

# **„Molekulare Reaktionsmuster in dendritischen Zellen nach Allergenexposition“**

-

**Anhaltspunkte für eine Polarisierung der Immunantwort  
bereits auf Ebene der antigenpräsentierenden Zellen durch  
die Einwirkung unterschiedlicher Allergentypen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades

Doktor der Naturwissenschaften

Am Fachbereich Biologie

der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Ingo Gert Böttcher

geb. am 01. Mai 1974 in Enkenbach-Alsenborn

Mainz, im September 2006

Die in der vorliegenden Arbeit dargestellten Ergebnisse wurden von Juni 2002 bis September 2006 an der Universitäts-Hautklinik der Johannes Gutenberg-Universität, Mainz erarbeitet.

Dekan: Prof. Dr. H. Paulsen

Erster Berichterstatter:

Zweiter Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung: 21. Dezember 2006

## **Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht oder sind zur Veröffentlichung vorgesehen:**

I. Böttcher, I. Bellinghausen, B. König, J. Knop and J. Saloga:

Different Regulation of T<sub>H</sub>1 and T<sub>H</sub>2 promoting cytokine signalling factors in human dendritic cells after exposure to protein allergens versus contact allergens. (Manuskript in Vorbereitung)

I. Böttcher, I. Bellinghausen, B. König, J. Knop and J. Saloga:

Microarray analysis of human dendritic cells after exposure to protein allergens versus LPS. (Manuskript in Vorbereitung)

### **Kongressbeiträge:**

I. Böttcher, I. Bellinghausen, P. Brand, B. Klostermann, J. Knop und J. Saloga:

Production of interleukin 13 by human dendritic cells after stimulation with protein-allergens is a key factor for induction of Th2 cytokines and is associated with activation of STAT6. *30. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Dermatologische Forschung, Frankfurt/Main, 27. Februar – 01. März 2003.* Poster und Abstract

I. Böttcher, I. Bellinghausen, P. Brand, B. Klostermann, J. Knop und J. Saloga:

Protein-Allergene induzieren die Produktion von Interleukin 13 in dendritischen Zellen assoziiert mit Aktivierung von STAT6 – Schlüsselfaktoren für die Induktion von Th2 Immunantworten. *15. Mainzer Allergieworkshop, Mainz, 14.-15. März 2003.* Vortrag und Abstract

I. Böttcher, I. Bellinghausen, P. Brand, B. Klostermann, J. Knop und J. Saloga:

STAT6 associated production of Interleukin 13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergen is a key factor for the induction of Th2 responses. *34. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Immunologie, Berlin, 24. – 27. September 2003.* Poster und Abstract

# Inhaltsverzeichnis

|           |   |           |
|-----------|---|-----------|
| <b>I</b>  | <b>EINLEITUNG</b> .....   | <b>1</b>  |
| <b>1</b>  | <b>AUFBAU UND FUNKTION DES IMMUNSYSTEMS</b> .....                                   | <b>1</b>  |
| <b>2</b>  | <b>CD4<sup>+</sup> T-HELFERZELLEN</b> .....   | <b>5</b>  |
| <b>3</b>  | <b>ALLERGIEN, ALLERGENE UND MÖGLICHE THERAPIEFORMEN</b> .....                       | <b>6</b>  |
| <b>4</b>  | <b>DIE ROLLE DENDRITISCHER ZELLEN BEI DER ALLERGISCHEN REAKTION</b> .....           | <b>12</b> |
| <b>5</b>  | <b>ZYTKIN-SIGNALTRANSDUKTION UND SOCS-PROTEINE</b> .....                            | <b>14</b> |
| <b>6</b>  | <b>ZIELSETZUNG DER ARBEIT</b> .....   | <b>18</b> |
| <b>II</b> | <b>MATERIAL UND METHODEN</b> .....  | <b>19</b> |
| <b>1</b>  | <b>MATERIAL</b> .....   | <b>19</b> |
| 1.1       | LABORGERÄTE .....   | 19        |
| 1.2       | SOFTWARE.....   | 20        |
| 1.3       | VERWENDETE GEBRAUCHSARTIKEL.....  | 20        |
| 1.4       | CHEMIKALIEN UND REAGENZIEN .....  | 21        |
| 1.5       | ANTIKÖRPER .....  | 24        |
| 1.6       | PRIMER.....   | 26        |
| 1.6.1     | <i>Primer für die konventionelle RT-PCR</i> .....                                   | 26        |
| 1.6.2     | <i>Primer für die Real-Time-PCR</i> .....   | 27        |
| 1.7       | PUFFER UND MEDIEN.....  | 28        |
| 1.7.1     | <i>Medien für die Zellkultur</i> .....  | 28        |
| 1.7.2     | <i>Puffer</i> .....   | 28        |
| 1.7.3     | <i>Allergene</i> .....  | 30        |
| 1.7.4     | <i>Zytokine</i> .....   | 31        |
| 1.7.5     | <i>Allergiker</i> .....   | 31        |
| <b>2</b>  | <b>METHODEN</b> .....   | <b>32</b> |
| 2.1       | ZELLBIOLOGISCHE METHODEN .....  | 32        |
| 2.1.1     | <i>Allgemein</i> .....  | 32        |
| 2.1.2     | <i>Bestimmung der Lebendzellzahl durch Trypanblaufärbung</i> .....                  | 32        |
| 2.1.3     | <i>Kryokonservierung</i> .....  | 32        |
| 2.1.4     | <i>Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)</i> .....        | 33        |
| 2.1.5     | <i>Zellseparation und Kultivierung allergengepulster dendritischer Zellen</i> ..... | 34        |
| 2.1.5.1   | <i>Isolation von Monozyten</i> .....  | 34        |
| 2.1.5.2   | <i>Kultivierung allergengepulster dendritischer Zellen</i> .....                    | 34        |
| 2.2       | IMMUNOLOGISCHE METHODEN .....   | 35        |
| 2.2.1     | <i>Durchflußzytometrie</i> .....  | 35        |
| 2.2.2     | <i>Bestimmung der Zytokinproduktion mittels ELISA</i> .....                         | 35        |
| 2.3       | MOLEKULARBIOLOGISCHE UND PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN .....                         | 37        |

|            |  |           |
|------------|--|-----------|
| 2.3.1      | SDS-PAGE .....   | 37        |
| 2.3.2      | Western-Blot (Semi-Dry).....   | 37        |
| 2.3.3      | Limulus-Amöbocytenlysate-Test.....   | 39        |
| 2.3.4      | Isolierung der Gesamt-RNA aus dendritischen Zellen .....   | 39        |
| 2.3.5      | Bestimmung der Reinheit und Konzentration der RNA .....  | 39        |
| 2.3.6      | RT-PCR .....   | 40        |
| 2.3.6.1    | Reverse Transkription .....  | 40        |
| 2.3.6.2    | PCR.....   | 40        |
| 2.3.6.3    | Agarose-Gelelektrophorese .....  | 41        |
| 2.3.6.4    | Färbung und Auswertung der Gele .....  | 42        |
| 2.3.7      | Quantitative Real-Time-PCR .....   | 42        |
| 2.3.7.1    | Aufbau und Funktionsweise des LightCycler Instruments .....  | 43        |
| 2.3.7.2    | Detektion der PCR-Produkte .....   | 43        |
| 2.3.7.3    | PCR-Ansatz und Zyklusbedingungen .....   | 44        |
| 2.3.7.4    | Relative Quantifizierung ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode).....   | 45        |
| 2.3.8      | Microarray Analysen .....  | 46        |
| <b>III</b> | <b>ERGEBNISSE .....</b>  | <b>47</b> |
| <b>1</b>   | <b>PHÄNOTYPISCHE CHARAKTERISIERUNG DENDRITISCHER ZELLEN NACH KONTAKT MIT PROTEINALLERGENEN.....</b>  | <b>47</b> |
| 1.1        | MORPHOLOGISCHE VERÄNDERUNGEN DER DENDRITISCHEN ZELLEN IM LAUFE DER KULTUR .....  | 47        |
| 1.2        | EINFLUSS VON PROTEINALLERGENEXTRAKTEN AUF DIE OBERFLÄCHENMARKEREXPRESSION VON DENDRITISCHEN ZELLEN .....   | 47        |
| 1.3        | DER EINFLUSS VON BAKTERIELLEM LIPOPOLYSACCHARID (LPS) AUF DIE AUSREIFUNG DER DENDRITISCHEN ZELLEN .....  | 49        |
| <b>2</b>   | <b>PROTEINEXPRESSION DER DENDRITISCHEN ZELLEN NACH KONTAKT MIT PROTEINALLERGENEN.....</b>  | <b>51</b> |
| <b>3</b>   | <b>GENEXPRESSION DENDRITISCHER ZELLEN MIT HILFE DER RT-PCR.....</b>  | <b>52</b> |
| 3.1        | GENEXPRESSION DER MOLEKÜLE SOCS1, SOCS3, GATA3 UND T-BET .....   | 52        |
| 3.2        | GENOTYPISCHE KONTROLLE DER DENDRITISCHEN ZELLEN .....  | 54        |
| <b>4</b>   | <b>QUANTITATIVE REAL-TIME-PCR DENDRITISCHER ZELLEN.....</b>  | <b>55</b> |
| 4.1        | BESTIMMUNG DER PCR-EFFIZIENZ.....  | 55        |
| 4.2        | DENDRITISCHE ZELLEN ZEIGEN NACH KONTAKT MIT PROTEINALLERGENEN EIN $T_H2$ -ASSOZIIERTES GENEXPRESSIONSPROFIL .....  | 57        |
| 4.3        | GENEXPRESSION DENDRITISCHER ZELLEN NACH EXPOSITION MIT DEM KONTAKTALLERGEN 5-CHLOR-2-METHYL-2,3-DIHYDROISOTHIAZOL-3-ON/2-METHYL-2,3-DIHYDROISOTHIAZOL-3-ON (MCI/MI) .. | 59        |
| 4.4        | TETANUSTOXOID BEWIRKT EINE $T_H1$ - UND EINE $T_H2$ -ASSOZIIERTE GENEXPRESSION IN DENDRITISCHEN ZELLEN .....   | 60        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| <b>5</b>  | <b>GENEXPRESSION DENDRITISCHER ZELLEN MIT HILFE VON HIGH DENSITY MICRO ARRAYS.....</b> | <b>61</b> |
| 5.1       | VERIFIZIERUNG DER MICRO ARRAY DATEN AM BEISPIEL DES CHEMOKINS CXCL2 (GRO-BETA)..       | 67        |
| <b>IV</b> | <b>DISKUSSION.....</b>   | <b>69</b> |
| <b>V</b>  | <b>LITERATURVERZEICHNIS .....</b>  | <b>76</b> |
| <b>VI</b> | <b>ZUSAMMENFASSUNG .....</b>   | <b>86</b> |

## Abkürzungen:

|                |   |
|----------------|---|
| °C             | Grad Celsius  |
| % (v/v)        | Volumenprozent                                      |
| % (w/v)        | Gewichtsprozent                                     |
| Abb            | Abbildung   |
| ABTS           | 2,2-Azino-bis(3-ethyl-benz-thiazolin-6-sulfonsäure) |
| APC            | antigenpräsentierende Zelle                         |
| BSA            | bovines Serumalbumin                                |
| bp             | Basenpaare  |
| bzw            | beziehungsweise                                     |
| CD             | „cluster of differentiation“                        |
| cDNA           | „complementary“ DNA                                 |
| C <sub>T</sub> | „cycle threshold value“                             |
| CTL            | zytotoxische T-Zelle                                |
| CTLA-4         | „cutaneous lymphocyte-associated antigen“           |
| DC             | dendritische Zelle                                  |
| DE             | differentielle Expression                           |
| DMSO           | Dimethylsulfoxid                                    |
| DNA            | Desoxyribonukleinsäure                              |
| dNTP           | Desoxyribonukleotidtriphosphat                      |
| DTAF           | Dichlortriazinyl-Amino-Fluorescein                  |
| EDTA           | Ethylendiamintetraessigsäure                        |
| ELISA          | „enzyme linked immunosorbent protein assay“         |
| EtBr           | Ethidiumbromid                                      |
| FACS           | „fluorescence activated cell sorter“                |
| FCS            | fötales Kälberserum                                 |
| FITC           | Fluoreszenzisothiocyanat                            |
| FSC            | „forward scatter“, Vorwärtsstreulicht               |
| g              | Erdbeschleunigung                                   |
| GATA3          | „GATA binding protein 3“                            |
| GM-CSF         | „granulocyte-makrophage colony stimulating factor“  |
| h              | Stunde(n)   |
| HLA-DR         | humanes Leukozyten Antigen, MHC-Klasse II-Molekül   |

|           |   |
|-----------|---|
| IFN       | Interferon  |
| Ig        | Immunglobulin   |
| IL        | Interleukin   |
| IMDM      | „Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium“   |
| kb        | Kilobasenpaare  |
| LPS       | Lipopolysaccharid   |
| m         | Milli (-gramm, -liter, -meter)  |
| μ         | Mikro (-gramm, -liter)  |
| MCI/MI    | 5-Chlor-2-methyl-2,3-dihydroisothiazol-3-on/2-Methyl-2,3-dihydroisothiazol-3-on |
| MHC       | „major histocompatibility complex“  |
| min       | Minuten   |
| mRNA      | „messenger“ RNA   |
| n         | Nano (-gramm)   |
| NK-Zellen | natürliche Killerzellen   |
| OD        | optische Dichte   |
| PBMC      | mononukleäre Zellen aus dem peripheren Blut                                     |
| PBS       | „phosphate buffered saline“   |
| PCR       | Polymerasekettenreaktion  |
| PE        | Phycoerythrin   |
| PGE       | Prostaglandin   |
| pmol      | Pikomol   |
| upm       | Umdrehungen pro Minute  |
| RNA       | Ribonukleinsäure  |
| RT        | Raumtemperatur oder<br>Reverse Transkription                                    |
| SDS       | Natriumdodecylsulfat  |
| sec       | Sekunden  |
| SIT       | spezifische Immuntherapie   |
| SLIT      | sublinguale Immuntherapie   |
| SOCS      | „supressors of cytokine signalling“   |
| SSC       | „side scatter“, Seitwärtsstreulicht   |
| STAT      | „signal transducer and activator of transcription“                              |

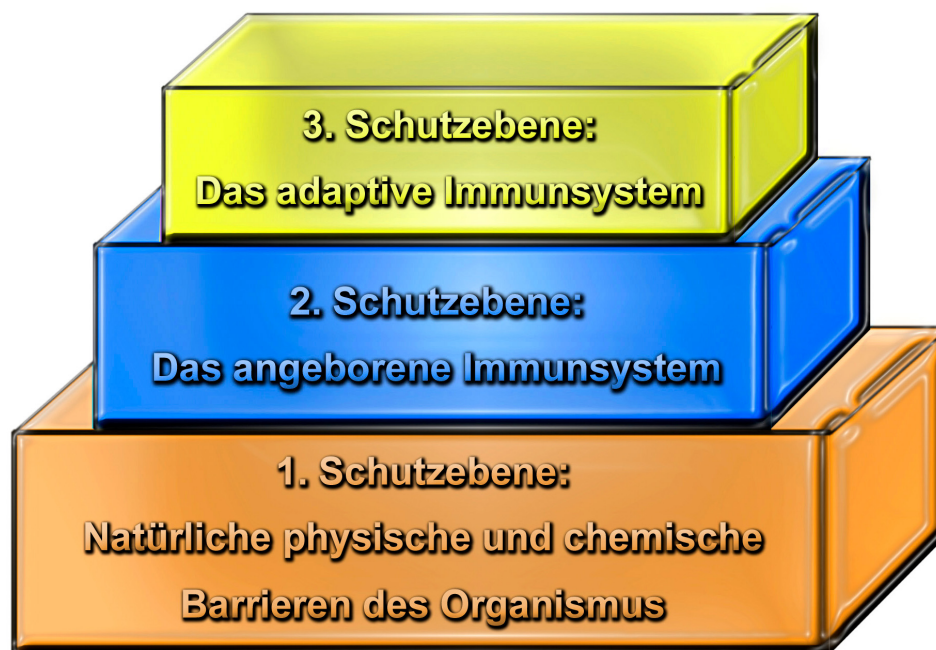


|                                   |  |
|-----------------------------------|--|
| SYBR                              | 2-{2-[(3-Dimethylamino-propyl)-propylamino]-1-phenyl-1 <i>H</i> -chinolin-4-ylidenmethyl}-3-methyl-benzothiazol-3-ium-Kation |
| T-bet                             | „T-box expressed in T-cells“   |
| TLR                               | „toll-like receptor“   |
| T <sub>H</sub> 1/T <sub>H</sub> 2 | T-Helferzelle (Typ I oder Typ II)  |
| TNF                               | Tumornekrosefaktor   |
| U                                 | „units“  |
| UV                                | Ultraviolett   |

# I Einleitung

## 1 Aufbau und Funktion des Immunsystems

Das Immunsystem (lat. *immunis* = frei, verschont, unberührt) ist ein kompliziertes Netzwerk aus spezifischen und nicht-spezifischen Abwehrmechanismen, die in ständiger Interaktion untereinander stehen. Die Hauptfunktion des Immunsystems besteht darin, „Fremd“ von „Selbst“ zu unterscheiden und somit den Körper gegen fremde Substanzen und Krankheitserreger zu verteidigen. Diese Abwehrmechanismen gliedern sich in drei Stufen: die natürlichen Barrieren des Organismus, das angeborene und das adaptive Immunsystem.

