Jutel M, u. a. Update on allergy immunotherapy: American Academy of Allergy, Asthma & Immunology/ European Academy of Allergy and Clinical Immunology/PRACTALL consensus report. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1. Mai 2013;131(5):1288-1296.e3.
11. Brożek JL, Bousquet J, Baena-Cagnani CE, Bonini S, Canonica GW, Casale TB, u. a. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) guidelines: 2010 Revision. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1. September 2010;126(3):466–76.
12. Thyagarajan A, Varshney P, Jones SM, Sicherer S, Wood R, Vickery BP, u. a. Peanut oral immunotherapy is not ready for clinical use. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1. Juli 2010;126(1):31–2.

13. Chu DK, Wood RA, French S, Fiocchi A, Jordana M, Wasserman S, u. a. Oral immunotherapy for peanut allergy (PACE): a systematic review and meta-analysis of efficacy and safety. *The Lancet*. 1. Juni 2019;393(10187):2222–32.
14. Valenta R. The future of antigen-specific immunotherapy of allergy. *Nature Reviews Immunology*. Juni 2002;2(6):446–53.
15. Klimek L, Willers J, Schendzielorz P, Kündig TM, Senti G. Immuntherapie der allergischen Rhinitis ohne Allergene? *HNO*. 1. Oktober 2013;61(10):826–33.
16. Cevhertas L, Лацин Ц, Akdis M, Akdis M. Diverse Mechanisms of Allergen Specific Immunotherapy. *RUDN Journal of Medicine*. 15. Dezember 2019;23(3):233–49.
17. Blaser K. Immunologische Grundlagen der allergenspezifischen Immuntherapie. *HNO*. 1. August 2008;56(8):759–63.
18. Pelaia G, Vatrella A, Busceti MT, Gallelli L, Calabrese C, Terracciano R, u. a. Cellular mechanisms underlying eosinophilic and neutrophilic airway inflammation in asthma. *Mediators Inflamm*. 2015;2015:879783.
19. Larché M, Akdis CA, Valenta R. Immunological mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Nat Rev Immunol*. Oktober 2006;6(10):761–71.
20. Cox L, Larenas-Linnemann D, Lockey RF, Passalacqua G. Speaking the same language: The World Allergy Organization Subcutaneous Immunotherapy Systemic Reaction Grading System. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1. März 2010;125(3):569-574.e7.
21. Akdis CA, Akdis M. Mechanisms and treatment of allergic disease in the big picture of regulatory T cells. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1. April 2009;123(4):735–46.
22. Curin M, Khaitov M, Karaulov A, Namazova-Baranova L, Campana R, Garib V, u. a. Next-Generation of Allergen-Specific Immunotherapies: Molecular Approaches. *Curr Allergy Asthma Rep*. 9. Juni 2018;18(7):39.
23. James LK, Shamji MH, Walker SM, Wilson DR, Wachholz PA, Francis JN, u. a. Long-term tolerance after allergen immunotherapy is accompanied by selective persistence of blocking antibodies. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1. Februar 2011;127(2):509-516.e5.
24. Bousquet J, Khaltaev N, Cruz AA, Denburg J, Fokkens WJ, Togias A, u. a. Allergic Rhinitis and its Impact on Asthma (ARIA) 2008 update (in collaboration with the World Health Organization, GA(2)LEN and AllerGen). *Allergy*. April 2008;63 Suppl 86:8–160.
25. Kristiansen M, Dhimi S, Netuveli G, Halcken S, Muraro A, Roberts G, u. a. Allergen immunotherapy for the prevention of allergy: A systematic review and meta-analysis. *Pediatric Allergy and Immunology*. 2017;28(1):18–29.

26. Blanco-Pérez F, Papp G, Goretzki A, Möller T, Anzaghe M, Schülke S. Adjuvant Allergen Fusion Proteins as Novel Tools for the Treatment of Type I Allergies. *Arch Immunol Ther Exp*. 1. Oktober 2019;67(5):273–93.
27. Anzaghe M, Schülke S, Scheurer S. Virus-Like Particles as Carrier Systems to Enhance Immunomodulation in Allergen Immunotherapy. *Curr Allergy Asthma Rep*. 25. Oktober 2018;18(12):71.
28. Di Pasquale A, Preiss S, Tavares Da Silva F, Garçon N. Vaccine Adjuvants: from 1920 to 2015 and Beyond. *Vaccines (Basel)*. 16. April 2015;3(2):320–43.
29. Chiarella P, Massi E, Robertis MD, Signori E, Fazio VM. Adjuvants in vaccines and for immunisation: current trends. *Expert Opinion on Biological Therapy*. 1. Oktober 2007;7(10):1551–62.
30. Garlapati S, Facci M, Polewicz M, Strom S, Babiuk LA, Mutwiri G, u. a. Strategies to link innate and adaptive immunity when designing vaccine adjuvants. *Veterinary Immunology and Immunopathology*. 15. März 2009;128(1):184–91.
31. Schülke S, Wolfheimer S, Gadermaier G, Wangorsch A, Siebeneicher S, Briza P, u. a. Prevention of Intestinal Allergy in Mice by rflaA:Ova Is Associated with Enforced Antigen Processing and TLR5-Dependent IL-10 Secretion by mDC. *PLoS One* [Internet]. 7. Februar 2014;9(2). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3917841/>
32. Heegaard PMH, Dedieu L, Johnson N, Le Potier M-F, Mockey M, Mutinelli F, u. a. Adjuvants and delivery systems in veterinary vaccinology: current state and future developments. *Arch Virol*. 1. Februar 2011;156(2):183–202.
33. Shi S, Zhu H, Xia X, Liang Z, Ma X, Sun B. Vaccine adjuvants: Understanding the structure and mechanism of adjuvanticity. *Vaccine*. 27. Mai 2019;37(24):3167–78.
34. Kwissa M, Kasturi SP, Pulendran B. The science of adjuvants. *Expert Review of Vaccines*. 1. Oktober 2007;6(5):673–84.
35. Glenny AT. Insoluble Precipitates in Diphtheria and Tetanus Immunization. *Br Med J*. 16. August 1930;2(3632):244–5.
36. von Pirquet C. Allergy. *Journal of Allergy*. 1. November 1961;32(6):525–7.
37. Noon L. PROPHYLACTIC INOCULATION AGAINST HAY FEVER. *The Lancet*. 10. Juni 1911;177(4580):1572–3.
38. Henderson DA. The eradication of smallpox – An overview of the past, present, and future. *Vaccine*. 30. Dezember 2011;29:D7–9.
39. Rappuoli R, Aderem A. A 2020 vision for vaccines against HIV, tuberculosis and malaria. *Nature*. Mai 2011;473(7348):463–9.

40. Li S, Nakaya HI, Kazmin DA, Oh J, Pulendran B. Systems biological approaches to measure and understand vaccine immunity in humans. *Semin Immunol* [Internet]. 31. Oktober 2013;25(3). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3797847/>
41. Hutchison S, Benson RA, Gibson VB, Pollock AH, Garside P, Brewer JM. Antigen depot is not required for alum adjuvant activity. *The FASEB Journal*. 2012;26(3):1272–9.
42. Reed SG, Bertholet S, Coler RN, Friede M. New horizons in adjuvants for vaccine development. *Trends in Immunology*. 1. Januar 2009;30(1):23–32.
43. Billiau A, Matthys P. Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases. *Journal of Leukocyte Biology*. 2001;70(6):849–60.
44. Leroux-Roels G. Unmet needs in modern vaccinology: Adjuvants to improve the immune response. *Vaccine*. 31. August 2010;28:C25–36.
45. Edelman R. Survey of human-use adjuvants. *Expert Review of Vaccines*. 1. April 2003;2(2):167–88.
46. Pellegrino P, Clementi E, Radice S. On vaccine's adjuvants and autoimmunity: Current evidence and future perspectives. *Autoimmunity Reviews*. 1. Oktober 2015;14(10):880–8.
47. Vesikari T, Groth N, Karvonen A, Borkowski A, Pellegrini M. MF59®-adjuvanted influenza vaccine (FLUAD®) in children: Safety and immunogenicity following a second year seasonal vaccination. *Vaccine*. 23. Oktober 2009;27(45):6291–5.
48. Edwards K, Lambert P-H, Black S. Narcolepsy and Pandemic Influenza Vaccination: What We Need to Know to be Ready for the Next Pandemic. *The Pediatric Infectious Disease Journal*. August 2019;38(8):873–876.
49. Gosling R, von Seidlein L. The Future of the RTS,S/AS01 Malaria Vaccine: An Alternative Development Plan. *PLoS Med* [Internet]. 12. April 2016;13(4). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4829262/>
50. Moser C, Müller M, Kaeser MD, Weydemann U, Amacker M. Influenza virosomes as vaccine adjuvant and carrier system. *Expert Review of Vaccines*. 1. Juli 2013;12(7):779–91.
51. Takeuchi O, Akira S. Pattern Recognition Receptors and Inflammation. *Cell*. 19. März 2010;140(6):805–20.
52. Schülke S, Vogel L, Junker A-C, Hanschmann K-M, Flaczyk A, Vieths S, u. a. A Fusion Protein Consisting of the Vaccine Adjuvant Monophosphoryl Lipid A and the Allergen Ovalbumin Boosts Allergen-Specific Th1, Th2, and Th17 Responses In Vitro. *J Immunol Res* [Internet]. 2016;2016. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4908266/>

53. Blanco-Pérez F, Goretzki A, Wolfheimer S, Schülke S. The vaccine adjuvant MPLA activates glycolytic metabolism in mouse mDC by a JNK-dependent activation of mTOR-signaling. *Molecular Immunology*. 1. Februar 2019;106:159–69.
54. Fili L, Cardilicchia E, Maggi E, Parronchi P. Perspectives in vaccine adjuvants for allergen-specific immunotherapy. *Immunology Letters*. 1. Oktober 2014;161(2):207–10.
55. Splawn LM, Bailey CA, Medina JP, Cho JC. Hepatitis B vaccination for the prevention of hepatitis B virus infection in adults in the United States. *Drugs Today*. 2018;54(7):399.
56. Klimek L, Pfaar O. A comparison of immunotherapy delivery methods for allergen immunotherapy. *Expert Review of Clinical Immunology*. 1. Mai 2013;9(5):465–75.
57. Ballester M, Jeanbart L, de Titta A, Nembrini C, Marsland BJ, Hubbell JA, u. a. Nanoparticle conjugation enhances the immunomodulatory effects of intranasally delivered CpG in house dust mite-allergic mice. *Scientific Reports*. 21. September 2015;5(1):14274.
58. Petrovsky N, Aguilar JC. Vaccine adjuvants: Current state and future trends. *Immunology & Cell Biology*. 2004;82(5):488–96.
59. Benito-Villalvilla C, Soria I, Subiza JL, Palomares O. Novel vaccines targeting dendritic cells by coupling allergoids to mannan. *Allergo J Int*. 2018;27(8):256–62.
60. Nguyen NT, Raskopf E, Shah-Hosseini K, Zadoyan G, Mösges R. A review of allergoid immunotherapy: is cat allergy a suitable target? *Immunotherapy*. 9. Februar 2016;8(3):331–49.
61. Sirvent S, Soria I, Cirauqui C, Cases B, Manzano AI, Diez-Rivero CM, u. a. Novel vaccines targeting dendritic cells by coupling allergoids to nonoxidized mannan enhance allergen uptake and induce functional regulatory T cells through programmed death ligand 1. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1. August 2016;138(2):558-567.e11.
62. Laupèze B, Hervé C, Di Pasquale A, Tavares Da Silva F. Adjuvant Systems for vaccines: 13 years of post-licensure experience in diverse populations have progressed the way adjuvanted vaccine safety is investigated and understood. *Vaccine*. 10. September 2019;37(38):5670–80.
63. Garçon N, Mechelen MV. Recent clinical experience with vaccines using MPL- and QS-21-containing Adjuvant Systems. *Expert Review of Vaccines*. 1. April 2011;10(4):471–86.
64. James SF, Chahine EB, Sucher AJ, Hanna C. Shingrix: The New Adjuvanted Recombinant Herpes Zoster Vaccine. *Ann Pharmacother*. 1. Juli 2018;52(7):673–80.

65. Valenta R, Niederberger V. Recombinant allergens for immunotherapy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1. April 2007;119(4):826–30.
66. Rajakulendran M, Tham E, Soh J, Bever H. Novel strategies in immunotherapy for allergic diseases. *Asia Pacific Allergy*. 9. April 2018;8.
67. Salazar-Gonzalez R-M, Srinivasan A, Griffin A, Muralimohan G, Ertelt JM, Ravindran R, u. a. Salmonella Flagellin Induces Bystander Activation of Splenic Dendritic Cells and Hinders Bacterial Replication In Vivo. *The Journal of Immunology*. 1. November 2007;179(9):6169–75.
68. Pacheco Y, Acosta-Ampudia Y, Monsalve DM, Chang C, Gershwin ME, Anaya J-M. Bystander activation and autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*. 1. September 2019;103:102301.
69. Huleatt JW, Jacobs AR, Tang J, Desai P, Kopp EB, Huang Y, u. a. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine*. 8. Januar 2007;25(4):763–75.
70. Khan S, Bijker MS, Weterings JJ, Tanke HJ, Adema GJ, Hall T van, u. a. Distinct Uptake Mechanisms but Similar Intracellular Processing of Two Different Toll-like Receptor Ligand-Peptide Conjugates in Dendritic Cells. *J Biol Chem*. 20. Juli 2007;282(29):21145–59.
71. Schülke S, Burggraf M, Waibler Z, Wangorsch A, Wolfheimer S, Kalinke U, u. a. A fusion protein of flagellin and ovalbumin suppresses the TH2 response and prevents murine intestinal allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1. Dezember 2011;128(6):1340-1348.e12.
72. Song L, Xiong D, Kang X, Yang Y, Wang J, Guo Y, u. a. An avian influenza A (H7N9) virus vaccine candidate based on the fusion protein of hemagglutinin globular head and *Salmonella typhimurium* flagellin. *BMC Biotechnol*. 19. August 2015;15(1):79.
73. Sheikh NA, Petrylak D, Kantoff PW, dela Rosa C, Stewart FP, Kuan L-Y, u. a. Sipuleucel-T immune parameters correlate with survival: an analysis of the randomized phase 3 clinical trials in men with castration-resistant prostate cancer. *Cancer Immunol Immunother*. Januar 2013;62(1):137–47.
74. Kantoff PW, Higano CS, Shore ND, Berger ER, Small EJ, Penson DF, u. a. Sipuleucel-T Immunotherapy for Castration-Resistant Prostate Cancer. *New England Journal of Medicine*. 29. Juli 2010;363(5):411–22.
75. Niespodziana K, Focke-Tejkl M, Linhart B, Civaj V, Blatt K, Valent P, u. a. A hypoallergenic cat vaccine based on Fel d 1–derived peptides fused to hepatitis B PreS. *J Allergy Clin Immunol*. 1. Juni 2011;127(6):1562-70.e6.
76. Marth K, Breyer I, Focke-Tejkl M, Blatt K, Shamji MH, Layhadi J, u. a. A Nonallergenic Birch Pollen Allergy Vaccine Consisting of Hepatitis PreS–Fused Bet v 1 Peptides Focuses Blocking IgG toward IgE Epitopes and Shifts Immune