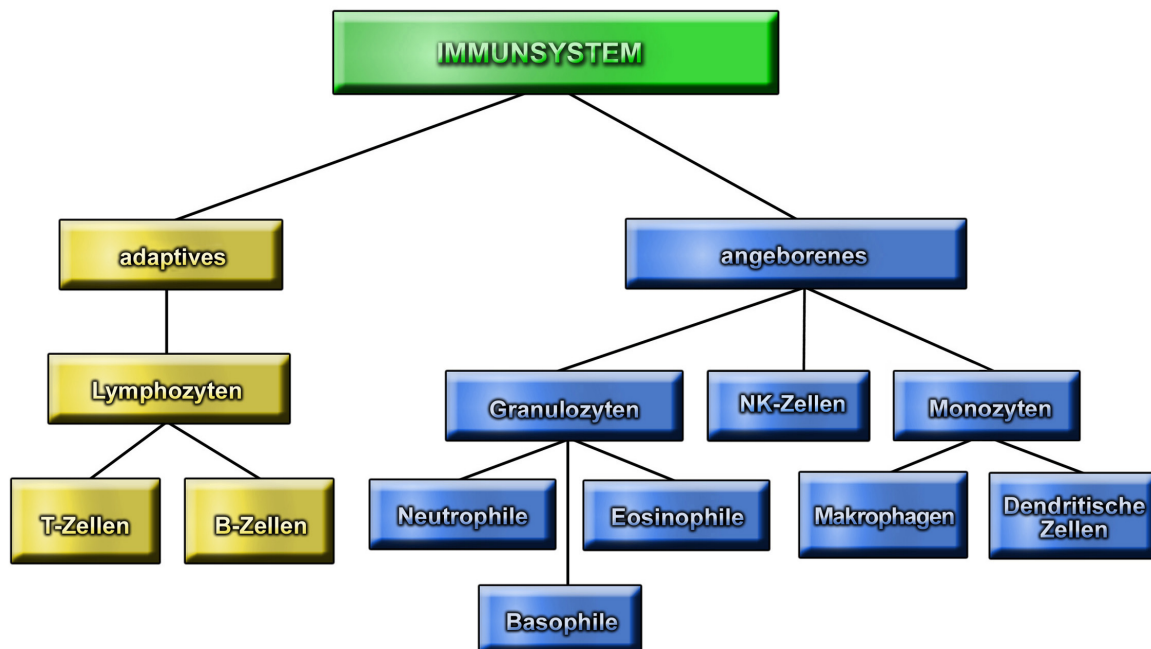


**Abbildung 1: Die Abwehrmechanismen des Immunsystems**

Die erste Schutzebene sind die natürlichen Barrieren des Körpers, wie zum Beispiel die Haut und die Schleimhäute, die den Organismus vor dem Eindringen von Pathogenen schützen. Körperflüssigkeiten wie Speichel, Tränen, Schweiß und

Magensäure besitzen aufgrund ihrer chemischen und enzymatischen Zusammensetzung ebenfalls ein antibakterielles Potential.

Alle Zellen des Immunsystems finden ihren Ursprung in hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks. Es existieren zwei Entwicklungslinien, die lymphoide und die myeloide Reihe. Aus der lymphoiden Progenitorzelle entwickeln sich die Zellen des adaptiven oder erworbenen Immunsystems, nämlich die T- und B-Lymphozyten, sowie die NK-Zellen. Aus der myeloiden Vorläuferzelle differenzieren die Eosinophilen, Neutrophilen und Basophilen Granulozyten, sowie die Monozyten und dendritischen Zellen des angeborenen Immunsystems.<sup>1</sup>



**Abbildung 2: Die Zellen des adaptiven und angeborenen Immunsystems**

Hat ein Pathogen die erste Barriere der Immunabwehr überwunden und ist in den Organismus eingedrungen, so tritt unmittelbar danach das angeborene Immunsystem in Kraft. Dieses phylogenetisch ältere System ist unspezifisch und nicht in der Lage Schutz vor weiteren Infektionen zu bieten und wirkt dem Wachstum und der Ausbreitung von Krankheitserregern im Anfangsstadium einer Infektion direkt entgegen. Komponenten des angeborenen Immunsystems sind unter anderem das Komplementsystem, das für die Lyse von Mikroorganismen zuständig ist, und ein

System zur Phagozytose von Pathogenen. Hieran sind insbesondere Makrophagen, Granulozyten und dendritische Zellen beteiligt.<sup>2</sup>

Die Erkennung von Pathogenen erfolgt durch Rezeptoren, die als „pathogen recognition receptors“ (PRR) bezeichnet werden. Zu den PRRs gehören CD14, der Macrophage Scavenger Receptor (MSR), Toll-like-Rezeptoren (TLR) und Komplement-Rezeptoren.<sup>3</sup> Sie erkennen Moleküle von Mikroorganismen („pathogen associated molecular patterns“, PAMP). PAMP sind Bakterien gemeinsame Strukturen wie Lipopolysaccharide, Lipoteichonsäure, Peptidoglykane sowie bakterielle DNA. Nach Bindung von PAMP an PRR kommt es zu einer verstärkten Expression kostimulatorischer Oberflächenmoleküle und Ausschüttung von Mediatoren wie zum Beispiel proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen. Hierdurch kommt es zu einer Entzündungsreaktion, durch die sich diese so genannte erste Abwehr auszeichnet.

Das phylogenetisch jüngere System, das erworbene oder adaptive Immunsystem, hingegen ist durch Lymphozyten vermittelt, die zum einen die Immunantwort verstärken; zum anderen sorgen sie dafür, dass eine wiederholte Infektion eine verstärkte Immunantwort auslöst. Dieses Phänomen wird als immunologisches Gedächtnis bezeichnet. Die adaptive Immunität lässt sich weiterhin in eine humorale und eine zelluläre Komponente unterteilen: Das humorale Immunsystem ist gegen extrazelluläre Antigene gerichtet und wird durch lösliche Antikörpermoleküle vermittelt, die von Plasmazellen produziert werden. Effektorzellen des zellulären Immunsystems sind zum Beispiel zytotoxische T-Lymphozyten, die in der Lage sind, virusinfizierte Zellen sowie Tumorzellen zu erkennen und zu bekämpfen. Eine veränderte Proteinausstattung dieser Zellen bildet die Grundlage der adaptiven Erkennung im Vergleich zu normalen Zellen desselben Gewebes.

Die humorale und auch die zelluläre Immunantwort sind in ihrer Funktion von membranständigen Glykoproteinen abhängig. Sie binden Peptide aus extrazellulären beziehungsweise zytosolischen Proteinen und präsentieren diese für die Erkennung durch T-Zellen. Diese Proteine werden beim Menschen als „Human Leucocyte Antigen“ (HLA) bezeichnet und von den Genen des „Major Histocompatibility Complex“ (MHC) kodiert, der auf dem kurzen Arm des Chromosoms 6 lokalisiert ist. MHC-Moleküle lassen sich nach Struktur und Funktion in zwei Klassen einteilen: Während MHC-Klasse I Moleküle auf nahezu allen zellkernhaltigen Zellen zu finden

sind, werden MHC-Klasse II Moleküle in der Regel nur von spezialisierten, antigenpräsentierenden Zellen (APC), wie zum Beispiel von B-Zellen, Makrophagen und dendritischen Zellen, exprimiert.<sup>1</sup>

Die beiden Klassen der MHC-Moleküle präsentieren die Peptide der Antigene zwei verschiedenen Typen von T-Zellen. Die T-Zellen unterscheiden sich nur anhand der unterschiedlichen Expression eines Oberflächenmarkers und durch die Klasse von MHC-Molekülen, welche sie erkennen. Ein Typ von T-Zellen exprimiert den Marker CD8; diese werden deshalb CD8<sup>+</sup>- oder auch zytotoxische T-Zellen genannt. Ihre Aufgabe ist die Abwehr von endogenen Antigenen oder Viren. Virusinfizierte Zellen synthetisieren virale Proteine im Zytosol, welche in das Endoplasmatische Reticulum transportiert werden. Dort binden sie an MHC-Klasse I Moleküle, welche die Peptide dann an der Zelloberfläche präsentieren.<sup>4</sup> CD8<sup>+</sup> zytotoxische T-Zellen erkennen diesen MHC-Antigen-Komplex und töten die infizierte Zelle ab.

Der andere Typ T-Zellen trägt den Oberflächenmarker CD4 und wird dementsprechend CD4<sup>+</sup> oder T-Helferzelle genannt. Ihre Aufgabe wiederum ist die Abwehr von exogenen Erregern wie zum Beispiel Bakterien. Kommt es zu einer Infektion einer Zelle mit Bakterien, so präsentieren diese die Peptide über den MHC-Klasse II Komplex. Diese Moleküle sind ebenfalls in der Lage Peptide, die von einem Antigen stammen, welches von einem B-Zell-Antigenrezeptor gebunden und in intrazelluläre Vesikel aufgenommen wurde, zu binden und an die Zelloberfläche zu transportieren.

T-Zellen interagieren über MHC-Peptid-spezifische Rezeptoren mit den antigenpräsentierenden Zellen und werden aktiviert. Es kommt damit zu einer Proliferation und der Sezernierung von Lymphokinen. Diese dienen als Botenstoffe für B-Zellen, welche dadurch aktiviert werden und in Antikörper-produzierende Plasmazellen differenzieren. Antikörper sind die frei lösliche Form der B-Zell-Rezeptoren, welche beim Kontakt mit einem Antigen dieses binden und neutralisieren. Der Abbau erfolgt entweder durch das Komplementsystem oder aber durch Makrophagen.<sup>1</sup>

## 2 CD4<sup>+</sup> T-Helferzellen

CD4<sup>+</sup> T-Zellen lassen sich in zwei unterschiedliche Gruppen unterteilen: die T<sub>H</sub>1- und die T<sub>H</sub>2-Zellen. Die Differenzierung in diese unterschiedlichen Subtypen entscheidet sich nach dem Kontakt mit dem Antigen. T<sub>H</sub>1-Zellen bedingen eine zellvermittelte Immunantwort, wohingegen T<sub>H</sub>2-Zellen eine humorale Immunantwort induzieren.<sup>5</sup>

Die Differenzierung zu T<sub>H</sub>1-Zellen ist bedingt durch den Kontakt der T-Zellen mit aktivierten antigenpräsentierenden Zellen. Hierfür ist zudem das Zytokin IL-12 nötig, welches in seiner aktiven Form IL-12 p70 von Makrophagen und dendritischen Zellen gebildet wird.<sup>6-8</sup> IL-12 wird induziert durch Lipopolysaccharide (LPS) der äußeren Membran Gram-negativer Bakterien.<sup>9</sup> Rezeptoren für LPS sind CD14 sowie der Toll-like-Rezeptor 4 (TLR4).<sup>10</sup> Ein weiteres wichtiges Zytokin für die Entwicklung einer T<sub>H</sub>1-Immunantwort ist das von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) produzierte Interferon-gamma (IFN-γ). Zum einen unterdrückt IFN-γ die Produktion von T<sub>H</sub>2-Zellen, zum anderen aktiviert es Makrophagen, die daraufhin IL-12 produzieren. Es kommt so zu einer Verstärkung der Abwehrreaktion des Organismus gegen das Antigen. Das Zytokin IL-18 hat ebenfalls eine verstärkende Wirkung auf den IL-12 Signalweg und ist in der Lage, IFN-γ in T-Zellen, Makrophagen und NK-Zellen zu induzieren. Darüber hinaus sorgen die gebildeten T<sub>H</sub>1-Zytokine für die Produktion der Antikörperisotypen IgG2a in B-Zellen. Diese IgG-Moleküle sind in der Lage, Pathogene zu opsonisieren und sie so für die Phagozytose durch Makrophagen vorzubereiten.

Zur Ausbildung von T<sub>H</sub>2-Zellen kommt es durch die Gegenwart von extrazellulären Antigenen und den Zytokinen IL-4 und IL-6. IL-4 wird von einer speziellen Subpopulation der CD4<sup>+</sup> T-Zellen gebildet, welche auf ihrer Oberfläche das Molekül NK1.1 tragen. Eine Aktivierung dieser Zellen führt zu einer erhöhten Produktion an IL-4. Es kommt so zu einer verstärkten Entwicklung von T<sub>H</sub>2-Zellen und damit einhergehend zu einer begünstigten Bildung von IgE-Molekülen der darauf folgenden humoralen Immunantwort. Das Zytokin IL-13, welches von dendritischen Zellen nach Kontakt mit Proteinallergenen sezerniert wird, scheint ebenfalls ein Schlüsselfaktor für die Ausbildung von T<sub>H</sub>2-Zellen zu sein.<sup>11</sup> T<sub>H</sub>2-Zellen aktivieren ihrerseits spezifisch die antikörperbildenden B-Zellen und produzieren die B-Zell-Wachstumsfaktoren IL-4, IL-5 und IL-13. Es kommt in den B-Zellen zu einer

Sekretion von IgM-Antikörpern. Eine weitere Aktivierung der B-Zellen erfolgt über das Oberflächenmolekül CD40L, welches von aktivierten T-Zellen exprimiert wird. B-Zellen produzieren nun IgA- und IgE-Moleküle.<sup>12,13</sup> Die Bildung von IgE-Antikörpern benötigt IL-4 und IL-13 produzierende T<sub>H</sub>2-Zellen. Das Zytokin IL-10 wird ebenfalls von T<sub>H</sub>2-Zellen sezerniert, aber auch von T<sub>H</sub>1-Zellen. Es dient der Regulation der Immunantwort und verhindert eine Makrophagenaktivierung.<sup>14</sup>

T<sub>H</sub>1-Zytokine sind in der Lage T<sub>H</sub>2-Zellen zu hemmen, genauso wie T<sub>H</sub>2-Zytokine in der Lage sind T<sub>H</sub>1-Zellen zu hemmen. Bedingt durch die Hemmung kommt es zur Ausbildung entweder der einen oder der anderen Immunantwort.<sup>15,16</sup> Das T<sub>H</sub>1-T<sub>H</sub>2-Gleichgewicht ist bei Atopikern in Richtung einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort verschoben.

### **3 Allergien, Allergene und mögliche Therapieformen**

Vor genau einhundert Jahren definierte Clemens von Pirquet die Allergie als „eine veränderte Fähigkeit des Körpers, auf eine Fremdsubstanz zu reagieren“.<sup>17</sup> Den Namen leitete er von dem griechischen Wort *allos* ab, welches die „Abweichung von dem Normalfall“ bezeichnete. Diese Definition ist allerdings aus heutiger Sichtweise zu allgemein, da sie sämtliche Reaktionen des Immunsystems einschließt. Heutzutage gilt für die Allergie folgende Definition: „eine Krankheit, die durch eine Immunreaktion gegenüber einem sonst harmlosen Antigen ausgelöst wird“.<sup>1</sup> Die Symptomatik der Allergie hängt vom Allergen selbst und dem Ort ab, an dem es mit dem Körper interagiert. So führt der Kontakt des Allergens in den oberen Atemwegen zu allergischer Rhinitis oder Konjunktivitis. Asthmatische Symptome mit Verengung der Bronchien sind zu beobachten, wenn die unteren Atemwege betroffen sind. Im Magen-Darm-Trakt führen allergische Reaktionen zu Übelkeit, Durchfall und Erbrechen. Die stärkste Form der allergischen Erkrankung ist der anaphylaktische Schock, eine lebensbedrohliche Reaktion, die zum Versagen des Herz-Kreislauf-Systems führen und tödlich enden kann.

Die Allergie gehört zu einer Klasse der Immunreaktionen, die man als Hypersensibilität oder Überempfindlichkeit bezeichnet. Diese Überempfindlichkeitsreaktionen werden in vier Gruppen eingeteilt<sup>18</sup> und sind in Tabelle 1 dargestellt. Die Typ1-Reaktion ist eine IgE-vermittelte Reaktion, die auf der Aktivierung von Mastzellen beruht. Die Aktivierung erfolgt durch die Interaktion eines

Antigens mit dem an eine Mastzelle oder Basophilen gebundenen IgE-Molekül. Die daraufhin degranulierende Zelle setzt Botenstoffe frei, die innerhalb von wenigen Sekunden zu einem Auftreten von Symptomen führt. Bedingt durch das sofortige Auftreten von Beschwerden heißt die Typ I Hypersensibilitätsreaktion auch Allergie vom Soforttyp.

**Tabelle 1: Hypersensibilitätsreaktionen nach Coombs und Gell**

|         | <i>Immunkomponente</i>                                | <i>Antigen</i>                        | <i>Effektormechanismus</i>   | <i>Beispiele</i>                          |
|---------|---|---------------------------------------|------------------------------|---|
| Typ I   | IgE- vermittelte Reaktion                             | lösliches Antigen                     | Mastzell-aktivierung         | Allergische Rhinitis, Allergisches Asthma |
| Typ II  | Zytotoxische Reaktion, IgG- vermittelt                | zell- oder matrix-assoziertes Antigen | Phagozyten, NK-Zellen        | Zytopenie, einige Medikamenten-allergien  |
| Typ III | Immunkomplexreaktion, IgG- vermittelt                 | lösliches Antigen                     | Phagozyten, Komplementsystem | Serumkrankheit, Arthus-Reaktion           |
| Typ IV  | Zelluläre Immunreaktion, T <sub>H</sub> 1- vermittelt | lösliches Antigen                     | Makrophagen-aktivierung      | Kontaktdermatitis, Tuberkulinreaktion     |
|         | Zelluläre Immunreaktion, CTL- vermittelt              | zellassoziertes Antigen               | Cytotoxizität                | Kontaktdermatitis                         |

Bei der Typ II-Reaktion ist das Antigen zellmembrangebunden. Zirkulierende IgG-Moleküle binden an das Antigen und es kommt zu einer Schädigung der Zellmembran und zu einem zytotoxischen Effekt. Beispiele für die Typ II-Reaktion



sind die Zytopenie, die krankhafte Verminderung der Zellzahl im peripheren Blut, sowie die Allergie gegen bestimmte Medikamente.