- Responses to a Tolerogenic and Th1 Phenotype. *J Immunol.* 1. April 2013;190(7):3068–78.
77. Niederberger V, Neubauer A, Gevaert P, Zidarn M, Worm M, Aberer W, u. a. Safety and efficacy of immunotherapy with the recombinant B-cell epitope-based grass pollen vaccine BM32. *J Allergy Clin Immunol.* 2018;142(2):497-509.e9.
 78. Ziegelmayer P, Focke-Tejkl M, Schmutz R, Lemell P, Ziegelmayer R, Weber M, u. a. Mechanisms, safety and efficacy of a B cell epitope-based vaccine for immunotherapy of grass pollen allergy. *EBioMedicine.* September 2016;11:43–57.
 79. Salari F, Vahedi F, Varasteh A-R, Ketabdar H, Chamani J, Sankian M. Enhanced sublingual immunotherapy by TAT-fused recombinant allergen in a murine rhinitis model. *International Immunopharmacology.* 1. Juli 2017;48:118–25.
 80. Cramer R, Flückiger S, Daigle I, Kündig T, Rhyner C. Design, engineering and in vitro evaluation of MHC class-II targeting allergy vaccines. *Allergy.* 2007;62(2):197–206.
 81. Senti G, Cramer R, Kuster D, Johansen P, Martinez-Gomez JM, Graf N, u. a. Intralymphatic immunotherapy for cat allergy induces tolerance after only 3 injections. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 1. Mai 2012;129(5):1290–6.
 82. Zaleska A, Eiwegger T, Soyer Ö, Veen W van de, Rhyner C, Soyka MB, u. a. Immune regulation by intralymphatic immunotherapy with modular allergen translocation MAT vaccine. *Allergy.* 2014;69(9):1162–70.
 83. Hoang VV, Zou Y, Kurata K, Enomoto K. Expression of recombinant T-cell epitopes of major Japanese cedar pollen allergens fused with cholera toxin B subunit in *Escherichia coli*. *Protein Expression and Purification.* 1. Mai 2015;109:62–9.
 84. Fanuel S, Tabesh S, Mokhtarian K, Saroddiny E, Fazlollahi MR, Pourpak Z, u. a. Construction of a recombinant B-cell epitope vaccine based on a Der p1-derived hypoallergen: a bioinformatics approach. *Immunotherapy.* 23. März 2018;10(7):537–53.
 85. Anzengruber J, Bublin M, Bönisch E, Janesch B, Tscheppe A, Braun ML, u. a. *Lactobacillus buchneri* S-layer as carrier for an Ara h 2-derived peptide for peanut allergen-specific immunotherapy. *Mol Immunol.* 2017;85:81–8.
 86. Creticos PS, Schroeder JT, Hamilton RG, Balcer-Whaley SL, Khattignavong AP, Lindblad R, u. a. Immunotherapy with a Ragweed–Toll-Like Receptor 9 Agonist Vaccine for Allergic Rhinitis. *New England Journal of Medicine.* 5. Oktober 2006;355(14):1445–55.
 87. Dynavax Presents New Analysis of TOLAMBA(TM) Data at ACAAI Meeting | Dynavax Technologies Corporation [Internet]. Verfügbar unter:

<http://investors.dynavax.com/news-releases/news-release-details/dynavax-presents-new-analysis-tolambatm-data-acaaai-meeting>

88. Hayashi F, Smith KD, Ozinsky A, Hawn TR, Yi EC, Goodlett DR, u. a. The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*. April 2001;410(6832):1099–103.
89. Stepanova LA, Kotlyarov RY, Kovaleva AA, Potapchuk MV, Korotkov AV, Sergeeva MV, u. a. Protection against Multiple Influenza A Virus Strains Induced by Candidate Recombinant Vaccine Based on Heterologous M2e Peptides Linked to Flagellin. *PLoS One* [Internet]. 23. März 2015;10(3). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4370815/>
90. Delaney KN, Phipps JP, Johnson JB, Mizel SB. A Recombinant Flagellin-Poxvirus Fusion Protein Vaccine Elicits Complement-Dependent Protection Against Respiratory Challenge with Vaccinia Virus in Mice. *Viral Immunology*. 1. April 2010;23(2):201–10.
91. Lee SE, Nguyen CT, Kim SY, Thi TN, Rhee JH. Tetanus toxin fragment C fused to flagellin makes a potent mucosal vaccine. *Clinical and Experimental Vaccine Research*. 1. Januar 2015;4(1):59–67.
92. Weimer ET, Lu H, Kock ND, Wozniak DJ, Mizel SB. A Fusion Protein Vaccine Containing OprF Epitope 8, OprI, and Type A and B Flagellins Promotes Enhanced Clearance of Nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Infection and Immunity*. 1. Juni 2009;77(6):2356–66.
93. Turley CB, Rupp RE, Johnson C, Taylor DN, Wolfson J, Tussey L, u. a. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e–flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. *Vaccine*. 18. Juli 2011;29(32):5145–52.
94. Treanor JJ, Taylor DN, Tussey L, Hay C, Nolan C, Fitzgerald T, u. a. Safety and immunogenicity of a recombinant hemagglutinin influenza–flagellin fusion vaccine (VAX125) in healthy young adults. *Vaccine*. 6. Dezember 2010;28(52):8268–74.
95. Kitzmüller C, Kalser J, Mutschlechner S, Hauser M, Zlabinger GJ, Ferreira F, u. a. Fusion proteins of flagellin and the major birch pollen allergen Bet v 1 show enhanced immunogenicity, reduced allergenicity, and intrinsic adjuvanticity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1. Januar 2018;141(1):293-299.e6.
96. Schülke S, Kuttich K, Wolfheimer S, Duschek N, Wangorsch A, Reuter A, u. a. Author Correction: Conjugation of wildtype and hypoallergenic mugwort allergen Art v 1 to flagellin induces IL-10-DC and suppresses allergen-specific TH2-responses in vivo. *Scientific Reports*. 6. Februar 2018;8(1):1–1.
97. Schülke S, Fiedler A-H, Junker A-C, Flaczyk A, Wolfheimer S, Wangorsch A, u. a. Critical role of mammalian target of rapamycin for IL-10 dendritic cell induction by a flagellin A conjugate in preventing allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol*. Mai 2018;141(5):1786-1798.e11.