Die Hypersensibilität, die auch IgG-vermittelt ist, sich aber auf lösliche Antigene konzentriert, ist die Typ III-Reaktion. Als Beispiel hierfür gilt die Arthus-Reaktion. Dieses Krankheitsbild begründet sich in der Ablagerung von Immunkomplexen im Gewebe. Sie interagieren mit den Fc-Rezeptoren der Mastzellen und Leukozyten und lösen so eine lokale Entzündungsreaktion aus. Es kommt zum Eindringen von Flüssigkeit und Zellen in das Gewebe.

Hypersensibilitätsreaktionen vom verzögerten Typ (Typ IV-Reaktionen) sind die einzigen Zell-vermittelten Reaktionen. Ihnen liegt die Aktivierung antigenspezifischer T-Zellen zugrunde. Als Beispiele hierfür gelten die Tuberkulinreaktion und die Kontaktdermatitis, die sich durch Gewebeschädigungen auszeichnen. Diese sind zum einen durch eine von Makrophagen vermittelte lokale Entzündungsreaktion der T<sub>H</sub>1-Zellen bedingt. Zum anderen werden chemische Moleküle nach dem Durchdringen der Zellmembran im Endoplasmatischen Reticulum in Peptide zerlegt und über MHC-Klasse I Moleküle CD8<sup>+</sup>-T-Zellen präsentiert. Der Name der Typ IV-Reaktion begründet sich durch das verzögerte Auftreten von Symptomen nach erst 24 bis 48 Stunden.

Im Verlauf der letzten vier Jahrzehnte nahmen Allergien in den westlichen Industrieländern extrem stark zu.<sup>19</sup> So zeigt eine 2004 durchgeführte Studie der World Allergy Organization die Prävalenz der Allergie weltweit auf. In dreiunddreißig befragten Ländern, die eine Gesamtpopulation von 1,39 Milliarden Menschen repräsentieren, leiden 22% der Menschen an einer allergischen Erkrankung.<sup>20</sup> Die Frage, die sich angesichts dieser Zahlen sofort stellt, ist die nach dem Warum: Warum treten Allergien in einer solchen Häufigkeit auf, angesichts der Tatsache, dass die Immunreaktion sich teilweise sehr stark gegen eigentlich ungefährliche Antigene richtet? Beobachtungen von *Godfrey et al.* zeigten einen Zusammenhang zwischen dem Befall mit Parasiten und einem verminderten Auftreten von Allergien in Entwicklungsländern.<sup>21</sup> Der Befall mit Parasiten führt zu einer IgE-vermittelten Immunantwort, die der Allergie ähnlich ist. Diese Hypothese ist ein Ansatzpunkt, der das vermehrte Vorkommen von allergischen Erkrankungen erklären könnte, da in westlichen Industriestaaten der Befall mit Parasiten heute sehr gering ausfällt. Eine weitere Erklärungsmöglichkeit ist die so genannte Hygiene-Hypothese, die besagt,

dass Infektionen im Kindesalter die Tendenz, eine allergische Erkrankung zu entwickeln, hemmen können.<sup>22</sup> Zudem gibt es Hinweise auf eine genetische Prädisposition, da die Wahrscheinlichkeit eine Allergie im Leben zu entwickeln, vererbbar ist. Auf den Chromosomen 2q, 5q, 6p, 11q, 12q, 16q and 17q konnten Genloci identifiziert werden, die verantwortlich für die Veranlagung der Atopie zu sein scheinen.<sup>23</sup> Zusätzlich existieren die Annahmen, dass Umweltfaktoren, wie zum Beispiel Luftverschmutzungen, Relevanz in der Ausbildung von allergischen Erkrankungen haben. Als Beispiel hierfür gilt eine Studie, welche die Luftverschmutzung in der ehemaligen DDR und Westdeutschland mit der Häufigkeit von Allergien korreliert. Es wurde festgestellt, dass im stärker luftverschmutzten Osten weniger Allergien auftraten als im Westen, wo ein umgekehrtes Verhältnis zu beobachten war. Allerdings unterscheiden sich die Luftverschmutzungen voneinander: im Westen ist die Belastung durch große Mengen an Stickoxiden geprägt, wohingegen im ehemaligen Osten Schwefeldioxide dominant waren.<sup>24</sup> Neben all diesen Faktoren scheint auch psychologischer Stress ein Faktor. Es gibt eine Vielzahl von Untersuchungen, die Neuroimmunoregulation mit dem Auftreten von allergischen Erkrankungen in Verbindung bringen, allerdings scheint dies kein direkter Auslöser der Allergie zu sein, sondern diese indirekt zu begünstigen.<sup>25</sup> Als Allergene werden Substanzen bezeichnet, die eine allergische Reaktion verursachen. Es handelt sich hierbei meist um wasserlösliche Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 bis 50 Kilodalton die auf kleinen Partikeln vorkommen und über diese in den Organismus gelangen.

Was ein Protein zu einem Allergen macht, ist auch heute noch nicht genau bekannt. Neben enzymatischen Aktivitäten, die für eine Überwindung der Epithelbarrieren verantwortlich sein könnten<sup>26</sup>, scheinen auch bestimmte Epitope wie B-Zell-Epitope, an denen IgE binden kann und T-Zell-Epitope, die eine T<sub>H</sub>2-Immunantwort auslösen können, erforderlich zu sein.<sup>27</sup> Die Fragestellung, welche Oberflächeneigenschaften Allergene gemein haben, ist Bestandteil von aktuellen Studien aus dem Feld der Bioinformatik.<sup>28</sup> Das allergene Potential eines Proteins vorherzusagen ist eine der Hauptproblematiken im Umgang mit rekombinanten Proteinen in der Pharma- und Lebensmittelindustrie.<sup>29,30</sup>

Unabhängig von der symptomatischen Auswirkung der unterschiedlichen Allergien, sind die im Körper ablaufenden Prozesse ähnlich. Der Beginn ist die

Sensibilisierungsphase. Dendritische Zellen phagozytieren, prozessieren und präsentieren T-Zellen das Allergen, woraufhin diese IL-4 sezernieren. IL-4 differenziert B-Zellen zu Plasmazellen aus, welche dann IgE produzieren.<sup>31,32</sup> IgE bindet nun an den Rezeptoren der Mastzellen des Gewebes und den Basophilen des Bluts. Findet wiederum Kontakt mit dem Allergen statt, so kommt es zur Auslösephase der Allergie durch die Aktivierung der Mastzellen.<sup>33-35</sup>

Mastzellen befinden sich hauptsächlich in den Schleimhäuten und Epithelgeweben des Organismus. Über den Fc $\epsilon$ RI-Rezeptor bindet IgE, welches selbst an das Antigen bindet.<sup>36</sup> Es erfolgt eine Kreuzvernetzung der Rezeptoren und somit eine Aktivierung der Mastzellen, die dadurch innerhalb kürzester Zeit Mediatoren aus ihren Granula freisetzen. Dadurch werden Basophile und Eosinophile angelockt, was zu einer Verstärkung der allergischen Reaktion führt.<sup>37</sup> Eosinophile setzen nach Aktivierung ihre Granula und damit toxische Proteine wie auch Radikale frei. Diese dienen eigentlich zur Abwehr von Parasiten und richten im Gewebe großen Schaden an. Durch die Sezernierung von Prostaglandinen, Leukotrienen und Zytokinen werden weitere Eosinophile und Basophile angelockt. Die Entzündungsreaktion verstärkt sich. Die Regulation dieses Mechanismus erfolgt über das Zytokin IL-5. Eosinophile werden erst gebildet, wenn T<sub>H</sub>2-Zellen IL-5 sezernieren. Man spricht von einer chronischen allergischen Reaktion, wenn Eosinophile Gewebeschäden verursachen. Sind große Mengen an Eosinophilen im Blut oder Gewebe zu finden, so spricht man von einer Eosinophilie. Basophile Zellen haben große Gemeinsamkeiten mit den Eosinophilen; auch sie werden über das Zytokin IL-5 induziert.<sup>38,39</sup> Hohe IgE-Mengen bedingen eine erhöhte Expression des Fc $\epsilon$ RI-Rezeptors, was ebenfalls die Sensibilität im Bezug auf das Allergen verstärkt. Aktivierte Mastzellen setzen neben Chemokinen, Leukotrienen und Lipidmediatoren ebenfalls die Zytokine IL-4 und IL-13 frei. Die T<sub>H</sub>2-Immunantwort wird so aufrechterhalten. Lipidmediatoren sind dafür verantwortlich, dass Gefäße durchlässiger werden, sich die glatte Muskulatur kontrahiert und eine verstärkte Produktion des Schleims stattfindet.<sup>40</sup>

Allergische Reaktion vom Soforttyp wird in zwei Phasen eingeteilt: die Sofortreaktion, welche innerhalb kürzester Zeit abläuft, und die Spätreaktion, welche erst nach acht bis zwölf Stunden eintritt. Die Sofortreaktion ist dominiert durch die Aktivität des von Mastzellen sezernierten Histamins und durch Prostaglandine. Die Spätreaktion ist

gekennzeichnet durch die Aktivität von Leukotrienen, Chemokinen und Zytokinen. Diese sorgen für ein Anlocken von weiteren  $T_H2$ -Zellen und Eosinophilen. Es kommt zu einer weiteren Phase der glatten Muskelkontraktion sowie zur Ausbildung von Ödemen.<sup>41,42</sup>

Die etablierteste Therapieform ist die reine Behandlung der allergischen Symptome. Diese wirkt schnell und zuverlässig durch die Verabreichung von Medikamenten, die zum Beispiel den Histaminrezeptor H1 blockieren und so die Aktivität des Histamins verhindern. Allerdings ist dies keine Bekämpfung der eigentlichen Ursache der Allergie und so ist man heute – besonders bedingt durch den starken Anstieg allergischer Erkrankungen – auf der Suche nach alternativen Therapieformen.

Die Hyposensibilisierung, auch spezifische Immuntherapie (SIT) genannt, ist eine weit verbreitete Therapieform, bei der Patienten mit ansteigenden Dosen des Allergens durch subkutane Injektionen behandelt werden.<sup>43</sup> Hierbei kommt es zu einem Wechsel von einer  $T_H2$ - zu einer  $T_H1$ -geprägten Immunantwort, was eine Reduktion des IgE-Spiegels mit sich bringt. Des Weiteren ist eine verminderte Proliferation der T-Zellen auf das Allergen, sowie eine Produktion des regulatorischen Zytokins IL-10 zu beobachten.<sup>44,45</sup> Diese Therapie führt aber durchaus Nachteile mit sich; so besteht auch hier die Gefahr des anaphylaktischen Schocks, der durch die Degranulation von Mastzellen zustande kommen kann.<sup>46</sup> Eine andere Variante der SIT ist die sublinguale Immuntherapie (SLIT). Hierbei wird das Allergen nicht injiziert, sondern meist in flüssiger Form unter die Zunge des Patienten gegeben. Die SLIT scheint ein besseres Verhältnis aus Nutzen und Risiko für den Patienten darzustellen.<sup>47</sup> Allerdings funktioniert diese Therapie noch nicht mit allen Allergenen, es bedarf hierbei noch einiger Weiterentwicklung, um die SLIT in gleicher Weise wie die SIT zu etablieren.<sup>48</sup>

Weitere Therapieformen der allergischen Reaktion ist die Blockade des IgE-Rezeptors von Mastzellen, Basophilen und Eosinophilen durch kompetitive Hemmung, sowie die Verwendung von monoklonalen Antikörper gegen freies IgE.<sup>49,50</sup> Des Weiteren sind Therapieansätze durch den Einsatz von anti-IL-5-Antikörpern denkbar. IL-5 ist wichtig für die Produktion, Differenzierung, Rekrutierung, Aktivierung und das Überleben von Eosinophilen. Studien haben gezeigt, dass Patienten mit eosinophiler Oesophagitis durch eine Behandlung mit anti-IL-5 eine deutliche Verbesserung der Symptome zeigten; Patienten mit

atopischer Dermatitis zeigten allerdings nur eine geringfügigere Besserung und bei Patienten mit Asthma war keinerlei Effekt auf die Spätphasenreaktion und die Atemwegshyperreaktivität zu beobachten.<sup>51</sup>

Eine weitere Behandlungsmöglichkeit stellt die Modifikation der dendritischen Zellen dar. Das Ziel hierbei ist es, die T<sub>H</sub>2-Immunantwort durch modifizierte dendritische Zellen zu regulieren. Die Möglichkeiten der Modifikation sind sehr vielseitig; so kommen beispielsweise DNA-Vakzinierungen wie auch Modifikationen durch die Zugabe von Zytokinen in Frage.<sup>52-55</sup>

## **4 Die Rolle dendritischer Zellen bei der allergischen Reaktion**

Die dendritischen Zellen tragen ihren Namen aufgrund ihrer charakteristischen Fortsätze, welche den Dendriten der Nervenzellen sehr ähnlich sind.<sup>56,57</sup> Sie gelten als die potentesten antigenpräsentierenden Zellen, die naive T-Zellen aktivieren können. Unter den antigenpräsentierenden Zellen nehmen die dendritische Zellen eine besondere Stellung ein: sie sind in der Lage eine Primärantwort gegen ein zuvor unbekanntes Antigen einzuleiten. Dendritische Zellen sind ebenfalls in der Lage, die Immunantwort zu beeinflussen indem sie T-Zellen entweder in T<sub>H</sub>1- oder in T<sub>H</sub>2-Zellen differenzieren lassen.<sup>58,59</sup> Dendritische Zellen dienen im peripheren Gewebe als sogenannte „Wächter“ und haben als Hauptaufgabe die Abwehr von Antigenen. Diese werden von den dendritischen Zellen durch Phagozytose und Pinozytose aufgenommen, prozessiert und anschließend auf der Oberfläche präsentiert.<sup>60-62</sup> Nach der Aufnahme des Antigens wandern die dendritischen Zellen in den benachbarten Lymphknoten und reifen dort aus. Ausgereifte dendritische Zellen sind nicht in der Lage Antigene aufzunehmen; sie exprimieren allerdings große Mengen an kostimulatorischen Molekülen, MHC-Klasse I und MHC-Klasse II. Zudem werden Adhäsionsmoleküle produziert, welche für eine Aktivierung der T-Zellen erforderlich sind.<sup>63,64</sup>

Die hohe Produktion von kostimulatorischen Molekülen ist notwendig, da die Aktivierung und Differenzierung naiver T-Zellen zu Effektorzellen neben der Erkennung des Antigens mittels den CD4- beziehungsweise CD8-Rezeptoren noch

ein weiteres Signal benötigen. Ohne die Kostimulation wird die T-Zelle anerg. Dieser inaktive Zustand bleibt auch dann bestehen, wenn erneut ein Antigen präsentiert wird. Als kostimulatorische Moleküle gelten CD80 (Glykoprotein B7.1) und CD86 (Glykoprotein B7.2). Der entsprechende Rezeptor dieser Kostimulatoren ist CD28. Eine zusätzliche Bindung von B7 an CD28 führt zur Proliferation der T-Zelle und zu einer anschließenden Expression des CD40L, welcher wiederum an dem CD40 antigenpräsentierender Zellen bindet. Dadurch kommt es zur weiteren Expression von B7 Glykoproteinen, welche wiederum T-Zellen besser proliferieren lassen.

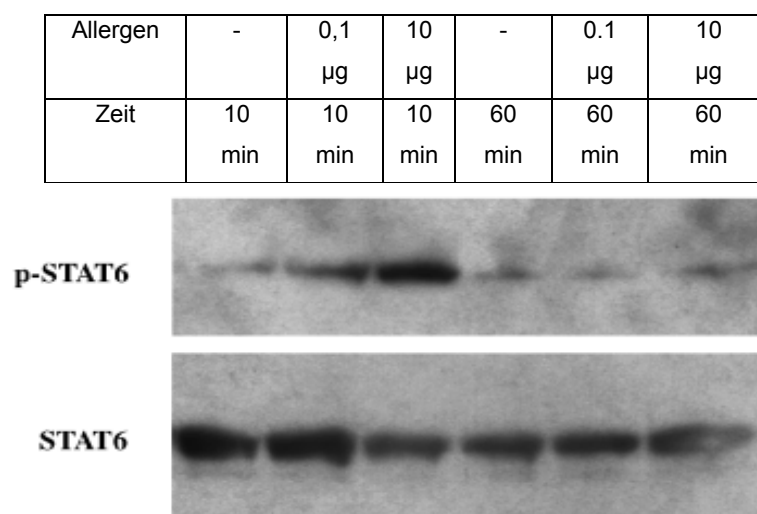
CTLA-4 ist ein Molekül, das nahe mit dem CD28 verwandt ist, jedoch eine inhibitorische Funktion zeigt. Eine Bindung von CTLA-4 an die B7 Glykoproteine sorgt in T-Zellen für eine geringere Stimulationsfähigkeit durch antigenpräsentierende Zellen. Im gleichen Zuge vermindert sich die Produktion des Zytokins IL-2.<sup>65</sup> Ein weiteres Molekül, das verwandt mit CD28 ist, ist ICOS. Es bindet an den ICOS-Liganden auf antigenpräsentierenden Zellen, induziert aber nicht IL-2, sondern sorgt für die Produktion von IL-10.<sup>66,67</sup> ICOS scheint eine  $T_H2$ -Immunantwort zu begünstigen, jedoch nicht durch die direkte Beeinflussung naiver T-Zellen, sondern durch die Regulation von  $T_H2$ -Zellen.<sup>68</sup>

Unreife dendritische Zellen produzieren und sezernieren nach Kontakt mit Proteinallergenen das Zytokin IL-13 und scheinen damit direkten Einfluss auf das Entstehen einer allergischen Immunantwort zu nehmen, da die Blockade von IL-13 durch neutralisierende Antikörper zu einer Inhibition der IL-4-, nicht aber der IFN- $\gamma$ -Produktion führt.<sup>11</sup> Die Bedeutung von IL-13 für die Th2-Entwicklung zeigte sich in Untersuchungen an IL-13-/- T-Zellen, die selbst in Anwesenheit von IL-4 nicht mehr zu Th2-Zellen differenzieren konnten.<sup>69</sup> In einer weiteren Studie wurde ebenfalls die besondere Bedeutung von IL-13 für die  $T_H2$ -Effektorfunktion beschrieben.<sup>70</sup>