98. van Hage-Hamsten M, Kronqvist M, Zetterström O, Johansson E, Niederberger V, Vrtala S, u. a. Skin test evaluation of genetically engineered hypoallergenic derivatives of the major birch pollen allergen, Bet v 1: Results obtained with a mix of two recombinant Bet v 1 fragments and recombinant Bet v 1 trimer in a Swedish population before the birch pollen season. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. 1. November 1999;104(5):969–77.
99. Warburg O. The Metabolism of Carcinoma Cells. *The Journal of Cancer Research*. 1. März 1925;9(1):148–63.
100. Narayanan K, Erathodiyil N, Gopalan B, Chong S, Wan ACA, Ying JY. Targeting Warburg Effect in Cancers with PEGylated Glucose. *Adv Healthc Mater*. März 2016;5(6):696–701.
101. Jung CH, Ro S-H, Cao J, Otto NM, Kim D-H. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Letters*. 2010;584(7):1287–95.
102. Säemann MD, Haidinger M, Hecking M, Hörl WH, Weichhart T. The Multifunctional Role of mTOR in Innate Immunity: Implications for Transplant Immunity. *American Journal of Transplantation*. 2009;9(12):2655–61.
103. Powell JD, Pollizzi KN, Heikamp EB, Horton MR. Regulation of Immune Responses by mTOR. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:39–68.
104. Liberti MV, Locasale JW. The Warburg Effect: How Does it Benefit Cancer Cells? *Trends in Biochemical Sciences*. 1. März 2016;41(3):211–8.
105. Dandapani M, Hardie DG. AMPK: opposing the metabolic changes in both tumour cells and inflammatory cells? *Biochem Soc Trans*. 1. April 2013;41(2):687–93.
106. Martinon F, Burns K, Tschopp J. The Inflammasome: A Molecular Platform Triggering Activation of Inflammatory Caspases and Processing of proIL- β . *Molecular Cell*. 1. August 2002;10(2):417–26.
107. Xiao Y, Xu W, Su W. NLRP3 inflammasome: A likely target for the treatment of allergic diseases. *Clinical & Experimental Allergy*. 2018;48(9):1080–91.
108. Davis BK, Wen H, Ting JP-Y. The Inflammasome NLRs in Immunity, Inflammation, and Associated Diseases. *Annual Review of Immunology*. 2011;29(1):707–35.
109. Broz P, Dixit VM. Inflammasomes: mechanism of assembly, regulation and signalling. *Nature Reviews Immunology*. Juli 2016;16(7):407–20.
110. Cook GP, Savic S, Wittmann M, McDermott MF. The NLRP3 inflammasome, a target for therapy in diverse disease states. *European Journal of Immunology*. 2010;40(3):631–4.
111. Kofoed EM, Vance RE. Innate immune recognition of bacterial ligands by NAIPs determines inflammasome specificity. *Nature*. September 2011;477(7366):592–5.

112. Franchi L, Muñoz-Planillo R, Núñez G. Sensing and reacting to microbes through the inflammasomes. *Nature Immunology*. April 2012;13(4):325–32.
113. Zhao Y, Yang J, Shi J, Gong Y-N, Lu Q, Xu H, u. a. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature*. September 2011;477(7366):596–600.
114. Tentorey JL, Kofoed EM, Daugherty MD, Malik HS, Vance RE. Molecular Basis for Specific Recognition of Bacterial Ligands by NAIP/NLRC4 Inflammasomes. *Molecular Cell*. 10. April 2014;54(1):17–29.
115. Zhang L, Chen S, Ruan J, Wu J, Tong AB, Yin Q, u. a. Cryo-EM structure of the activated NAIP2-NLRC4 inflammasome reveals nucleated polymerization. *Science*. 23. Oktober 2015;350(6259):404–9.
116. Shi J, Zhao Y, Wang K, Shi X, Wang Y, Huang H, u. a. Cleavage of GSDMD by inflammatory caspases determines pyroptotic cell death. *Nature*. Oktober 2015;526(7575):660–5.
117. Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: Gasdermin-Mediated Programmed Necrotic Cell Death. *Trends in Biochemical Sciences*. 1. April 2017;42(4):245–54.
118. Cullen SP, Kearney CJ, Clancy DM, Martin SJ. Diverse Activators of the NLRP3 Inflammasome Promote IL-1 β Secretion by Triggering Necrosis. *Cell Reports*. 16. Juni 2015;11(10):1535–48.
119. Kawasaki T, Kawai T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front Immunol* [Internet]. 2014;5. Verfügbar unter: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fimmu.2014.00461/full>
120. Liu S, Chen ZJ. Expanding role of ubiquitination in NF- κ B signaling. *Cell Research*. Januar 2011;21(1):6–21.
121. Kawai T, Akira S. TLR signaling. *Seminars in Immunology*. 1. Februar 2007;19(1):24–32.
122. Sato S, Sanjo H, Takeda K, Ninomiya-Tsuji J, Yamamoto M, Kawai T, u. a. Essential function for the kinase TAK1 in innate and adaptive immune responses. *Nature Immunology*. November 2005;6(11):1087–95.
123. Deguine J, Barton GM. MyD88: a central player in innate immune signaling. *F1000Prime Rep* [Internet]. 4. November 2014;6. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4229726/>
124. Lin S-C, Lo Y-C, Wu H. Helical assembly in the MyD88–IRAK4–IRAK2 complex in TLR/IL-1R signalling. *Nature*. Juni 2010;465(7300):885–90.
125. Kollwe C, Mackensen A-C, Neumann D, Knop J, Cao P, Li S, u. a. Sequential Autophosphorylation Steps in the Interleukin-1 Receptor-associated Kinase-1 Regulate its Availability as an Adapter in Interleukin-1 Signaling. *J Biol Chem*. 13. Februar 2004;279(7):5227–36.

126. Skaug B, Jiang X, Chen ZJ. The Role of Ubiquitin in NF- κ B Regulatory Pathways. *Annual Review of Biochemistry*. 2009;78(1):769–96.
127. Carmody RJ, Chen YH. Nuclear factor-kappaB: activation and regulation during toll-like receptor signaling. *Cell Mol Immunol*. Februar 2007;4(1):31–41.
128. Solt LA, Madge LA, Orange JS, May MJ. Interleukin-1-induced NF- κ B Activation Is NEMO-dependent but Does Not Require IKK β . *J Biol Chem*. 23. März 2007;282(12):8724–33.
129. Kyriakis JM, Avruch J. Mammalian MAPK Signal Transduction Pathways Activated by Stress and Inflammation: A 10-Year Update. *Physiological Reviews*. 1. April 2012;92(2):689–737.
130. Burotto M, Chiou VL, Lee J-M, Kohn EC. The MAPK pathway across different malignancies: A new perspective. *Cancer*. 2014;120(22):3446–56.
131. Schülke S, Waibler Z, Mende M-S, Zoccatelli G, Vieths S, Toda M, u. a. Fusion protein of TLR5-ligand and allergen potentiates activation and IL-10 secretion in murine myeloid DC. *Mol Immunol*. Dezember 2010;48(1–3):341–50.
132. Siebeneicher S, Reuter S, Krause M, Wangorsch A, Maxeiner J, Wolfheimer S, u. a. Epicutaneous immune modulation with Bet v 1 plus R848 suppresses allergic asthma in a murine model. *Allergy*. März 2014;69(3):328–37.
133. Gornall AG, Bardawill CJ, David MM. Determination of serum proteins by means of the biuret reaction. *J Biol Chem*. Februar 1949;177(2):751–66.
134. Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*. August 1970;227(5259):680–5.
135. Heitman J, Movva NR, Hall MN. Targets for cell cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science*. 23. August 1991;253(5022):905–9.
136. Lee VW, Chapman JR. Sirolimus: Its role in nephrology (Review Article). *Nephrology*. 2005;10(6):606–14.
137. Sola D, Rossi L, Schianca GPC, Maffioli P, Bigliocca M, Mella R, u. a. Sulfonylureas and their use in clinical practice. *Arch Med Sci*. 12. August 2015;11(4):840–8.
138. Laliberte RE, Egger J, Gabel CA. ATP treatment of human monocytes promotes caspase-1 maturation and externalization. *J Biol Chem*. 24. Dezember 1999;274(52):36944–51.
139. Gros Lambert M, Py BF. Spotlight on the NLRP3 inflammasome pathway. *J Inflamm Res*. 2018;11:359–74.
140. Garcia-Calvo M, Peterson EP, Leiting B, Ruel R, Nicholson DW, Thornberry NA. Inhibition of human caspases by peptide-based and macromolecular inhibitors. *J Biol Chem*. 4. Dezember 1998;273(49):32608–13.

141. Van Opdenbosch N, Gurung P, Vande Walle L, Fossoul A, Kanneganti T-D, Lamkanfi M. Activation of the NLRP1b inflammasome independently of ASC-mediated caspase-1 autoproteolysis and speck formation. *Nat Commun* [Internet]. 4. Februar 2014;5. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3926011/>
142. Slee EA, Zhu H, Chow SC, MacFarlane M, Nicholson DW, Cohen GM. Benzyloxycarbonyl-Val-Ala-Asp (OMe) fluoromethylketone (Z-VAD.FMK) inhibits apoptosis by blocking the processing of CPP32. *Biochem J*. 1. April 1996;315 (Pt 1):21–4.
143. Wannamaker W, Davies R, Namchuk M, Pollard J, Ford P, Ku G, u. a. (S)-1-((S)-2-[[1-(4-Amino-3-chloro-phenyl)-methanoyl]-amino]-3,3-dimethyl-butanoyl)-pyrrolidine-2-carboxylic acid ((2R,3S)-2-ethoxy-5-oxo-tetrahydro-furan-3-yl)-amide (VX-765), an Orally Available Selective Interleukin (IL)-Converting Enzyme/Caspase-1 Inhibitor, Exhibits Potent Anti-Inflammatory Activities by Inhibiting the Release of IL-1 β and IL-18. *J Pharmacol Exp Ther*. 1. Mai 2007;321(2):509–16.
144. Pierce JW, Schoenleber R, Jesmok G, Best J, Moore SA, Collins T, u. a. Novel Inhibitors of Cytokine-induced I κ B α Phosphorylation and Endothelial Cell Adhesion Molecule Expression Show Anti-inflammatory Effects in Vivo. *J Biol Chem*. 22. August 1997;272(34):21096–103.
145. Qiu D, Zhao G, Aoki Y, Shi L, Uyei A, Nazarian S, u. a. Immunosuppressant PG490 (Triptolide) Inhibits T-cell Interleukin-2 Expression at the Level of Purine-box/Nuclear Factor of Activated T-cells and NF- κ B Transcriptional Activation. *J Biol Chem*. 5. Juli 1999;274(19):13443–50.
146. Carter BZ, Mak DH, Schober WD, McQueen T, Harris D, Estrov Z, u. a. Triptolide induces caspase-dependent cell death mediated via the mitochondrial pathway in leukemic cells. *Blood*. 15. Juli 2006;108(2):630–7.
147. Kiviharju TM, Lecane PS, Sellers RG, Peehl DM. Antiproliferative and Proapoptotic Activities of Triptolide (PG490), a Natural Product Entering Clinical Trials, on Primary Cultures of Human Prostatic Epithelial Cells. *Clin Cancer Res*. 1. August 2002;8(8):2666–74.
148. Ramgolam V, Ang SG, Lai YH, Loh CS, Yap HK. Traditional Chinese medicines as immunosuppressive agents. *Ann Acad Med Singap*. Januar 2000;29(1):11–6.
149. Rhen T, Cidlowski JA. Antiinflammatory Action of Glucocorticoids — New Mechanisms for Old Drugs. *New England Journal of Medicine*. 20. Oktober 2005;353(16):1711–23.
150. Nan J, Du Y, Chen X, Bai Q, Wang Y, Zhang X, u. a. TPCA-1 Is a Direct Dual Inhibitor of STAT3 and NF- κ B and Regresses Mutant EGFR-Associated Human Non-Small Cell Lung Cancers. *Mol Cancer Ther*. 1. März 2014;13(3):617–29.

151. Burke JR, Pattoli MA, Gregor KR, Brassil PJ, MacMaster JF, McIntyre KW, u. a. BMS-345541 Is a Highly Selective Inhibitor of I κ B Kinase That Binds at an Allosteric Site of the Enzyme and Blocks NF- κ B-dependent Transcription in Mice. *J Biol Chem.* 17. Januar 2003;278(3):1450–6.
152. Göransson O, McBride A, Hawley SA, Ross FA, Shpiro N, Foretz M, u. a. MECHANISM OF ACTION OF A-769662, A VALUABLE TOOL FOR ACTIVATION OF AMP-ACTIVATED PROTEIN KINASE. *J Biol Chem.* 9. November 2007;282(45):32549–60.
153. Lee JC, Laydon JT, McDonnell PC, Gallagher TF, Kumar S, Green D, u. a. A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. *Nature.* Dezember 1994;372(6508):739.
154. Duncia JV, Santella JB, Higley CA, Pitts WJ, Wityak J, Fietze WE, u. a. MEK inhibitors: The chemistry and biological activity of U0126, its analogs, and cyclization products. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 20. Oktober 1998;8(20):2839–44.
155. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, u. a. Mitogen-Activated Protein (MAP) Kinase Pathways: Regulation and Physiological Functions. *Endocr Rev.* 1. April 2001;22(2):153–83.
156. Bennett BL, Sasaki DT, Murray BW, O’Leary EC, Sakata ST, Xu W, u. a. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *PNAS.* 20. November 2001;98(24):13681–6.
157. Cuadros C, Lopez-Hernandez FJ, Dominguez AL, McClelland M, Lustgarten J. Flagellin Fusion Proteins as Adjuvants or Vaccines Induce Specific Immune Responses. *Infection and Immunity.* 1. Mai 2004;72(5):2810–6.
158. Bruchard M, Rebé C, Derangère V, Togbé D, Ryffel B, Boidot R, u. a. The receptor NLRP3 is a transcriptional regulator of T H 2 differentiation. *Nature Immunology.* August 2015;16(8):859–70.
159. Rossios C, Pavlidis S, Hoda U, Kuo C-H, Wiegman C, Russell K, u. a. Sputum transcriptomics reveal upregulation of IL-1 receptor family members in patients with severe asthma. *Journal of Allergy and Clinical Immunology.* 1. Februar 2018;141(2):560–70.
160. Watanabe H, Gaide O, Pétrilli V, Martinon F, Contassot E, Roques S, u. a. Activation of the IL-1 β -Processing Inflammasome Is Involved in Contact Hypersensitivity. *Journal of Investigative Dermatology.* 1. August 2007;127(8):1956–63.
161. Adam C, Wohlfarth J, Haußmann M, Sennefelder H, Rodin A, Maler M, u. a. Allergy-Inducing Chromium Compounds Trigger Potent Innate Immune Stimulation Via ROS-Dependent Inflammasome Activation. *Journal of Investigative Dermatology.* 1. Februar 2017;137(2):367–76.