Die Rolle von IL-13 wird auch im Zusammenhang mit allergischem Asthma diskutiert. Im Mausmodell konnte IL-13 als Schlüsselzytokin der Atemwegsüberempfindlichkeit gezeigt werden; zudem existieren indirekte Hinweise auf eine kritische Rolle in der humanen asthmatischen Erkrankung durch das vermehrte Auftreten von IL-13 in asthmatischen Lungen.<sup>71</sup>

## 5 Zytokin-Signaltransduktion und SOCS-Proteine

Zytokine sind von Zellen sekretierte Proteine, die großen Einfluss auf das Überleben, die Proliferation, Differenzierung und funktionelle Aktivität der Zellen des Immunsystems haben. Die zytokinabhängige  $T_H1$ - bzw.  $T_H2$ -Differenzierung führt zur Aktivierung einer Familie von rezeptorassoziierten Protein-Tyrosinkinasen (PTK), den Januskinasen (JAK1-3, Tyk2). Im aktiven Zustand binden sie Transkriptionsfaktoren der Familie der „signal transducer and activator of transcription“ (STAT1-5A, 5B-6) an den Rezeptorkomplex und phosphorylieren diese an Tyrosinresten. Die STAT-Moleküle dimerisieren und translozieren in den Zellkern, wo sie für die Expression von Zytokingenen mitverantwortlich sind.<sup>72</sup> Für die  $T_H1$ - beziehungsweise  $T_H2$ -Entwicklung sind STAT4 sowie STAT6 von Bedeutung. Wird durch IL-12 eine  $T_H1$ -Differenzierung induziert, kommt es zur Phosphorylierung von STAT4 und schließlich zur mRNA-Expression von IFN- $\gamma$ . Die Differenzierung in  $T_H1$ -Zellen lässt sich durch die Zugabe von IL-4 nicht in Richtung  $T_H2$  beeinflussen.<sup>72</sup> Die Transfektion dieser Zellen mit einem exogen aktivierbaren STAT6-Konstrukt führt hingegen zur Ausprägung eines  $T_H2$ -Zytokinprofils.<sup>73</sup> Im murinen System konnte an STAT6-/- Mäusen gezeigt werden, dass die Ausbildung einer typischen  $T_H2$ -Immunantwort mit der Bildung von IgE und IgG1 ausbleibt.<sup>74</sup> Im humanen *in vitro* System ist ebenfalls eine schnelle Phosphorylierung von STAT6 in unreifen dendritischen Zellen von Allergikern nach Stimulation mit Proteinallergenen zu beobachten (Abb. 3).<sup>11</sup>



**Abbildung 3: Aktivierung des Transkriptionsfaktors STAT6 in unreifen dendritischen Zellen**  
Proteinallergene bewirken in unreifen dendritischen Zellen eine sehr schnelle, dosisabhängige Aktivierung von STAT6. Aus <sup>11</sup>

Dahingegen sind Kontaktallergene, welche eine  $T_H1$ -Antwort hervorrufen, nicht in der Lage STAT6 oder andere STAT-Moleküle in dendritischen Zellen zu induzieren.<sup>75</sup>

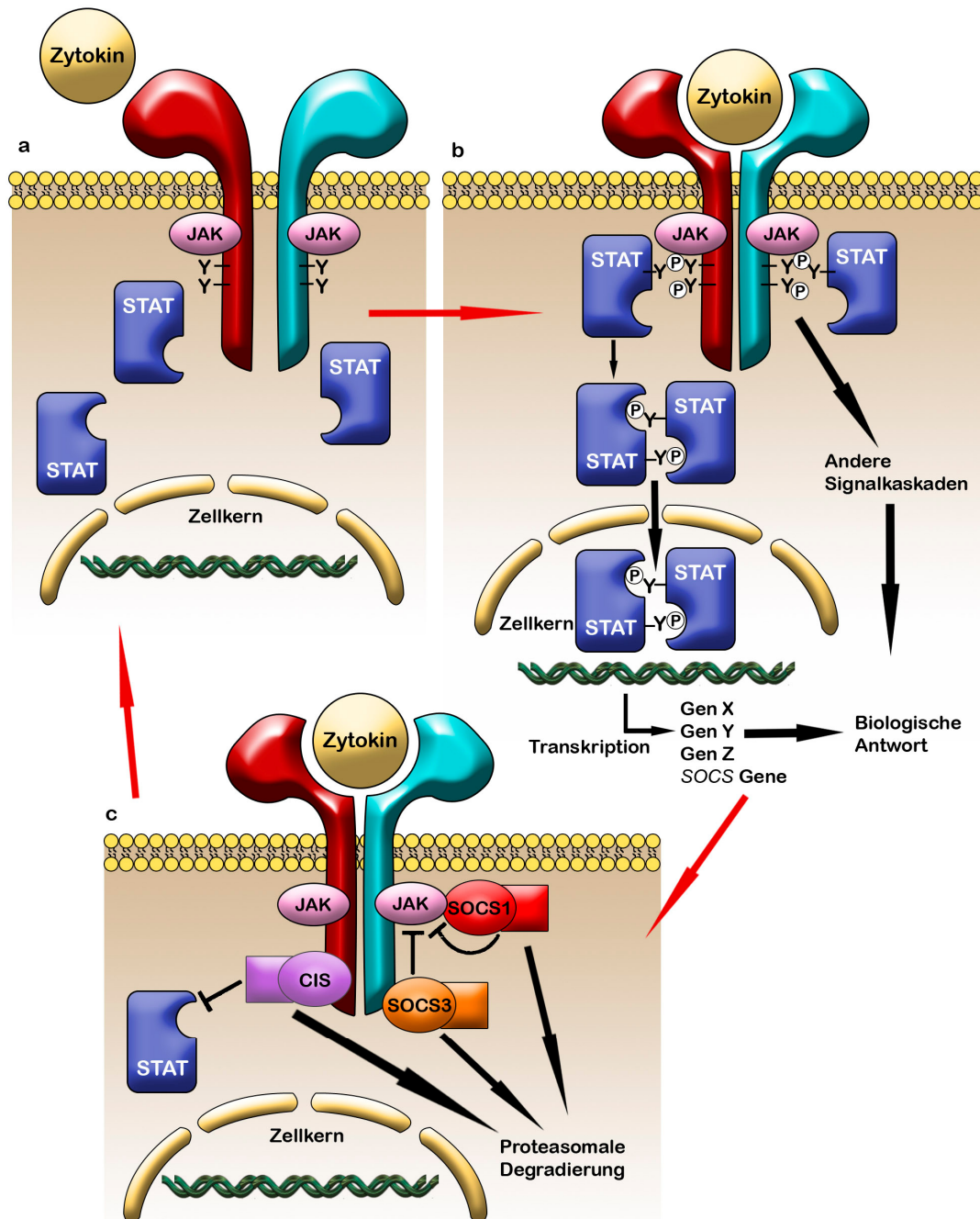
Die Familie der „supressor of cytokine signalling“- (SOCS) Proteine sind intrazelluläre Proteine, die in der Lage sind die Antwort der Immunzellen auf Zytokine zu regulieren.<sup>80</sup> Zu der SOCS-Familie gehören insgesamt acht Proteine: SOCS1, SOCS2, SOCS3, SOCS4, SOCS5, SOCS6, SOCS7 und das „cytokine-induced SRC-homology 2 (SH2)“ Protein CIS. Jedes dieser Proteine trägt eine zentrale SH2-Domäne, eine aminoternale Domäne variabler Länge mit abweichender Sequenz, sowie ein carboxy-terminales, vierzig Aminosäure langes Modul, welches als SOCS box bezeichnet wird.<sup>81</sup> Die am besten charakterisierten SOCS-Familienmitglieder – CIS, SOCS1, SOCS2 und SOCS3, scheinen in einem klassischen negativen feedback-loop Mechanismus die Zytokin-Signaltransduktion zu inhibieren (Abbildung 4). Generell sind diese Proteine in unstimulierten Geweben nicht hoch exprimiert, werden aber nach Kontakt einer Zelle mit einem Zytokin durch Zytokin-induzierte Gene sehr schnell transkribiert. Dieser Vorgang findet in Abhängigkeit von der Aktivierung der STAT-Moleküle statt.<sup>82,83</sup> SOCS1 kann durch seine SH2-Domäne mit den Januskinasen interagieren und deren Tyrosinkinase-Aktivität inhibieren.<sup>84</sup> Die hochaffine Interaktion zwischen SOCS1 und der Januskinase ist bedingt durch dreißig Aminosäuren, die aminoterminal zur SH2-Domäne von SOCS1 liegen. Diese formieren eine Kinase inhibierende Region (KIR), die homolog zur Pseudosubstrat-inhibitorischen Region der Januskinase ist. Dies könnte der Grund sein, dass SOCS1 die katalytische Aktivität der Januskinasen durch die Interaktion zwischen der SOCS1-KIR mit der Januskinasen-Aktivierungsschleife hemmt.<sup>85,86</sup> CIS hingegen interagiert nicht mit der Januskinase, sondern benutzt seine SH2-Domäne, um phosphorylierte Tyrosinreste an aktivierte Zytokinrezeptoren zu binden. STAT-Moleküle können so nicht mehr rekrutiert und aktiviert werden; die kompetitive Hemmung der Bindestellen wird hier als Wirkmechanismus vermutet. Als Mechanismus für die SOCS3-vermittelte Hemmung ist sowohl die Interaktion mit den Januskinasen als auch mit den Zytokinrezeptoren von Bedeutung.<sup>87-89</sup> SOCS3 bindet an aktivierte Rezeptoren, aber beeinträchtigt nicht die Rekrutierung der STAT-Moleküle.<sup>87-90</sup> Das zu SOCS1 sehr homologe SOCS3 inhibiert die katalytische Aktivität der Januskinase in Analogie zu SOCS1; es bedarf jedoch mehr der Rezeptorbindung als der direkten Interaktion mit der Januskinase.



Die konservierte SOCS-box interagiert mit Elongin B und Elongin C. Dies sind Proteine des E3 Ubiquitin-Ligase-Komplexes, welcher für Proteine ubiquitiniert und für die Proteasomale Degradierung vorbereitet.<sup>91,92</sup> Die SOCS-Proteine verbinden spezifische inhibitorische Wirkungen auf die Signalkaskade mit einem generischen Mechanismus, der die proteasomale Degradierung zur Folge hat. Die Aktivität von JAK und STAT kann durch die Zugabe von Proteasom-Inhibitoren verlängert werden.<sup>93,94</sup>

Die Tatsache, dass Zytokine eine zentrale Rolle für das Auftreten von diversen Immunerkrankungen spielen, macht es durchaus denkbar, dass die Disregulation der SOCS-Moleküle hierbei eine Rolle spielen könnte und somit einen interessanten Angriffspunkt für mögliche Therapieansätze bieten könnte. Hinweise hierauf geben Studien, die eine konstitutive Aktivierung des JAK-STAT Signaltransduktionswegs in hämatologischen Erkrankungen, wie zum Beispiel Leukämie, aufzeigen.<sup>95-97</sup> Für die allergische Erkrankung gibt es ebenfalls erste Hinweise, die auf die wichtige Position der SOCS-Moleküle in diesem Zusammenhang hindeuten. So sind SOCS3 und SOCS5 prädominant in T<sub>H</sub>2-Zellen exprimiert und Untersuchungen an SOCS3 -/- Mäusen zeigten eine verminderte T<sub>H</sub>2-Entwicklung.<sup>98,99</sup> SOCS3 ist in T<sub>H</sub>2-Zellen höher exprimiert als SOCS1, wohingegen SOCS1 in T<sub>H</sub>1-Zellen eine erhöhte Expression gegenüber SOCS3 aufweist.<sup>100</sup>

In der erst kürzlich entdeckten und beschriebenen T-Zell-Subpopulation der T<sub>H</sub>17-Zellen, die bei der Entstehung von Autoimmunkrankheiten von zentraler Bedeutung zu sein scheinen, konnte SOCS3 ebenfalls eine wichtige Rolle zugeschrieben werden. Die IL-23 vermittelte Phosphorylierung von STAT3 wird durch SOCS3 negativ reguliert. Des Weiteren bindet STAT3 direkt an die *IL-17A* und *IL-17F* Promotoren; die Produktion von IL-17 ist in Abwesenheit von SOCS3 stark erhöht. SOCS3 scheint im murinen System ein Hauptregulator der T<sub>H</sub>17-Differenzierung zu sein.<sup>101</sup>



**Abbildung 4: SOCS-Proteine in der Zytokin-Signaltransduktion**

a) In unstimulierten Zellen sind Signalmoleküle wie JAK- und STAT-Moleküle inaktiv; SOCS-Gene sind nicht exprimiert. b) Nach Bindung des Zytokins an den Rezeptor erfolgt eine Konformationsänderung der JAK, die eine Phosphorylierung und Aktivierung ermöglicht. STAT-Moleküle werden rekrutiert und über die phosphorylierten Tyrosinreste (Y) selbst phosphoryliert. Dies erlaubt die Dimerisierung und Translokation in den Zellkern, was die Transkription mehrerer Gene, inklusive der SOCS-Gene, ermöglicht. Zusammen mit anderen Signalkaskaden kommt es so zur biologischen Antwort der Zelle. c) SOCS1 inhibiert direkt die katalytische Aktivität der JAK; CIS bindet anstelle der JAK und inhibiert so die Rekrutierung von STAT; SOCS3 bindet an den Rezeptor und inhibiert die JAK. Durch die SOCS-box aller SOCS-Proteine besteht ein direkter Zusammenhang zum zellulären Ubiquitin-Komplex, der Proteine auf die proteasomale Degradierung vorbereitet. Modifiziert nach <sup>80</sup>

## 6 Zielsetzung der Arbeit

Atopische Erkrankungen wie Heuschnupfen, allergisches Asthma und Neurodermitis nahmen im Verlauf der letzten vier Jahrzehnte in den westlichen Industrieländern extrem stark zu. Diese Erkrankungen sind bedingt durch eine erhöhte IgE-Produktion und stehen unter dem Einfluss von eosinophilen Granulozyten. Das Auftreten dieser Erkrankungen steht nach heutigem Stand der Forschung unter der Kontrolle von  $T_H2$ -Zellen, welche sich aus  $CD4^+$  T-Zellen nach dem Kontakt mit allergenbeladenen antigenpräsentierenden Zellen unter dem Einfluss von Zytokinen wie IL-4, IL-6 ausbilden.

Die bis heute bekannten potentesten antigenpräsentierenden Zellen sind die dendritischen Zellen. Diese Zellen sind in der Lage  $CD4^+$  T-Zellen sowohl in  $T_H1$ - als auch in  $T_H2$ -Zellen differenzieren zu lassen. Während diese Prozesse auf der Ebene der T-Zellen gut erforscht sind, sind die molekularen Zusammenhänge in den dendritischen Zellen in Zusammenhang mit der allergischen Erkrankung noch weitgehend unbekannt. So wurde das  $T_H1$ -fördernde Zytokin IL-12 bei Atopikern ursprünglich als nicht vorhanden vermutet, was sich jedoch nicht bestätigte.

Dendritische Zellen allergischer Patienten zeigen nach Kontakt mit Proteinallergenen eine Aktivierung der „signal transducer and activator of transcription 6“ (STAT6) und sezernieren unter anderem das Zytokin IL-13, was einen direkten Einfluss auf die Entstehung der allergischen Immunantwort zu haben scheint.

Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Beteiligung dendritischer Zellen nach Allergenexposition an der  $T_H2$ -Immunantwort untersucht werden. Das Hauptaugenmerk sollte hierbei auf die, den STAT-Molekülen nachgeschalteten, Regulatoren der Zytokinsignaltransduktion „suppressors of cytokine signaling“ (SOCS) sowie den  $T_H1$ - und  $T_H2$ - assoziierten Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA3 gelegt werden. Um diese Prozesse näher zu beleuchten, sollte die Expression der genannten Moleküle auf Proteinebene sowie auf RNA-Ebene mittels PCR analysiert und mit den Vorgängen, die durch Kontaktallergene ausgelöst werden, verglichen werden. Zudem sollten, mittels High Density Micro Array-Analysen, weitere Moleküle identifiziert werden, die durch die Aufnahme von Proteinallergenen, nicht aber durch bakterielles Lipopolysaccharid (LPS), beeinflusst werden.