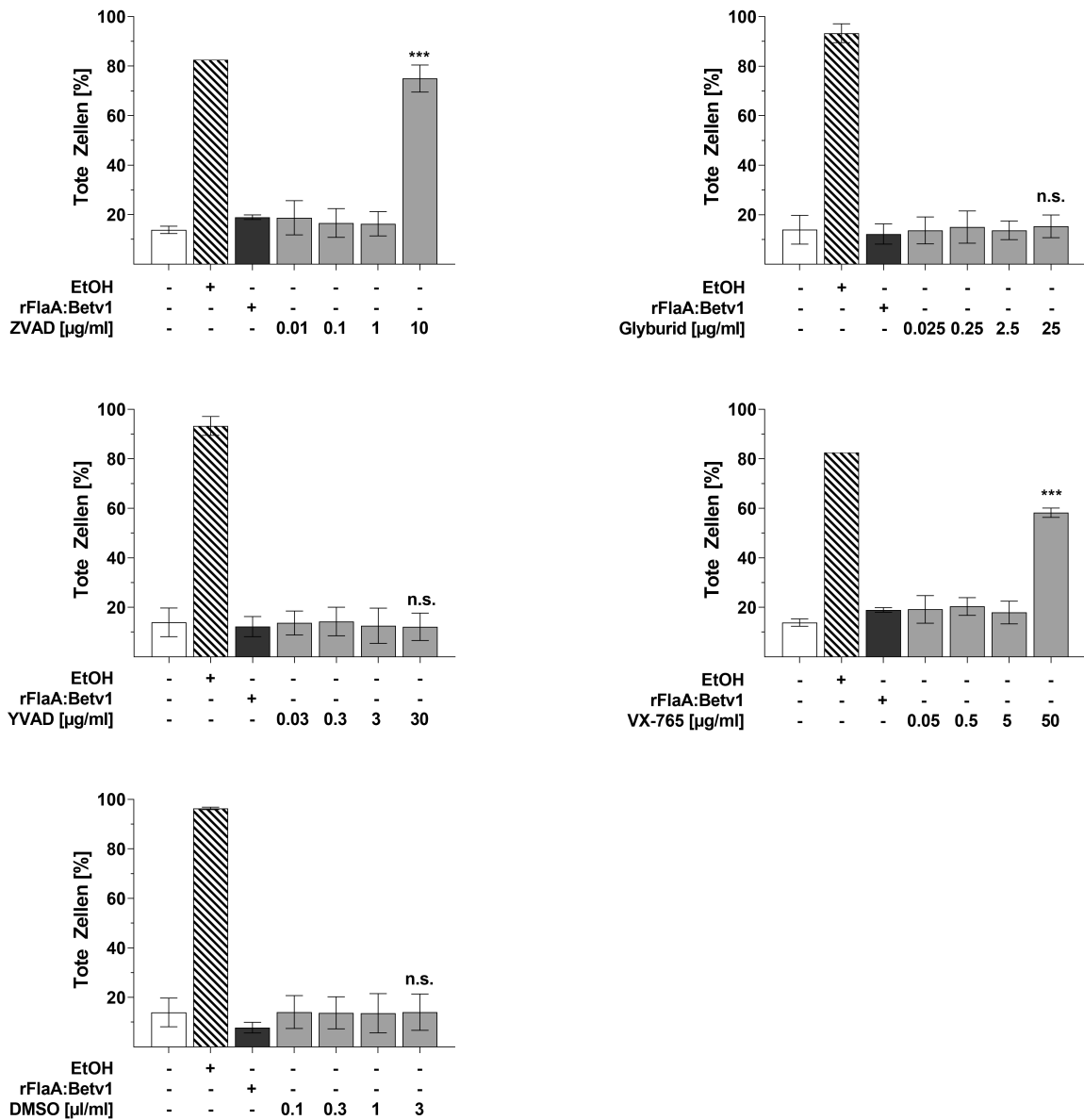
162. Simpson JL, Phipps S, Baines KJ, Oreo KM, Gunawardhana L, Gibson PG. Elevated expression of the NLRP3 inflammasome in neutrophilic asthma. *European Respiratory Journal*. 1. April 2014;43(4):1067–76.
163. Xiao L, Jiang L, Hu Q, Li Y. MicroRNA-133b Ameliorates Allergic Inflammation and Symptom in Murine Model of Allergic Rhinitis by Targeting Nlrp3. *CPB*. 2017;42(3):901–12.
164. He Y, Hara H, Núñez G. Mechanism and regulation of NLRP3 inflammasome activation. *Trends Biochem Sci*. Dezember 2016;41(12):1012–21.
165. Muñoz-Planillo R, Kuffa P, Martínez-Colón G, Smith BL, Rajendiran TM, Núñez G. K⁺ Efflux Is the Common Trigger of NLRP3 Inflammasome Activation by Bacterial Toxins and Particulate Matter. *Immunity*. 27. Juni 2013;38(6):1142–53.
166. Ruiz VMR, Ramirez J, Naseer N, Palacio NM, Siddarthan IJ, Yan BM, u. a. Broad detection of bacterial type III secretion system and flagellin proteins by the human NAIP/NLRC4 inflammasome. *PNAS*. 12. Dezember 2017;114(50):13242–7.
167. Kortmann J, Brubaker SW, Monack DM. Cutting Edge: Inflammasome Activation in Primary Human Macrophages Is Dependent on Flagellin. *J Immunol*. 1. August 2015;195(3):815–9.
168. Lamkanfi M, Mueller JL, Vitari AC, Misaghi S, Fedorova A, Deshayes K, u. a. Glyburide inhibits the Cryopyrin/Nalp3 inflammasome. *J Cell Biol*. 5. Oktober 2009;187(1):61–70.
169. He Y, Franchi L, Núñez G. TLR Agonists Stimulate Nlrp3-Dependent IL-1 β Production Independently of the Purinergic P2X7 Receptor in Dendritic Cells and In Vivo. *The Journal of Immunology*. 1. Januar 2013;190(1):334–9.
170. Brown K, Gerstberger S, Carlson L, Franzoso G, Siebenlist U. Control of I kappa B-alpha proteolysis by site-specific, signal-induced phosphorylation. *Science*. 10. März 1995;267(5203):1485–8.
171. Chang W-T, Kang JJ, Lee K-Y, Wei K, Anderson E, Gotmare S, u. a. Triptolide and Chemotherapy Cooperate in Tumor Cell Apoptosis A ROLE FOR THE p53 PATHWAY. *J Biol Chem*. 19. Januar 2001;276(3):2221–7.
172. Westerheide SD, Kawahara TLA, Orton K, Morimoto RI. Triptolide, an inhibitor of the human heat shock response that enhances stress-induced cell death. *J Biol Chem*. 7. April 2006;281(14):9616–22.
173. Li X-J, Jiang Z-Z, Zhang L. Triptolide: Progress on research in pharmacodynamics and toxicology. *Journal of Ethnopharmacology*. 8. August 2014;155(1):67–79.
174. Matta R, Wang X, Ge H, Ray W, Nelin LD, Liu Y. Triptolide induces anti-inflammatory cellular responses. *Am J Transl Res*. 5. März 2009;1(3):267–82.

175. Fuchs SY, Adler V, Pincus MR, Ronai Z. MEKK1/JNK signaling stabilizes and activates p53. *PNAS*. 1. September 1998;95(18):10541–6.
176. Park J, Liu AYC. JNK phosphorylates the HSF1 transcriptional activation domain: Role of JNK in the regulation of the heat shock response. *Journal of Cellular Biochemistry*. 2001;82(2):326–38.
177. Pan X-D, Chen X-C, Zhu Y-G, Chen L-M, Zhang J, Huang T-W, u. a. Tripchlorolide protects neuronal cells from microglia-mediated β -amyloid neurotoxicity through inhibiting NF- κ B and JNK signaling. *Glia*. 2009;57(11):1227–38.
178. Yang Y, Ye Y, Qiu Q, Xiao Y, Huang M, Shi M, u. a. Triptolide inhibits the migration and invasion of rheumatoid fibroblast-like synoviocytes by blocking the activation of the JNK MAPK pathway. *International Immunopharmacology*. 1. Dezember 2016;41:8–16.
179. Fardet L, Petersen I, Nazareth I. Prevalence of long-term oral glucocorticoid prescriptions in the UK over the past 20 years. *Rheumatology (Oxford)*. 1. November 2011;50(11):1982–90.
180. De Bosscher K, Vanden Berghe W, Haegeman G. The Interplay between the Glucocorticoid Receptor and Nuclear Factor- κ B or Activator Protein-1: Molecular Mechanisms for Gene Repression. *Endocr Rev*. 1. August 2003;24(4):488–522.
181. Marco BD, Massetti M, Bruscoli S, Macchiarulo A, Virgilio RD, Velardi E, u. a. Glucocorticoid-induced leucine zipper (GILZ)/NF- κ B interaction: role of GILZ homo-dimerization and C-terminal domain. *Nucleic Acids Res*. 15. Januar 2007;35(2):517–28.
182. Hebbar PB, Archer TK. Chromatin remodeling by nuclear receptors. *Chromosoma*. 1. Mai 2003;111(8):495–504.
183. Schmidt BMW, Gerdes D, Feuring M, Falkenstein E, Christ M, Wehling M. Rapid, Nongenomic Steroid Actions: A New Age? *Frontiers in Neuroendocrinology*. 1. Januar 2000;21(1):57–94.
184. Bhattacharyya S, Ratajczak CK, Vogt SK, Kelley C, Colonna M, Schreiber RD, u. a. TAK1 targeting by glucocorticoids determines JNK and I κ B regulation in Toll-like receptor-stimulated macrophages. *Blood*. 11. März 2010;115(10):1921–31.
185. Bosscher KD, Schmitz ML, Berghe WV, Plaisance S, Fiers W, Haegeman G. Glucocorticoid-mediated repression of nuclear factor- κ B-dependent transcription involves direct interference with transactivation. *PNAS*. 9. Dezember 1997;94(25):13504–9.
186. Auphan N, DiDonato JA, Rosette C, Helmsberg A, Karin M. Immunosuppression by Glucocorticoids: Inhibition of NF- κ B Activity Through Induction of I κ B Synthesis. *Science*. 13. Oktober 1995;270(5234):286–90.