## II Material und Methoden

### 1 Material

#### 1.1 Laborgeräte

|                             |  |
|-----------------------------|--|
| Digitalkamera:              | Camedia C3040 Zoom, Olympus, Hamburg   |
| Dispenser:                  | Multipette 4780, Eppendorf, Hamburg  |
| Durchflußzytometer:         | FACScan und FACSCalibur, Becton Dickinson, CA, USA   |
| Elektrische Pipettierhilfe: | Pipetus, Hirschmann, Eberstadt   |
| Elektrophoresegerät:        | Power Pac 1000, Bio-Rad, München   |
| Elektrophoresekammer:       | Mini-PROTEAN 3 Electrophoresis, Bio-Rad<br>PerfectBlue Midi, Peqlab Erlangen                         |
| ELISA-Reader:               | Modell 450, Bio-Rad  |
| Lichtmikroskop:             | DM IL, Leica<br>CH-2, Olympus, Hamburg   |
| Magnetrührer:               | IKAMAG RCT, Janke & Kunkel, Staufen  |
| PCR-Geräte:                 | LightCycler 1.5, Roche Diagnostics, Mannheim<br>Primus Advanced 96 Gradient Cycler, Peqlab, Erlangen |
| pH-Meter:                   | Mikroprozessor pH 539, WTW, Weilheim   |
| Photometer:                 | BioPhotometer 6131, Eppendorf Scientific, Westbury, NY,<br>USA                                       |
| Pipettierhilfe:             | Pipetman, Gilson, F 95400 Villiers-le-Bel, Frankreich<br>Finnpipette, zwölfkanal, Labsystems         |
| Proteintransferkammer:      | Trans-Blot SD Transfer Cell, Biorad  |
| Sterilbank:                 | Lamin-Air, HB 2472, Heraeus  |
| Transilluminator:           | Model TC-312A 312nm, Spectroline, Westbury, NY, USA  |
| Waagen:                     | Multifunktionswaage Baureihe HG, Roth, Karlsruhe<br>MCI Analytic AC 210 S, Sartorius, Göttingen      |
| Wasserbäder:                | GFL, Schommartz-Labortechnik, Worms<br>5 BU & Thermomix BU, B. Braun                                 |

Zählkammer (Neubauer): Kühn & Bayer, Nidderau  
 Zellkulturbrutschrank: B 5061 EK/CO<sub>2</sub>, Heraeus, Hanau  
 Zentrifugen: Minifuge RF, Heraeus  
 Megafuge 1.0, Heraeus  
 Centrifuge 5415 C, Eppendorf  
 Biofuge fresco, Heraeus

## 1.2 Software

Auswertung, Statistik und Textverarbeitung:  
 OfficeXP, Microsoft, Richmond, VA, USA  
 ELISA: Microplatemanager 4.0, Bio-Rad  
 Geldokumentation: Argus X1 Version 2.2.8, Biostep, Jahnsdorf  
 Graphiken: Adobe Photoshop CS, San Jose, CA USA  
 Microarray: GeneChip, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA  
 ArrayAssist 3.3t, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA  
 Real-Time-PCR: LightCycler Software 3.53, Roche Diagnostics, Mannheim

## 1.3 Verwendete Gebrauchsartikel

**Tabelle 2: Verwendete Gebrauchsartikel**

| Artikel        | Art                      | Firma                  |
|----------------|--------------------------|------------------------|
| Combitips      | 12.5 ml, 2.5 ml, 0.5 ml  | Eppendorf              |
| Deckgläser     | 15 x 15 mm               | Menzel Gläser          |
| Einwegspritzen | 1 ml, 5 ml, 10 ml, 20 ml | B. Braun               |
| ELISA-Platte   | 96-well, Maxisorp        | Nunc, Wiesbaden        |
| Filme          | 667 Hyperfilm-ECL        | Amersham, Braunschweig |
| Glaskapillaren | 20 µl                    | Roche                  |

|                     |   |                                |
|---------------------|---|--------------------------------|
| Kanülen             | 0.8 x 40 mm, 0.45 x 12 mm,<br>0.7 x 30 mm   | B. Braun                       |
| Kryoröhrchen        | 1.8 ml                                      | Nunc                           |
| Objektträger        | 76 x 26 mm                                  | Menzel Gläser                  |
| Pasteurpipetten     |   | Brand                          |
| Pipettenspitzen     | 10µl, 200 µl, 1000 µl                       | Greiner                        |
| PVDF-Membran        |   | Millipore                      |
| Reaktionsgefäße     | 0.5 ml, 1.5 ml, 2 ml                        | Sarstedt                       |
| Rundbodenröhrchen   | 2.4 / 75 mm                                 | Becton Dickinson               |
| Sterilfilter        | 0.2 µm                                      | Schleicher & Schüll,<br>Dassel |
| Zellkulturplatten   | 6-, 12-, 24-, 48- und 96-well<br>Flachboden | Costar                         |
| Zentrifugenröhrchen | 15 ml, 50 ml                                | Greiner, Herolab               |

## 1.4 Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 3: Verwendete Chemikalien und Reagenzien

| Artikel   | Firma                           |
|---|---------------------------------|
| 2-Mercaptoethanol   | Sigma-Aldrich, Deisenhofen      |
| 2,2-Azino-bis(3-ethylenbenzthiazolin-6-sulfonsäure)<br>(ABTS) | Sigma-Aldrich                   |
| Acrylamid 30%   | Roth, Karlsruhe                 |
| Agarose (Gelelektrophorese)                                   | Bio-Rad                         |
| Aprotinin   | Bayer, Leverkusen               |
| Aqua bidest   | Apotheke der Uniklinik<br>Mainz |
| Aqua bidest, steril   | B. Braun                        |

|   |                                  |
|---|----------------------------------|
| BCA Protein Assay Kit                               | Pierce, Rockford, IL, USA        |
| Buffy-Coats   | Transfusionszentrale, Mainz      |
| Citronensäure                                       | Serva, Heidelberg                |
| DMSO  | Roth                             |
| ECL plus  | Amersham, Braunschweig           |
| Essigsäure  | Roth                             |
| Ethanol 70%   | Apotheke der Uniklinik,<br>Mainz |
| Ethidiumbromid                                      | Sigma-Aldrich                    |
| Ethylendiamintetraessigsäure-Na <sub>2</sub> (EDTA) | Boehringer, Mannheim             |
| Ficoll 1.077  | Biochrom, Berlin                 |
| Fötale Kälberserum (FCS)                            | Sigma-Aldrich                    |
| Gene-Ruler 100bp Ladder Plus                        | Fermentas, St. Leon-Rot          |
| HotStarTaq Mastermix Kit                            | Qiagen, Hilden                   |
| Human Groß ELISA Development Kit                    | Peptotech, Rocky Hill, USA       |
| IMDM  | Gibco                            |
| Isopropanol   | Merck                            |
| Kaliumacetat  | Merck                            |
| Kaliumchlorid                                       | Merck                            |
| Ladepuffer  | Roth                             |
| L-Glutamin  | Gibco, RRL                       |
| LPS   | Sigma-Aldrich                    |
| Magnesiumchlorid-Hexahydrat, p.a.                   | Merck                            |
| Magnesiumsulfat                                     | Merck                            |
| MCI/MI  | Hermal, Reinbek                  |
| Natriumacetat                                       | Serva                            |
| Natriumazid   | Serva                            |
| Natriumchlorid, p.a.                                | Merck                            |
| Natriumdihydrogenphosphat                           | Merck                            |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                          | Merck                            |
| Natriumhydrogencarbonat, p.a.                       | Merck                            |
| Natriumhydrogenphosphat-Dihydrat, reinst            | Merck                            |

---

|                                     |                                 |
|-------------------------------------|---------------------------------|
| Natriumhydroxid                     | Merck                           |
| Natriumorthovanadat                 | Sigma-Aldrich                   |
| Natriumpyruvat                      | Sigma-Aldrich                   |
| Penicillin                          | Serva                           |
| Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)  | Boehringer                      |
| Polymyxin-B-Sulfat                  | Sigma-Aldrich                   |
| Quantitect SYBR Green PCR Kit       | Qiagen, Hilden                  |
| QCL-1000 LAL-Kit                    | Cambrex, Walkersville, USA      |
| Rainbow Molecular Weight Marker     | Amersham,                       |
| Rinderserumalbumin (BSA)            | Sigma-Aldrich                   |
| RNeasy Mini Kit                     | Qiagen, Hilden                  |
| Rotiblock                           | Roth                            |
| Roti-Blot A (Anodenpuffer)          | Roth                            |
| Roti-Blot K (Kathodenpuffer)        | Roth                            |
| Rotiphoreseigel 30                  | Roth                            |
| Salzsäure 1N                        | Merck                           |
| Sensiscript Kit                     | Quagen, Hilden                  |
| Streptavidin (Peroxidase-gekoppelt) | Zymed, CA, USA                  |
| Streptomycin                        | Serva                           |
| TE pH8.0                            | Qiagen, Hilden                  |
| Tetanustoxoid                       | Behring-Werke, Marburg          |
| TRIS-Base                           | Roth                            |
| TRIS-HCL                            | Roth                            |
| Triton X100                         | Sigma-Aldrich                   |
| Trypanblaulösung                    | Sigma-Aldrich                   |
| Tween 20                            | Sigma-Aldrich                   |
| Wasserstoffperoxid 30%              | Apotheke der Uniklink,<br>Mainz |

---



## 1.5 Antikörper

Die in Tabelle 4 aufgeführten monoklonalen Antikörper wurden für die Durchflußzytometrie von Zellpopulationen verwendet.

**Tabelle 4: Antikörper für Durchflußzytometrie**

| Antikörper | Spezifität | Klasse     | Bezugsquelle |
|------------|------------|------------|--------------|
| MAB104     | CD80       | Maus IgG1  | Immunotech   |
| HB-15      | CD83       | Maus IgG2b | Immunotech   |
| IT2.2      | CD86       | Maus IgG2b | PharMingen   |
| YE2/36HLK  | HLA-DR     | Rat IgG2a  | Camon        |

Zur Isotypenkontrolle wurden Ratten-Immunglobuline der Subklasse IgG2a und Maus-Immunglobuline der Subklassen IgG1 und IgG2b der Firma Pharmingen verwendet.

Für die Sekundärfärbung wurde ein R-Phycoerythrin (PE) gekoppelter Esel- $\alpha$ -Maus IgG (H+L; F(ab')<sub>2</sub>) Antikörper bzw. ein Dichlortriazinyl-Amino-Fluorescein (DTAF) gekoppelter Ziegen- $\alpha$ -Ratte IgG (H+L) Antikörper der Firma Dianova, Hamburg eingesetzt.

Zur Durchführung des CXCL2-ELISA wurde der Human Groß ELISA Development Kit 900-K120 der Firma PeproTech Inc., Rocky Hill, NJ, USA benutzt.

Die in Tabelle 5 aufgeführten Antikörper wurden im Western-Blot zum spezifischen Nachweis der entsprechenden Proteine eingesetzt.

**Tabelle 5: Antikörper für Western-Blot**

| Antikörper | Spezifität    | Klasse                      | Bezugsquelle |
|------------|---------------|-----------------------------|--------------|
| S-20       | STAT6         | Kaninchen<br>polyklonal IgG | Santa Cruz   |
| Tyr641     | phospho-STAT6 | Kaninchen<br>polyklonal IgG | NEB          |
| C-20       | SOCS1         | Ziege polyklonal<br>IgG     | Santa Cruz   |
| H-103      | SOCS3         | Kaninchen<br>polyclonal IgG | Santa Cruz   |
| HG3-35     | GATA3         | Maus IgG1                   | Santa Cruz   |
| C-15       | T-bet         | Ziege polyklonal<br>IgG     | Santa Cruz   |

Als Sekundärantikörper wurden  $\alpha$ -Ziegen,  $\alpha$ -Maus bzw.  $\alpha$ -Kaninchen IgG Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, USA eingesetzt, die Peroxidase gekoppelt sind.

## 1.6 Primer

### 1.6.1 Primer für die konventionelle RT-PCR

Alle für die RT-PCR verwendeten Primer wurden von der Firma Roth synthetisiert und in Aqua dest. gelöst. Die Primer wurden auf eine Konzentration von 100 pmol/μl eingestellt, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

#### β-Aktin

forward 5'-GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'

reverse 5'-AGAACTGTGTTGGCGTACAG-3'

#### CD3

forward 5'-TGAGGGCAAGAGTGTGTAAG-3'

reverse 5'-TAGTCTGGGTTGGGAACAGG-3'

#### SOCS1

forward 5'-AGAGCTTCGACTGCCTCTTC-3'

reverse 5'-AGGGGAAGGAGCTCAGGTAG-3'

#### SOCS3

forward 5'-GCCACCTACTGAACCCTCCT-3'

reverse 5'-ACGGTCTTCCGACAGAGATG-3'

#### GATA3

forward 5'-AGGCAGGGAGTGTGTGGACT-3'

reverse 5'-TCCTCCTCCAGAGTGTGGTT-3'

#### T-bet

forward 5'-GTCAATTCCTTGGGGGAGAT-3'

reverse 5'-TCATGCTGACTGCTCGAAAG-3'

In der Tabelle 6 sind die für die zu untersuchenden Gene erwarteten Amplikongrößen aufgeführt.

**Tabelle 6: Erwartete Amplikongrößen**

| Gen            | Größe des Amplikons (Basenpaare) |
|----------------|----------------------------------|
| <i>β-Aktin</i> | 234 bp                           |
| <i>CD3</i>     | 223 bp                           |
| <i>SOCS1</i>   | 201 bp                           |
| <i>SOCS3</i>   | 177 bp                           |
| <i>GATA3</i>   | 215 bp                           |
| <i>T-bet</i>   | 174 bp                           |

### 1.6.2 Primer für die Real-Time-PCR

Für die Real-Time-PCR wurden ausschließlich QuantiTect Primer Assays der Firma Qiagen, Hilden verwendet. Zum Herstellen eines 10x Primer Assays wurden die Lyophilisate nach Vorgaben des Herstellers in 1.1ml TE, pH 8.0 gelöst, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

Die in Tabelle 7 aufgeführten Primer Assays wurden in der Real-Time-PCR zur Quantifizierung der Genexpression eingesetzt.

**Tabelle 7: Verwendete Primer Assays für die RealTime-PCR**

| Gen            | Primer Assay  | Katalognummer |
|----------------|---------------|---------------|
| <i>β-Aktin</i> | Hs_ACTB_SG_1  | QT00095431    |
| <i>SOCS1</i>   | Hs_SOCS1_1_SG | QT00202475    |
| <i>SOCS3</i>   | Hs_SOCS3_SG_1 | QT00244580    |
| <i>GATA3</i>   | HS_GATA3_SG_1 | QT00095501    |
| <i>T-bet</i>   | HS_TBX21_1_SG | QT00042217    |

## **1.7 Puffer und Medien**

### **1.7.1 Medien für die Zellkultur**

#### IMDM (Iscove´s Modified Dulbecco´s Medium)

IMDM Trockenmedium  
3.024 g/l    NaHCO<sub>3</sub>  
100 U/ml    Penicillin  
100 µg/ml    Streptomycin

#### Plasma und Serum:

Zu der Kultur mit humanen Primärzellen wurde ausschließlich autologes Plasma zugegeben, um eine Kontamination mit Fremdproteinen zu vermeiden.

Die Seren wurde jeweils 30 min bei 56°C hitzeinaktiviert.

### **1.7.2 Puffer**

Alle Puffer wurden, falls nicht anders beschrieben, bei 4°C gelagert.

#### ABTS-Substrat-Lösung:

0.3 mg/1 ml ABTS  
0.1 M       Citrat  
in Aqua dest., pH 4.35  
vor Gebrauch Zugabe von  
1 µl/ml       H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (30%)  
dann sofort verwenden

#### Aktiviertes Na-ortho-Vanadat:

200 mM Na-ortho-Vanadat  
in PBS, einstellen auf pH 10  
gelbliche Lösung kochen bis sie farblos wird  
erneut auf pH 10 einstellen  
Vorgang wiederholen, bis die Lösung wieder farblos ist  
bei -20°C lagern

Elektrophorese-Puffer 4x (Western-Blot):

100 mM Tris-HCl  
767 mM Glycin  
13.7 mM SDS  
in Aqua dest., pH 8.5

FACS-Puffer:

2% (w/v) FCS  
in PBS

Lysepuffer (Western-Blot):

50 mM Hepes  
150 mM NaCl  
1.5 mM MgCl<sub>2</sub>  
1 mM EDTA  
10% (v/v) Glycerol  
1% (v/v) Triton X-100  
in Aqua dest.

vor der Verwendung Zugabe von :

2 mM PMSF in Ethanol gelöst  
2 mM aktives Na-ortho-Vanadat  
10 µg/ml Aprotinin

PBS („phosphate buffered saline“) 10 x:

81.8 g/l NaCl  
15.6 g/l NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> x 2 H<sub>2</sub>O

in Aqua dest., pH 6.6, autoklaviert; bei einer 1:10 Verdünnung mit H<sub>2</sub>O liegt  
der pH-Wert bei 7.2

PBST (Western-Blot):

0.1 (v/v) Tween-20  
in PBS

TAE-Puffer (50x)

242g Tris;  
57,1ml Eisessig  
100ml EDTA 0,5M, pH8  
ad 1l H<sub>2</sub>O

Trypanblau:

90 ml PBS  
10 ml Trypanblau

Waschpuffer (Western-Blot):

24.2 g TRIS-Base  
80 g NaCl  
in Aqua dest., pH 7.6

Zytokin-ELISA „blocking“Puffer:

1% (w/v) BSA  
bei 37°C in PBS lösen

Zytokin-ELISA „coating“Puffer:

0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
in Aqua dest.  
einstellen auf pH 9.0 (für IL-12: pH 6.0) mit 0.1 M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>

### **1.7.3 Allergene**

Als Proteinallergene wurden die Gräserpollen-, Birkenpollen- und Hausstaubmilbenallergenmischungen der Firma ALK-Scherax, Hamburg eingesetzt.

Als Kontaktallergen wurde 5-Chlor-2-methyl-2,3-dihydroisothiazol-3-on plus 2-Methyl-2,3-dihydroisothiazol-3-on (MCI/MI) der Firma Hermal, Reinbek eingesetzt.

Das in dieser Arbeit verwendete Tetanustoxoid wurde von den Behring-Werken, Marburg bezogen.

#### **1.7.4 Zytokine**

Für die Zellkultur wurden die rekombinanten Zytokine IL-4, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  (Strathmann Biotec AG), Prostaglandin-E<sub>2</sub> (UpJohn GmbH, Heppenheim (Minprosting E2)), sowie rekombinantes humanes GM-CSF (Immunex Corp., Seattle, WA, USA (Leukine)) eingesetzt.

#### **1.7.5 Allergiker**

Das Kriterium für Probanden (Blutspender) als Allergiker eingestuft zu werden war neben der Vorgeschichte einer Rhinitis ein bekannt positiver Prick-Test beziehungsweise der Nachweis von allergenspezifischem IgE im Serum (RAST-Test) auf Gräser- beziehungsweise Birkenpollen.



## 2 Methoden

### 2.1 Zellbiologische Methoden

#### 2.1.1 Allgemein

Alle Arbeitsschritte zur Isolation und Kultivierung von Zellen wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. In der Zellkultur eingesetzte Plastikartikel wurden steril und endotoxinfrei bezogen. Glasinstrumente wurden vor ihrem Einsatz für 4 h bei 180°C sterilisiert und Lösungen 20 min bei 1.2 bar und 120°C autoklaviert beziehungsweise durch einen 0.2 µm Sterilfilter filtriert.

Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> in wasserdampfgesättigter Atmosphäre.

#### 2.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl durch Trypanblaufärbung

Die Zellsuspension wurde in einem Verhältnis von 1:10 mit Trypanblau vermischt. Die intakte Zellmembran ist ca. 5 min für Trypanblau undurchlässig, dagegen ist bei toten Zellen die Membran permeabel, so dass sie nach wenigen Sekunden blau angefärbt sind. 10 µl der mit Trypanblau vermischten Zellsuspension wurden in eine Neubauer-Zählkammer (Kammertiefe: 0.1 mm, Fläche von einem Großquadrat: 1mm<sup>2</sup>) gegeben. Bei einer 200 x Vergrößerung wurde ein Großquadrat ausgezählt, wobei nur die lebenden Zellen gezählt wurden.

Die Anzahl der Zellen wurde nach folgender Formel berechnet:

$$[\text{Zellzahl in einem Großquadrat}] \times [\text{Verdünnungsfaktor}] \times [\text{KF}] = [\text{Zellen / ml}]$$

$$\text{KF} = \text{Kammerfaktor} = 10^4$$

#### 2.1.3 Kryokonservierung

Die Kryokonservierung von PBMC erfolgte bei –80°C. Hierbei wurden 7 x 10<sup>7</sup> PBMC pelletiert (400 x g; 5 min; 4°C) und in 810 µl IMDM mit 10% autologem Plasma

resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension mit 180 µl DMSO und 810 µl autologem Plasma in ein Kryoröhrchen gegeben und maximal einen Monat eingefroren.

Zur Rekultivierung wurden die Zellen aufgetaut, in 15 ml IMDM aufgenommen und zentrifugiert (400 x g; 5 min; 4°C). Danach wurden sie zur weiteren Kultur in Medium aufgenommen.

#### **2.1.4 Gewinnung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)**

Die Gewinnung von PBMC aus „Buffy-Coats“ erfolgte mittels Dichtezentrifugation. Hierzu wurde das Blut in einem Verhältnis von 1:3 mit warmen PBS in ein 50 ml Zentrifugenröhrchen gegeben auf ein Endvolumen von 35 ml. Das verdünnte Blut wurde anschließend mit 10 ml Ficoll 1.077 unterschichtet und zentrifugiert (700 x g; 20 min; 20°C; ohne Bremse). Durch die Dichte des Ficolls kommt es bei dieser Zentrifugation zur Trennung der einzelnen Zellfraktionen

Granulozyten und Erythrozyten, die eine höhere Dichte besitzen, befinden sich unterhalb der Ficoll-Lösung, die übrigen Zellen (Lymphozyten, Monozyten, Thrombozyten) mit einer geringeren Dichte befinden sich als trübe Interphase oberhalb der Ficoll-Lösung. Oberhalb der Interphase ist das zellfreie Plasma, das für die Zellkultur abgenommen und inaktiviert wurde (30 min; 56°C). Anschließend wurde das nun inaktive Plasma zentrifugiert (1500 x g; 5 min; 4°C), um ausgefallene Proteine abzutrennen. Die Interphase wurde vorsichtig abgenommen und jeweils 20 ml der Suspension mit 30 ml 4°C kaltem PBS verdünnt und dann zentrifugiert (600 x g; 5 min; 4°C). Daraufhin wurden die Zellen zweimal gewaschen mit je 50 ml 4°C kaltem PBS (400 x g; 5 min; 4°C), wobei die Thrombozyten weitgehend entfernt wurden.

## **2.1.5 Zellseparation und Kultivierung allergengepulster dendritischer Zellen**

### **2.1.5.1 Isolation von Monozyten**

Da Monozyten sehr schnell an Plastik adhären, können sie von den Lymphozyten, die nur schwach adhären, abgetrennt werden. Zur Durchführung dieser sogenannten Kurzzeitadhärenz wurde in jede Vertiefung einer 6-Well-Platte 2 ml IMDM mit 3% autologem Plasma vorgelegt und für 5 min präinkubiert. Danach erfolgte die Zugabe von  $1 \times 10^7$  PBMC in jede Vertiefung. Anschließend erfolgte eine 45 minütige Inkubation im Brutschrank. Danach wurde das Medium abgesaugt und die Vertiefung jeweils dreimal mit 37°C warmen PBS gespült. Dabei wurden Lymphozyten und Thrombozyten aus der Vertiefung entfernt, die stark adhärenen Monozyten verblieben auf der Platte und wurden weiter in Kultur genommen.

### **2.1.5.2 Kultivierung allergengepulster dendritischer Zellen**

Dendritische Zellen wurden nach einem modifizierten Protokoll von *Romani et al.* aus Monozyten gezüchtet.<sup>102</sup> Die durch Kurzzeitadhärenz gewonnenen Monozyten wurden in 3 ml IMDM Medium pro Vertiefung einer 6-Well-Platte, unter Zugabe von 1% autologem Plasma, 1000 U/ml IL-4 und 200 U/ml GM-CSF, kultiviert. An Tag 3 wurden aus jeder Vertiefung 850 µl Medium abgenommen und durch 1 ml frisches Medium mit 1% autologem Plasma, 1000 U/ml IL-4 und 200 U/ml GM-CSF ersetzt. Nach sechs Tagen wurden die Zellen nach dem gleichem Schema behandelt. Zudem wurden die dendritischen Zellen zu diesem Zeitpunkt mit den Allergenen gepulst. Zur vollständigen Ausreifung der dendritischen Zellen erfolgte die Zugabe des proinflammatorischen „Zytokin-Cocktails“ IL-1 $\beta$  (2000 U/ml), TNF- $\alpha$  (1000 U/ml) und PGE<sub>2</sub> (1 µg/ml). Dadurch wurde die vollständige Ausreifung der dendritischen Zellen induziert.

## **2.2 Immunologische Methoden**

### **2.2.1 Durchflußzytometrie**

Bei der Durchflußzytometrie (FACS = „fluorescence activated cell sorter“) werden die Zellen in einer dünnen Glaskapillare einzeln an einem Argonlaserstrahl der Wellenlänge 488 nm vorbeigeleitet. Dabei emittieren die an den Zellen gebundenen Fluoreszenzfarbstoffe Licht, welches durch zwei Fotosensoren, mit Filtern für bestimmte Wellenlängen, gemessen wird. Der Sensor FL-1, mit einem Filter von 530nm, misst das emittierte Licht des Fluoresceinderivates Dichlortriazinyl-aminofluorescein (DTAF). Der Sensor FL-2 mit einem Filter von 585 nm misst das emittierte Licht von Phycoerythrin (PE). Dadurch ist es möglich, zwei Oberflächenmoleküle in einer Messung zu charakterisieren. Durch das Messen des Lasers in Strahlrichtung (Sensor FSC) wird zusätzlich die Größe der Zelle und durch die Bestimmung der gestreuten Strahlung (Sensor SSC) wird die Granularität der Zelle erfasst.

Für die Durchführung der Immunfluoreszenz-Markierung wurden pro Ansatz bis zu  $1 \times 10^6$  Zellen in einem Rundbodenröhrchen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und pelletiert (400 x g; 5 min; 4°C). Anschließend erfolgte die Zugabe von 30 µl des Primärantikörpers (5 µg/ml) und eine 20 minütige Inkubation bei 4°C. Daraufhin wurden die Zellen mit 750 µl FACS-Puffer gewaschen und im Fall der indirekten Färbung mit 30 µl des sekundären Antikörpers (5 µg/ml) für weitere 20 min inkubiert. Nach erneutem Waschen wurden die Zellen in 250 µl FACS-Puffer aufgenommen und gemessen.

### **2.2.2 Bestimmung der Zytokinproduktion mittels ELISA**

Die Bestimmung der Zytokine in den Überständen erfolgte mittels ELISA („enzyme linked immunosorbent assay“). Bei dieser Methode wird ein monoklonaler Antikörper, der spezifisch für das nachzuweisende Protein ist, am Boden der Vertiefung einer 96-Well-Platte immobilisiert. Die restliche Oberfläche wird mit Protein (bovines Serumalbumin) abgedeckt. Nun wird der Überstand, der untersucht werden soll, in die Vertiefung gegeben. Der am Boden der Vertiefung festgesetzte Antikörper bindet

das Protein im Überstand, so dass es bei den folgenden Waschsritten nicht ausgewaschen werden kann. Anschließend wird ein biotinylierter Sekundärantikörper zugegeben, der an ein anderes Epitop des Proteins bindet. Durch Waschen werden nicht gebundene, überflüssige Antikörper entfernt. Daraufhin wird Streptavidin, welches an Peroxidase gekoppelt ist und das an Biotin bindet, zugegeben. Nach erneutem Waschen der Platte wird eine Substratlösung (ABTS) mit  $H_2O_2$  zugegeben. Das  $H_2O_2$  wird durch die Peroxidase gespalten und bewirkt dadurch eine Oxidation des ABTS. Dadurch entsteht ein Farbumschlag nach grün, welcher photometrisch, bei einer Wellenlänge von 415 nm, gemessen werden kann. Der Farbumschlag ist proportional zur Menge des gebundenen Sekundärantikörpers.

Für die Bestimmung der Zytokine wurde eine 96-Well-Maxisorpplatte mit 50  $\mu$ l Primärantikörper pro Vertiefung (2  $\mu$ g/ml in Natriumphosphatpuffer, pH 9, Ausnahme: IL-12 mit 8  $\mu$ g/ml in Natriumphosphatpuffer, pH 6) gegeben und über Nacht bei 4°C inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte zweimal mit PBS gewaschen und anschließend 200  $\mu$ l PBS 1% BSA in jede Vertiefung für zwei Stunden bei 37°C zugegeben. Daraufhin wurde zweimal mit PBS gewaschen, und dann die Kulturüberstände und die, in einer 1:2 Verdünnung titrierten Standards und reines Medium als Leerwert auf die Platte gegeben (100  $\mu$ l/Vertiefung). Es folgte eine Inkubation über Nacht bei 4°C und danach vier Waschsritte. Daraufhin wurden 100  $\mu$ l des biotinylierten Sekundärantikörpers (1  $\mu$ g/ml in PBS 0.1% BSA) zugegeben und die Platte für eine Stunde bei 37°C inkubiert. Nach sechs Waschsritten und der Zugabe von 100  $\mu$ l Peroxidase-gekoppeltem Streptavidin (0.5  $\mu$ g/ml) folgte eine 30 minütige Inkubation und acht Waschsritte. Anschließend wurden 100  $\mu$ l der Substratlösung pro Vertiefung zugegeben. Nach 30 bis 60 Minuten wurde die Extinktion bei 405 nm gemessen, wobei die maximale Extinktion den Wert von 2.6 nicht überschreiten durfte. Von den gemessenen Werten wurde die Extinktion des Leerwertes abgezogen. Mit Hilfe der „Microplate Manager“ Software wurde eine Eichgerade erstellt und die Konzentration der Kulturüberstände bestimmt.

## **2.3 Molekularbiologische und Proteinbiochemische Methoden**

### **2.3.1 SDS-PAGE**

Die SDS-PAGE (Natriumdodecylsulfat Polyacrylamid Gelelektrophorese) dient zur elektrophoretischen Auftrennung von Proteingemischen nach der molekularen Größe. Die hier verwendete diskontinuierliche SDS-PAGE wurde unter Verwendung eines Sammel- und eines Trenngels nach der Methode von Lämmli 1970 durchgeführt.<sup>103</sup>

Hierfür wurden  $1,5 \times 10^6$  Zellen pelletiert (400 x g; 5 min; 4°C) und das Pellet in 50 µl Lysepuffer resuspendiert und für 30 min auf Eis inkubiert. Die im Lysepuffer enthaltenen Proteaseinhibitoren verhindern eine Degradierung der Zellen durch eigene Proteasen. Durch Zentrifugation (15000 x g; 10 min; 4°C) wurden die Zellfragmente abgetrennt und der Überstand abgenommen. Die Proteinkonzentration des Überstandes wurde mit dem BCA Protein Assay Kit (Pierce, Rockford, IL, USA) laut Angaben des Herstellers gemessen.

Um die Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine aufzubrechen, wurden maximal 50 µl (entsprechend 150 µg) des Lysates mit 1/3 Volumen SDS- und mercaptoethanolhaltigem Ladepuffer (Rotiload), 4-fach konzentriert, gemischt und für 5 min gekocht. Dabei lagert sich das SDS an das Protein und überdeckt die elektrische Ladung des Proteins mit einer stark negativen Ladung.

Das Lysat wurde nun auf ein 15% Polyacrylamidgel aufgetragen, welches nach der Methode von Lämmli, 1970 hergestellt wurde. Zusätzlich wurde noch 10 µl eines Molekulargewichtsmarkers (Rainbow Molecular Weight Marker, Amersham, Braunschweig) mitaufgetragen, um das Molekulargewicht der Proteine bestimmen zu können. Die Elektrophorese wurde für 3 h bei 45 mA durchgeführt.

### **2.3.2 Western-Blot (Semi-Dry)**

Nach der in 2.3.1. aufgeführten SDS-PAGE wurden die Proteine auf die Polyvinylidenfluorid-Membran durch einen Elektrotransfer überführt. Dazu wurde die Membran 30 sec mit Methanol gespült und im Anodenpuffer mit 10% Methanol für 5 min äquilibriert. Nachdem die Elektrophorese beendet war, wurde das Sammelgel

abgetrennt und der Blot nach folgendem Schema in der Trans-Blot SD Transfer Kammer aufgebaut:

Kathode

4 Stücke Whatmanpapier mit Kathodenpuffer benetzt

Trenngel

Polyvinylidenfluorid-Membran

4 Stücke Whatmanpapier mit Anodenpuffer benetzt

Anode

Es wurde eine Spannung von 250 mA für 45 min angelegt, dabei wandern die negativ geladenen Proteine zur Anode und binden an die Polyvinylidenfluorid-Membran.

Die Detektion der spezifischen Proteine erfolgte mit den in Tabelle genannten Primärantikörpern. Um freie Stellen auf der Membran abzudecken, wurde sie mit Rotiblock für 30 Minuten bei RT unter leichtem Schütteln (60 upm) geblockt. Anschließend wurde die Membran in PBST gewaschen und anschließend mit 4 ml des Primärantikörpers, 1:1000 in Rotiblock verdünnt, in eine Plastikfolie eingeschweißt und über Nacht bei 4°C auf dem Schüttler mit 60 upm inkubiert. Danach wurde die Membran fünfmal in PBST gewaschen (2 x 15 sec, 3 x 10 min) und dann mit 5 ml Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (verdünnt 1:5000 in Rotiblock) für 60 min inkubiert. Nach der Inkubation wurde die Membran erneut fünfmal gewaschen.

Die Detektion erfolgte durch die Zugabe der ECL+ Detektionslösung, die von der Peroxidase umgesetzt wurde und hierbei Licht emittierte. Hierfür wurden die beiden Komponenten des ECL+ Detektions-Kits zu einem Gesamtvolumen von 2 ml 40:1 gemischt. Die abgetropfte Membran wurde für 1 min mit der Lösung benetzt, das überschüssige Substrat durch Abtropfen entfernt und in einer Plastikfolie eingeschweißt. Die fluoreszierenden Banden wurden auf dem aufgelegten Röntgenfilm als schwarze Banden nach dem Entwickeln sichtbar.

### 2.3.3 Limulus-Amöbocytenlysate-Test

Der Limulus-Amöbocytenlysate-Test (LAL-Test) ist eine Methode für die Quantifizierung von LPS in Extrakten oder Lösungen, die für Zellkulturen eingesetzt werden. Der Test erfolgte in dieser Arbeit mit dem sensitiven QCL-1000 von Cambrex, Walkersville, USA. Bis auf die Verwendung einer anderen Standardreihe (höchste Konzentration: 1 ng/ml LPS (Sigma-Aldrich)) wurde der LAL-Test nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

### 2.3.4 Isolierung der Gesamt-RNA aus dendritischen Zellen

Die Isolierung der Gesamt RNA aus dendritischen Zellen erfolgte mit Hilfe des RNeasy Mini Kits (Qiagen, Hilden). Mit diesem Kit konnte zelluläre RNA  $\geq 200$  Nukleotide isoliert werden. Die Zellen wurden hierbei in Gegenwart einer Guanidinisothiocyanat- (GITC-) Lösung lysiert und mittels Spritze und Kanüle durch mehrmaliges Aufziehen homogenisiert. GITC ist ein chaotropes Salz, welches sehr effektiv Proteine - inklusive RNasen - denaturiert und inaktiviert. Durch die Zugabe von Ethanol wurden die entsprechenden Bindungsbedingungen für das Auftragen des Zellysats auf eine Zentrifugation-Säule mit Silicamembran (Bindekapazität 100  $\mu\text{g}$  RNA) hergestellt. Die RNA adsorbierte an die Membran und das restliche Zellmaterial wurde effizient durch Waschschriffe entfernt. Die genaue Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers. Abschließend wurde die isolierte RNA in 50  $\mu\text{l}$  RNase freiem Aqua dest. aufgenommen. Die Lagerung erfolgte bei  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### 2.3.5 Bestimmung der Reinheit und Konzentration der RNA

Die Konzentration der isolierten RNA erfolgte photometrisch in Einmal-Küvetten bei einer Wellenlänge von 260 nm im Biophotometer (Eppendorf).