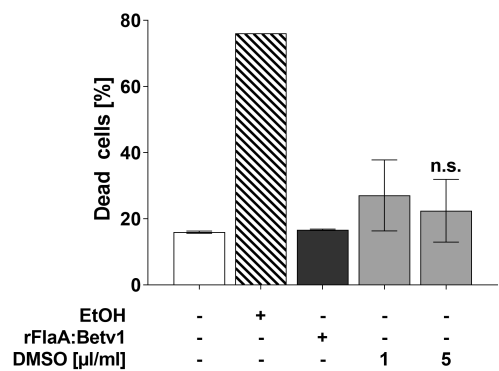
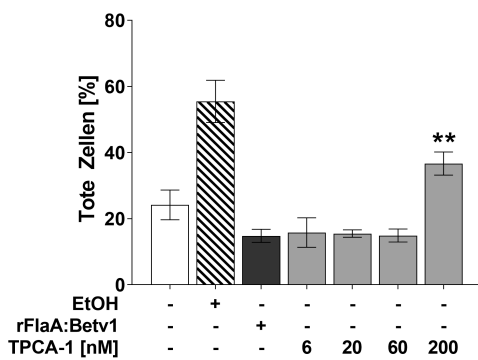
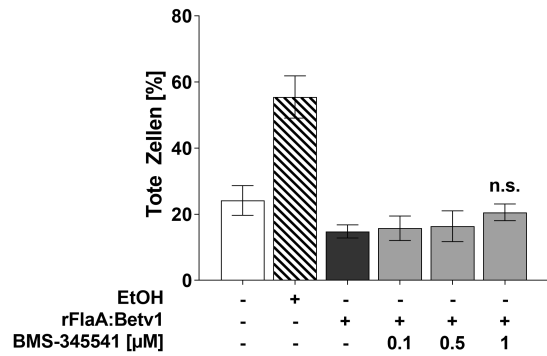
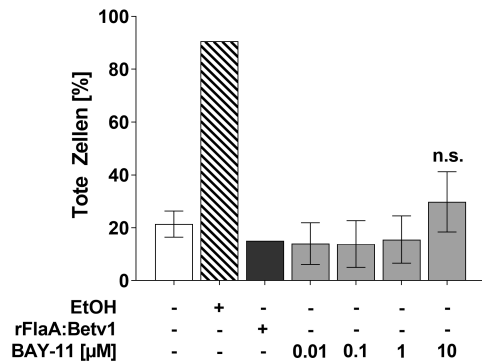
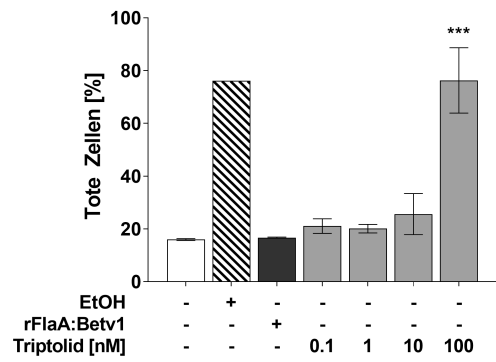
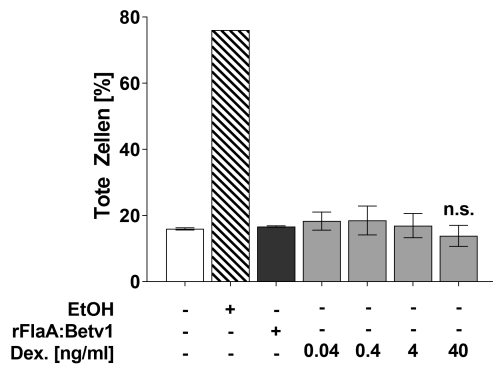
187. Mogensen TH, Berg RS, Paludan SR, Østergaard L. Mechanisms of Dexamethasone-Mediated Inhibition of Toll-Like Receptor Signaling Induced by *Neisseria meningitidis* and *Streptococcus pneumoniae*. *Infection and Immunity*. 1. Januar 2008;76(1):189–97.
188. Stanborough T, Niederhauser J, Koch B, Bergler H, Pertschy B. Ribosomal protein S3 interacts with the NF- κ B inhibitor I κ B α . *FEBS Letters*. 3. März 2014;588(5):659–64.
189. Russo A, Saide A, Cagliani R, Cantile M, Botti G, Russo G. Rpl3 promotes the apoptosis of p53 mutated lung cancer cells by down-regulating CBS and NF κ B upon 5-FU treatment. *Scientific Reports*. 7. Dezember 2016;6:38369.
190. Zaru R, Ronkina N, Gaestel M, Arthur JSC, Watts C. The MAPK-activated kinase Rsk controls an acute Toll-like receptor signaling response in dendritic cells and is activated through two distinct pathways. *Nature Immunology*. November 2007;8(11):1227–35.
191. Favata MF, Horiuchi KY, Manos EJ, Daulerio AJ, Stradley DA, Feeser WS, u. a. Identification of a Novel Inhibitor of Mitogen-activated Protein Kinase Kinase. *J Biol Chem*. 17. Juli 1998;273(29):18623–32.
192. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, u. a. Toll-like receptor–induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*. 10. Juni 2010;115(23):4742–9.
193. Jha AK, Huang SC-C, Sergushichev A, Lampropoulou V, Ivanova Y, Loginicheva E, u. a. Network Integration of Parallel Metabolic and Transcriptional Data Reveals Metabolic Modules that Regulate Macrophage Polarization. *Immunity*. 17. März 2015;42(3):419–30.
194. Galic S, Fullerton MD, Schertzer JD, Sikkema S, Marcinko K, Walkley CR, u. a. Hematopoietic AMPK β 1 reduces mouse adipose tissue macrophage inflammation and insulin resistance in obesity. *J Clin Invest*. 1. Dezember 2011;121(12):4903–15.
195. Mendoza MC, Er EE, Blenis J. The Ras-ERK and PI3K-mTOR Pathways: Cross-talk and Compensation. *Trends Biochem Sci*. Juni 2011;36(6):320–8.
196. Zoncu R, Efeyan A, Sabatini DM. mTOR: from growth signal integration to cancer, diabetes and ageing. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Januar 2011;12(1):21–35.
197. Ma L, Chen Z, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Pandolfi PP. Phosphorylation and Functional Inactivation of TSC2 by Erk: Implications for Tuberous Sclerosis and Cancer Pathogenesis. *Cell*. 22. April 2005;121(2):179–93.
198. Kodaki T, Woscholski R, Hallberg B, Rodriguez-Viciana Julian Downward P, Parker PJ. The activation of phosphatidylinositol 3-kinase by Ras. *Current Biology*. 1. September 1994;4(9):798–806.

199. Carriere A, Romeo Y, Acosta-Jaquez HA, Moreau J, Bonneil E, Thibault P, u. a. ERK1/2 Phosphorylate Raptor to Promote Ras-dependent Activation of mTOR Complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem*. 1. Juli 2011;286(1):567–77.
200. Anjum R, Blenis J. The RSK family of kinases: emerging roles in cellular signalling. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Oktober 2008;9(10):747–58.
201. Roux PP, Shahbazian D, Vu H, Holz MK, Cohen MS, Taunton J, u. a. RAS/ERK Signaling Promotes Site-specific Ribosomal Protein S6 Phosphorylation via RSK and Stimulates Cap-dependent Translation. *J Biol Chem*. 11. Mai 2007;282(19):14056–64.
202. Menon MB, Kotlyarov A, Gaestel M. SB202190-Induced Cell Type-Specific Vacuole Formation and Defective Autophagy Do Not Depend on p38 MAP Kinase Inhibition. *PLoS One* [Internet]. 10. August 2011;6(8). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3154272/>
203. Everts B, Amiel E, van der Windt GJW, Freitas TC, Chott R, Yarasheski KE, u. a. Commitment to glycolysis sustains survival of NO-producing inflammatory dendritic cells. *Blood*. 16. August 2012;120(7):1422–31.
204. Linke M, Fritsch SD, Sukhbaatar N, Hengstschläger M, Weichhart T. mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity. *FEBS Lett*. 2017;591(19):3089–103.
205. Krawczyk CM, Holowka T, Sun J, Blagih J, Amiel E, DeBerardinis RJ, u. a. Toll-like receptor-induced changes in glycolytic metabolism regulate dendritic cell activation. *Blood*. 10. Juni 2010;115(23):4742–9.
206. Düvel K, Yecies JL, Menon S, Raman P, Lipovsky AI, Souza AL, u. a. Activation of a metabolic gene regulatory network downstream of mTOR complex 1. *Mol Cell*. 30. Juli 2010;39(2):171–83.
207. Cairns RA, Harris IS, Mak TW. Regulation of cancer cell metabolism. *Nature Reviews Cancer*. Februar 2011;11(2):85–95.
208. Wang R, Dillon CP, Shi LZ, Milasta S, Carter R, Finkelstein D, u. a. The transcription factor Myc controls metabolic reprogramming upon T lymphocyte activation. *Immunity*. 23. Dezember 2011;35(6):871–82.
209. Kim JH, Yoon M-S, Chen J. Signal Transducer and Activator of Transcription 3 (STAT3) Mediates Amino Acid Inhibition of Insulin Signaling through Serine 727 Phosphorylation. *The Journal of biological chemistry*. 1. Oktober 2009;284:35425–32.
210. Staples KJ, Smallie T, Williams LM, Foey A, Burke B, Foxwell BMJ, u. a. IL-10 induces IL-10 in primary human monocyte-derived macrophages via the transcription factor Stat3. *J Immunol*. 15. April 2007;178(8):4779–85.

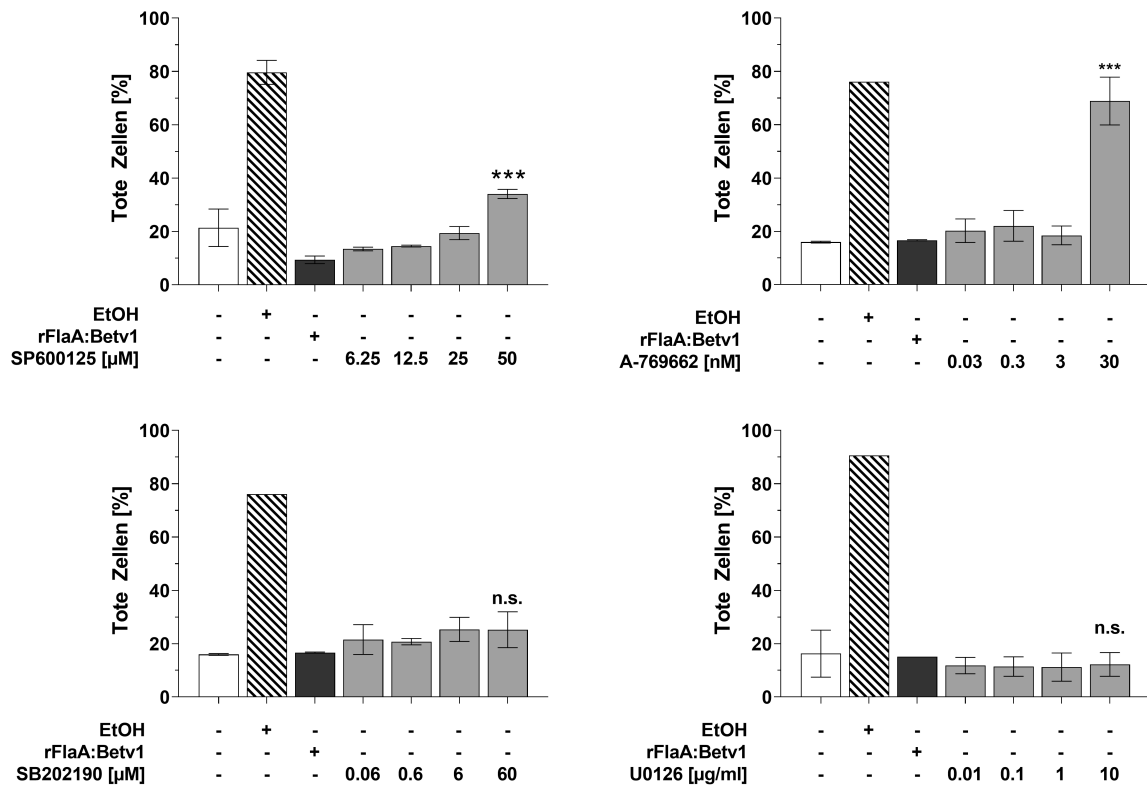
V. Anhang



Anhang Abbildung 1 – Toxizität der Inflammasom-Inhibitoren. Untersuchung der toxischen Effekte der Inhibitoren und des verwendeten Lösungsmittels (DMSO) in den angegebenen Konzentrationen auf die BALB/c mDCs. Für die Positivkontrollen wurden die Zellen mit Alkohol (EtOH, 70 Vol. %) abgetötet. Angegebene Signifikanz immer im Vergleich zur rFlaA:Betv1-stimulierten Kontrolle. Statistische Signifikanz: n.s. - nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Anhang Abbildung 2 – Toxizität der NFκB-Inhibitoren. Untersuchung der toxischen Effekte der Inhibitoren und des verwendeten Lösungsmittels (DMSO) in den angegebenen Konzentrationen auf die BALB/c mDCs. Für die Positivkontrollen wurden die Zellen mit Alkohol (EtOH, 70 Vol. %) abgetötet. Angegebene Signifikanz immer im Vergleich zur rFlaA:Betv1-stimulierten Kontrolle. Statistische Signifikanz: n.s. - nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



Anhang Abbildung 3 – Toxizität der MAPK-Inhibitoren. Untersuchung der toxischen Effekte der Inhibitoren in den angegebenen Konzentrationen auf die BALB/c mDCs. Für die Positivkontrollen wurden die Zellen mit Alkohol (EtOH, 70 Vol. %) abgetötet. Angegebene Signifikanz immer im Vergleich zur rFlaA:Betv1-stimulierten Kontrolle. Statistische Signifikanz: n.s. - nicht signifikant; * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