Eine optische Dichte OD (Extinktion) von 1 entspricht einer RNA-Menge von 40  $\mu\text{g}$ .

Die Konzentration der RNA wurde nach folgender Formel berechnet:

$$x \mu\text{g RNA/ml} = \text{OD}_{260} * 40 \mu\text{g/ml RNA}$$

Der Reinheitsgrad der isolierten RNA wurde anhand des Quotienten  $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$  ermittelt und sollte zwischen 1,8 und 2,0 liegen.



### 2.3.6 RT-PCR

Um das Genexpressionsmuster der dendritischen Zellen zu untersuchen wurde die „two-step“ RT-PCR (Reverse Transkriptase – Polymerasenkettenreaktion) als Methode gewählt. Die Methode gliedert sich in 2 Schritte, wobei in einem ersten Schritt die Reverse Transkription der mRNA (messenger Ribonukleinsäure) in cDNA (komplementäre Desoxyribonukleinsäure) erfolgte. Anschließend wurde die spezifische Amplifikation der zu untersuchenden Gene in der PCR durchgeführt.

#### 2.3.6.1 Reverse Transkription

Die Reverse Transkription erfolgte mit Hilfe des Sensiscript Kits (Qiagen, Hilden). Die unter 2.3.5 beschriebene Quantifizierung der RNA gewährleistete das Einsetzen gleicher Mengen an RNA innerhalb eines Probanden. Es wurden maximal 13 µl RNA für die Reaktion eingesetzt.

Die spezifische Transkription der mRNA in cDNA wurde durch das Einsetzen der Oligo-dT-Primer (Perkin Elmer, Boston, USA) erreicht. Die Reaktion selbst erfolgte nach Angaben des Herstellers für 1 h bei 37°C. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20°C.

#### RT-Ansatz:

|                   |                 |
|-------------------|-----------------|
| Puffer 10x        | 2µl             |
| dNTP's            | 2 µl            |
| Oligo-dT-Primer   | 2µl             |
| Sensiscript RT    | 1 µl            |
| RNA               | 13µl maximal    |
| <u>Aqua dest.</u> | <u>ad 20 µl</u> |
| Gesamtvolumen     | 20 µl           |

#### 2.3.6.2 PCR

Zur Bestimmung der Genexpression wurde die PCR mit Hilfe des HotStarTaq Mastermix Kit der Firma Qiagen durchgeführt. Die verwendeten Primer sind unter 1.1.5.1 aufgeführt.

PCR-Ansatz:

|                      |        |
|----------------------|--------|
| HotStarTaq Mastermix | 25 µl  |
| Forward Primer       | 0,5 µl |
| Reverse Primer       | 0,5 µl |
| cDNA                 | 2 µl   |
| H <sub>2</sub> O     | 22 µl  |
| Gesamtvolumen        | 50 µl  |

Dieser Ansatz wurde für alle zu untersuchenden Gene benutzt, mit Ausnahme des Gens SOCS1. Aufgrund des hohen GC-Gehaltes von 85% des zu amplifizierenden Genbereiches wurde dem PCR Ansatz noch 1 µl DMSO zugefügt. Als Negativkontrolle wurde eine Wasserprobe (2 µl H<sub>2</sub>O statt cDNA) mitgeführt um eine Kontamination der Einzelkomponenten und somit eine unspezifische Amplifikation kontrollieren zu können.

PCR-Programm:

|                            |      |        |
|----------------------------|------|--------|
| 1. Hot Start               | 96°C | 15 min |
| 2. Denaturierung           | 94°C | 1 min  |
| 3. Annealing               | 55°C | 1 min  |
| 4. Elongation              | 72°C | 30 sec |
| 5. 30x zurück zu Schritt 2 |      |        |
| 6. Finale Elongation       | 72°C | 10 min |
| 7. Ende                    | 4°C  | ∞      |

**2.3.6.3 Agarose-Gelelektrophorese**

Agarose-Gelelektrophorese ist die Standardmethode zum Auftrennen, Charakterisieren und Reinigen von DNA-Fragmenten. Sie beruht auf Wanderungseigenschaften der negativ geladenen DNA-Moleküle in einem Feld konstanter, elektrischer Spannung, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur angelegten Spannung ist.

Die Migrationseigenschaften der Moleküle werden sowohl von ihrer Größe ( $-\log_{10}$  MW), als auch vom Salzgehalt des Puffers und der Beschaffenheit der Gelmatrix bestimmt.

Die Trägermatrix besteht aus Agarose, einem aus Algen gewonnenen linearen, neutralen Polysaccharid. Die Wahl der geeigneten Agarosekonzentration ermöglicht die Auftrennung von Fragmenten in einem Bereich von 0,1-50 kb.

Die DNA wird im Gel durch interkalierende Fluoreszenzfarbstoffe, wie zum Beispiel Ethidiumbromid (EtBr), gefärbt. Durch Anregung des Farbstoffs mit UV-Licht der Wellenlänge 302 nm ist es möglich, die DNA-Banden im Gel sichtbar zu machen.

Die Agarose (2%, Biorad) wurde in 1xTAE-Puffer aufgekocht, bis die Lösung klar und schlierenfrei war. Nach Abkühlen auf „Handwärme“ wurde sie in die Gelform gegossen. Nach Erkalten wurde der Kamm gezogen und das Gel in die Gelkammer überführt.

Als Laufpuffer wurde 1xTAE-Puffer verwendet; der Gelladepuffer, sowie der DNA-Größenmarker Gene-Ruler 100bp Ladder Plus stammten von der Firma MBI Fermentas, St. Leon-Rot und wurden nach Angaben des Herstellers verwendet.

### **2.3.6.4 Färbung und Auswertung der Gele**

Nach der Elektrophorese wurden die Gele 15 bis 30 Minuten in EtBr (0,5 $\mu$ g EtBr/ml) gefärbt. Die Auswertung und Dokumentation erfolgte unter einem Transilluminator (Model TC-312A Transluminator 312nm, Spectroline, Westbury, NY, USA) mit einer Digitalkamera Camedia C3040 Zoom (Olympus, Hamburg). Als Steuersoftware wurde hier das Programm Argus X1, Ver. 2.2.8, Biostep, Jahnsdorf verwendet.

### **2.3.7 Quantitative Real-Time-PCR**

Die quantitative Real-Time-PCR ist eine hocheffiziente Methode zur spezifischen und quantitativen Messung einer Nukleinsäuresequenz, die eine Detektion eines PCR-Produkts in Echtzeit ermöglicht. Zur quantitativen Untersuchung der Genexpression in dendritischen Zellen wurde die Real-Time-PCR unter Benutzung des Quantitect SYBR Green PCR Kits der Firma Qiagen und der unter 1.1.5.2 aufgeführten Primer

in dem LightCycler der Firma Roche durchgeführt. Die Datenerhebung erfolgte durch die LightCycler-Software 3.53.

### **2.3.7.1 Aufbau und Funktionsweise des LightCycler Instruments**

Das LightCycler Instrument besteht aus einem Thermocycler in Verbindung mit einer optischen Einheit. Im Gegensatz zum Heizblock der konventionellen PCR wird hier Raumluft durch einen kleinen Ventilator in das Instrument und dort über eine Heizspirale geleitet und erwärmt. Bedingt durch die geringe Wärmekapazität der Luft ermöglicht dies eine sehr schnelle Temperaturänderung des Probenmaterials von bis zu 20°C/Sekunde mit einer Genauigkeit von  $\pm 0,3^\circ\text{C}$ . Außerdem befindet sich in dieser Einheit das Probenkarusell, in dem 32 Borosilikat-Glaskapillaren mit einem Probenvolumen von je 20  $\mu\text{l}$  Platz finden. Das große Verhältnis Oberfläche zu Volumen der Glaskapillaren begünstigt dabei ebenfalls die kurze Zyklendauer durch rasches Aufheizen und Abkühlen der Proben in den Kapillaren. Ein Motor im Probenkarusell bringt die einzelnen Kapillaren in die korrekte Position zur optischen Einheit, welche über Photodioden die Fluoreszenz, die von der Spitze der Kapillare ausgeht, misst und somit die PCR-Produkte detektiert. Die Messzeit pro Kapillare liegt bei 20 Millisekunden.

### **2.3.7.2 Detektion der PCR-Produkte**

Die Detektion der PCR-Produkte erfolgte durch das verwendete SYBR Green PCR Kit der Firma Qiagen. SYBR Green ist ein Cyaninfluoreszenzfarbstoff, der sich durch eine hohe Spezifität für doppelsträngige DNA auszeichnet. Die maximale Anregung des Farbstoffs liegt bei 497 nm; durch das Interkalieren in doppelsträngiger DNA kommt es zu einer Emission von Licht mit einer Wellenlänge von 520 nm.

Während der verschiedenen Phasen der PCR variiert die Fluoreszenz in Abhängigkeit von der Menge an doppelsträngiger DNA. Während der Annealing-Phase hybridisieren die Primer an ihrer Zielsequenz und es entstehen kleine Bereiche doppelsträngiger DNA und damit einhergehend kommt es zu einem Anstieg der Fluoreszenz. In der darauf folgenden Elongations-Phase formiert sich nun noch mehr doppelsträngige DNA, in die sich der Farbstoff einlagern kann. Am Ende dieses

PCR-Schrittes liegt nun alle DNA doppelsträngig vor und die maximale Menge an SYBR Green interkaliert in der DNA. Zu diesem Zeitpunkt wird die Fluoreszenz im vorhandenen System mittels der optischen Einheit bei 530nm in jedem einzelnen PCR-Zyklus gemessen und über die Software die gemessene Fluoreszenz gegen die Zyklenzahl dargestellt. Der Verlauf der PCR lässt sich dabei in drei Phasen einteilen: in eine frühe Phase, eine exponentielle Wachstumsphase und eine Plateau-Phase. In der frühen Phase übertreffen Hintergrundsignale diejenigen des PCR-Produktes. Abhängig von der initialen Menge an Template-DNA im Reaktionsansatz heben sich nach einer bestimmten Zyklenzahl die Fluoreszenzsignale des PCR-Produkts statistisch signifikant von denen des Hintergrunds ab. Diese Schwelle wird von der Software determiniert, der sogenannte Cycle-Threshold-Value ( $C_T$ ) ist definiert als die Zyklenzahl, bei der das Fluoreszenzsignal die Schwelle überschreitet. Über die  $C_T$ -Werte lassen sich so vergleichende quantitative Aussagen über die Ausgangsmenge an Ziel-DNA machen.

### 2.3.7.3 PCR-Ansatz und Zyklusbedingungen

Die als Matrize verwendete cDNA wurde wie unter 2.3.6.1 beschrieben generiert. Alle PCR-Reaktionen wurden als Doppelbestimmungen durchgeführt. Zusätzlich wurde als Negativkontrolle eine Wasserprobe mitgeführt, um eine Kontamination der Einzelkomponenten und somit eine unspezifische Amplifikation zu erkennen.

#### PCR-Ansatz:

|                          |            |
|--------------------------|------------|
| SYBR Green PCR Mastermix | 10 $\mu$ l |
| Quantitect Primer Assay  | 2 $\mu$ l  |
| cDNA                     | 2 $\mu$ l  |
| H <sub>2</sub> O         | 6 $\mu$ l  |
| <hr/>                    |            |
| Gesamtvolumen            | 20 $\mu$ l |

PCR-Programm:

1. Hot Start            96°C (20°C/sec)    15 min
2. Denaturierung    94°C (2°C/sec)    15 sec
3. Annealing        55°C (2°C/sec)    20 sec
4. Elongation        72°C (2°C/sec)    20 sec, anschließend Fluoreszenzmessung
5. 45x zurück zu Schritt 2
6. Schmelzkurve
7. Ende

Im Anschluß an die eigentliche PCR erfolgte eine Schmelzkurvenanalyse in einem Temperaturbereich von 60°C bis 95°C mit 2°C/sec. Dieses gewährleistete eine Spezifitätskontrolle des PCR-Produktes.

**2.3.7.4 Relative Quantifizierung ( $\Delta\Delta C_T$ -Methode)**

Alle Test- und Basiswerte der Proben werden zur relativen Quantifizierung der Expression auf die Expressionsrate von einem Referenzgen bezogen, um biologische Variationen bei der Ergebnisinterpretation zu berücksichtigen. Sogenannte „Housekeeping Genes“ sind essentiell für den Erhalt der Zellfunktion, werden ubiquitär exprimiert und deren Transkription wird nicht von experimentellen Bedingungen beeinflusst.<sup>104</sup> In der vorliegenden Arbeit wurde als Referenzgen das  $\beta$ -Aktin eingesetzt.

Die gemittelten  $C_T$ -Werte einer Probe werden zur Bestimmung der Expressionsrate des „gene of interest“ (GOI) mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode zur relativen Quantifizierung untersucht.<sup>105</sup> Bei diesem Berechnungsschema wird der gemittelte  $C_T$ -Wert des zu untersuchenden Gens jeder Probe zunächst gegen den gemittelten  $C_T$ -Wert des Referenzgens normalisiert. Anschließend werden die normalisierten  $C_T$ -Werte des GOI unterschiedlicher Proben miteinander verglichen, um die Abweichung in der Expressionsrate zwischen den Proben zu ermitteln.

Unter Annahme einer Verdopplung der Produktmenge pro PCR-Zyklus gilt theoretisch für die PCR folgender Zusammenhang zwischen Produktmenge  $N$  und der Zyklenzahl  $z$  in Abhängigkeit von der eingesetzten Ausgangsmenge  $N_0$ :

$$N = N_0 * 2^z$$

Die relative Quantifizierung – ausgedrückt in der x-fachen Expression – lässt sich nun über folgende Formel berechnen:

$$\frac{2^{(\Delta C_{T\_Testgen})}}{2^{(\Delta C_{T\_Referenzgen})}} = \frac{2^{(C_{T\_Basisprobe\_Testgen} - C_{T\_Testprobe\_Testgen})}}{2^{(C_{T\_Basisprobe\_GOI} - C_{T\_Testprobe\_GOI})}} = \text{Expression}(x\text{-fach})$$

### 2.3.8 Microarray Analysen

In Zusammenarbeit mit der HDMA (High Density Micro Array) Core Facility der Johannes Gutenberg-Universität Mainz wurden dendritische Zellen auf Ihre spezifische Genexpression von insgesamt 22.283 Genen untersucht.

Hierzu wurden an Tag 6 der Kultur jeweils drei Vertiefungen dendritischer Zellen mit dem Gräserpollenextrakt in einer Konzentration von 10 µg/ml beziehungsweise der respektiven Menge an LPS (50 ng/ml) gepulst. Die Zellen wurden nach einer Inkubationszeit von einer Stunde geerntet und die RNA, wie unter 2.3.4 beschrieben, isoliert. Die gewonnenen Mengen an RNA wurden nach 2.3.5 quantifiziert und bei einer Mindestausbeute von 10 µg Gesamt-RNA für die Microarray Analyse eingesetzt. Unter den vom Hersteller angegebenen Standardbedingungen wurden die Genechips Affymetrix U133A für die Analyse benutzt. Die Auswertung der Rohdaten erfolgte über die Software GeneChip, eine statistische Analyse der Daten wurde mit dem Programm ArrayAssist der Firma Affymetrix durchgeführt.

## **III Ergebnisse**

### **1 Phänotypische Charakterisierung dendritischer Zellen nach Kontakt mit Proteinallergenen**

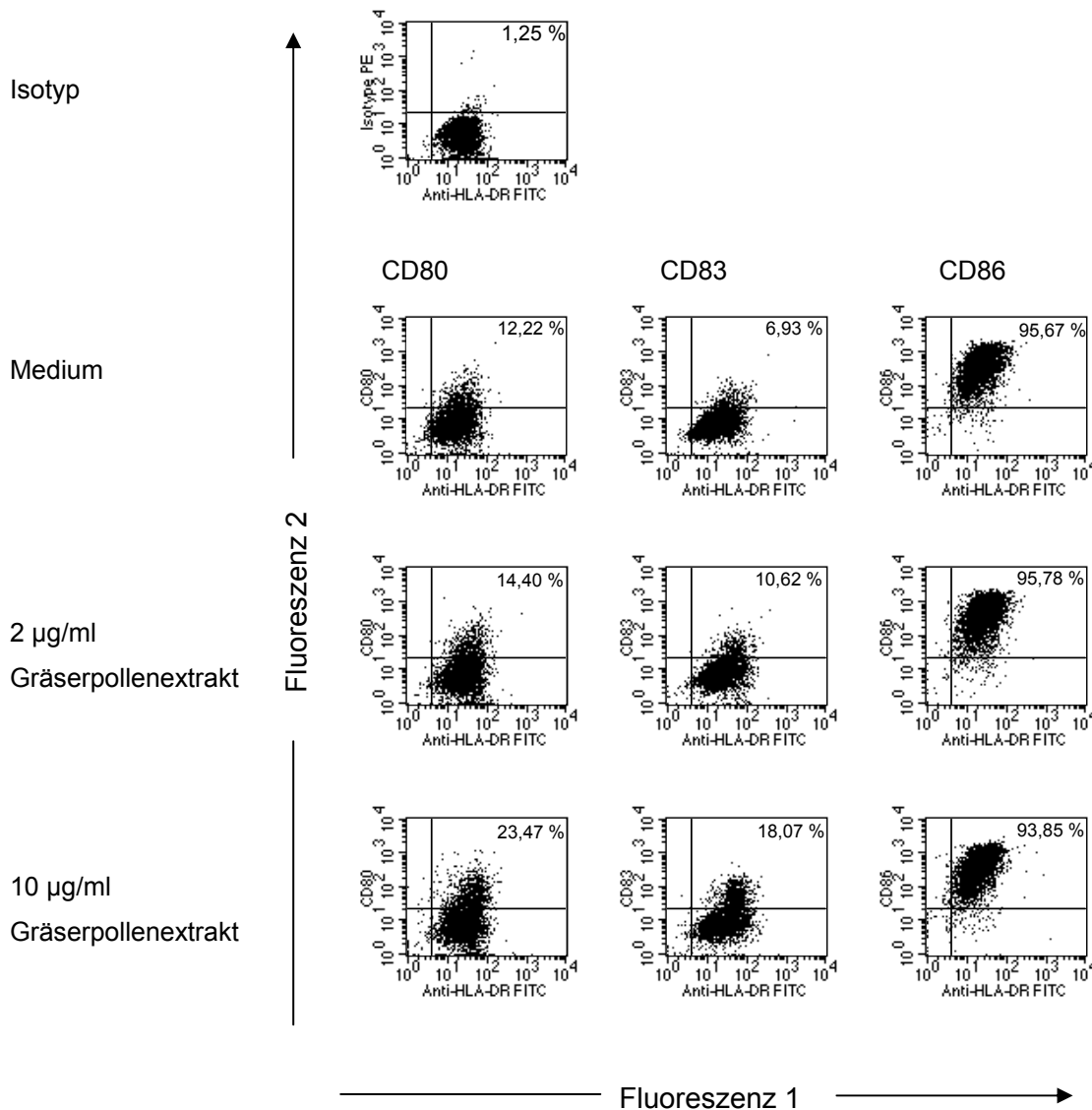
#### ***1.1 Morphologische Veränderungen der dendritischen Zellen im Laufe der Kultur***

Zu Beginn der Kultur zeigten die adhärenenten Monozyten eine längliche ausgebreitete Form. Durch die Zugabe der Wachstumsfaktoren IL-4 und GM-CSF veränderte sich die Morphologie, die Monozyten verloren die Adhärenz, nahmen eine rundliche Form an und entwickelten sich zu unreifen dendritischen Zellen. Unter Einfluss des Ausreifungscocktails, der aus den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$ , sowie PGE<sub>2</sub> besteht, reiften die Zellen aus. Zu beobachten war die Ausbildung der charakteristischen Dendriten sowie eine vollständige Ablösung von dem beschichteten Boden der Zellkulturplatte.

#### ***1.2 Einfluss von Proteinallergenextrakten auf die Oberflächenmarkerexpression von dendritischen Zellen***

Selbst ohne die Zugabe des Ausreifungscocktails zu den dendritischen Zellen zeigten diese im Mikroskop nach Kontakt mit Gräserpollen- bzw. Birkenpollen- oder Milbenallergenextrakt ähnliche morphologische Veränderungen. Um diese näher zu untersuchen, wurden unreife dendritische Zellen an Tag 6 der Kultur mit 10  $\mu\text{g/ml}$  oder 2  $\mu\text{g/ml}$  Gräserpollenextrakt für 48 Stunden inkubiert und anschließend im Durchflußzytometer über eine Doppelfärbung mit den entsprechenden Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenmoleküle und gegen das MHC-Klasse II Molekül HLA-DR analysiert. Die Expression der HLA-DR-Moleküle ist im FL-1-Kanal zu sehen. Der FL-2-Kanal zeigt die Expression der anderen Oberflächenmarker (Abb. 5). Als Kontrolle dienten dendritische Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden.





**Abbildung 5: Phänotyp der dendritischen Zellen nach Kontakt mit Gräserpollen**

Dendritische Zellen wurden wie in 2.1.5.2 beschrieben kultiviert und an Tag 6 mit 10 µg/ml oder 2 µg/ml Gräserallergen gepulst. „Medium“ zeigt unreife dendritische Zellen, die nicht mit Allergen gepulst wurden. Nach 48 Stunden wurde der Phänotyp der Zellen mit Hilfe einer Doppelfärbung im Durchflußzytometer untersucht.

Doppelt positive Zellen befinden sich im oberen rechten Quadranten. In Abhängigkeit von der Konzentration an zugegebenem Gräserpollenextrakt konnte bei den Zellpopulationen eine erhöhte Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 festgestellt werden. CD86, ebenfalls ein kostimulatorisches Molekül, wies unter allen Bedingungen eine gleich hohe Expression auf. Der Marker für reife dendritische Zellen CD83 zeigte ebenfalls eine konzentrationsabhängig erhöhte Expression.

Unreife, humane dendritische Zellen zeigen nach Kontakt mit Gräserpollenallergenextrakt eine beginnende Ausreifung. Diese ist jedoch keineswegs mit der des Ausreifungscocktails zu vergleichen (siehe Abb. 6).

### **1.3 Der Einfluss von bakteriellem Lipopolysaccharid (LPS) auf die Ausreifung der dendritischen Zellen**

Um die zu beobachtende Ausreifung der dendritischen Zellen durch die Zugabe von Gräserpollenallergenextrakt näher zu untersuchen, sollte der Einfluss des in dem Extrakt enthaltenen bakteriellen Lipopolysaccharids (LPS) untersucht werden. So wurde zunächst – wie unter 2.3.3 beschrieben – die Menge an LPS in den Allergenextrakten mittels des Limulus-Amöbocytenlysat-Tests bestimmt. Für die in dieser Arbeit eingesetzten Mengen an Gräserpollenallergenextrakt von 10 µg/ml wurde ein LPS-Gehalt von 50 ng/ml LPS festgestellt.

Unreife dendritische Zellen wurden an Tag 6 der Kultur mit 10 µg/ml Gräserpollenallergenextrakt sowie der respektiven Menge von 50 ng/ml LPS gepulst und für 48 Stunden inkubiert. Die gleichen Ansätze wurden zusätzlich mit 10 µg/ml Polymyxin-B-sulfat versehen. Polymyxin-B ist ein kationisches Antibiotikum, welches LPS bindet und somit Endotoxinwirkungen eliminieren kann. Darüber hinaus wurden dendritische Zellen mit 10 µg/ml und 50 ng/ml LPS gepulst; auch hier wurde ein weiterer Ansatz mit Polymyxin-B-sulfat versehen. Als Kontrollen wurden zum einen dendritische Zellen mitgeführt, die nur mit Medium inkubiert wurden, zum anderen wurden dendritische Zellen benutzt, die mit dem Ausreifungscocktail versehen wurden.

Nach einer Doppelfärbung mit den entsprechenden Antikörpern gegen die verschiedenen Oberflächenmoleküle und gegen HLA-DR wurden die Zellen im Durchflußzytometer analysiert (Abb. 6).

CD83, der Marker für reife dendritische Zellen, steigt durch die Zugabe von Gräserpollenallergenextrakt an; die dendritischen Zellen weisen einen reiferen Phänotyp auf. Zugabe der respektiven Menge an LPS zu den Zellen führt sogar zu einer noch höheren Expression des Markers. Somit lässt sich nun vermuten, dass die Ausreifung der dendritischen Zellen ein Effekt ist, der auf das enthaltene LPS zurückzuführen ist. Bestätigung findet diese Annahme durch die Tatsache, dass

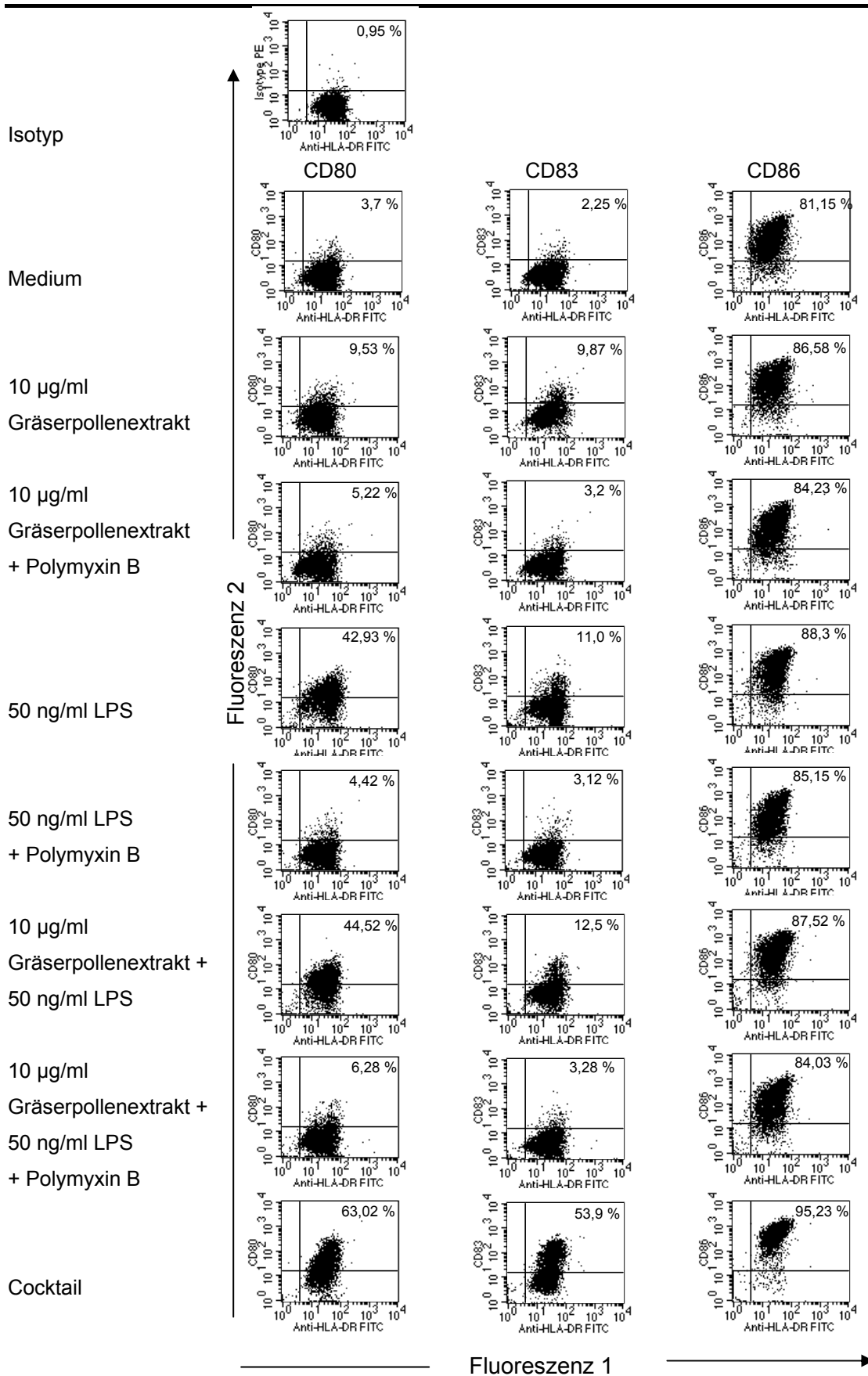


Abbildung 6: Einfluss von LPS auf den Phänotyp der dendritischen Zellen

Dendritische Zellen wurden wie in 2.1.5.2 beschrieben kultiviert und an Tag 6 mit 10 µg/ml oder 50 ng/ml LPS, sowie mit und ohne Polymyxin-B-sulfat gepulst. „Medium“ zeigt unreife dendritische Zellen, die nicht mit Allergen gepulst wurden. Nach 48 Stunden wurde der Phänotyp der Zellen mit Hilfe einer Doppelfluoreszenz im Durchflußzytometer untersucht.

die Expression von CD83 durch die gleichzeitige Gabe von Polymyxin-B-Sulfat mit entweder Gräserpollen oder LPS auf nahezu den Mediumwert reguliert wird.

Die gleichzeitige Zugabe von LPS und Gräserpollenextrakt führt zu einer erhöhten Expression des Markers, allerdings nicht in einem höheren Maße als durch LPS allein. Polymyxin-B-Sulfat ist auch hier in der Lage, die Ausreifung der dendritischen Zellen zu verhindern.

Betrachtet man die kostimulatorischen Moleküle, fällt bei CD80 auf, dass die Expression dieses Oberflächenmoleküls ähnlich wie CD83 reguliert ist. Die Expression steigt durch Zugabe von sowohl Gräserpollen als auch LPS, sowie durch die Kombination. Polymyxin-B-Sulfat ist auch hier in der Lage die Expression auf nahezu Mediumlevel zu halten. CD86 hingegen ist bei allen Zellen konstitutiv exprimiert.

Die mit dem Ausreifungscocktail behandelten dendritischen Zellen weisen – bedingt durch den starken Stimulus – eine starke Expression aller untersuchten Oberflächenmoleküle auf.

Der Effekt, dass humane dendritische Zellen durch den Kontakt mit Gräserpollenallergenextrakt ausreifen, beruht somit auf der Kontamination des Extraktes mit bakteriellem LPS.

## **2 Proteinexpression der dendritischen Zellen nach Kontakt mit Proteinallergenen**

Um den Einfluss der Proteinallergene auf die in den dendritischen Zellen ablaufenden, den STAT-Molekülen nachgeschalteten, Signaltransduktionsprozesse näher zu charakterisieren, wurde die Proteinexpression der Moleküle SOCS1, SOCS3, GATA3 und T-bet mittels Westernblot untersucht. Hierzu wurden dendritische Zellen eines Probanden nach Standardbedingungen kultiviert und am Tag 7 der Kultur mit 5 µg/ml oder 10 µg/ml Allergenextrakt ohne Zugabe des Ausreifungscocktails gepulst und nach Inkubation für 30 Minuten, 60 Minuten, zwei Stunden, vier Stunden oder sechs Stunden geerntet. Anschließend wurden die dendritischen Zellen wie unter 2.3.1 beschrieben lysiert, der Gesamtproteingehalt bestimmt und die Proben mittels der SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt.

Anschließend erfolgte der unter 2.3.2 beschriebene Westernblot mit anschließender Detektion der oben genannten Proteine.

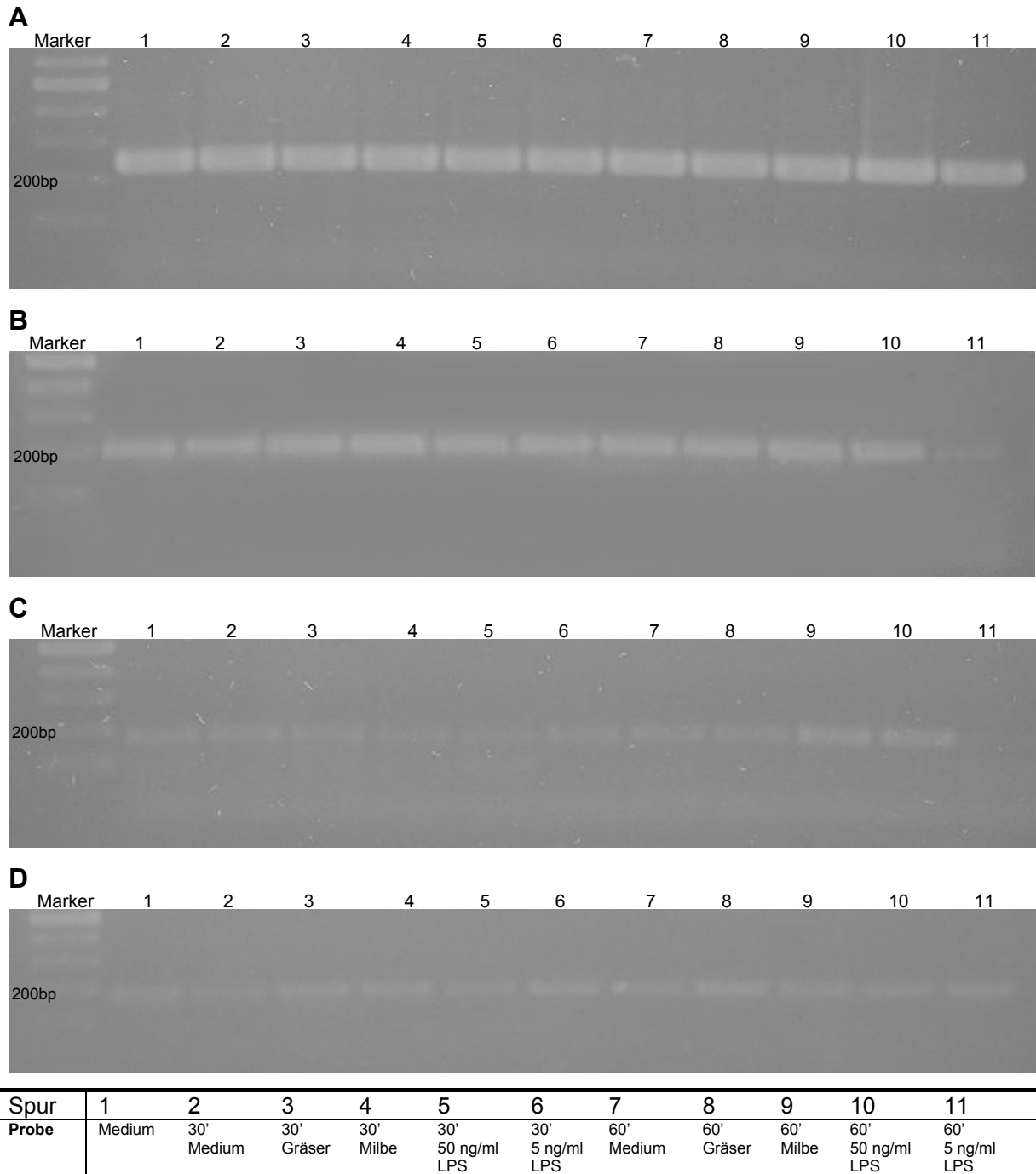
In keinem der insgesamt 23 Versuche konnten die Moleküle SOCS1, SOCS3, GATA3 sowie T-bet eindeutig nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen bezüglich des Einflusses von Proteinallergenen auf die Signaltransduktion in dendritischen Zellen wurden fortan nicht auf Protein- sondern auf Genexpressionsebene analysiert.

### **3 Genexpression dendritischer Zellen mit Hilfe der RT-PCR**

#### **3.1 Genexpression der Moleküle SOCS1, SOCS3, GATA3 und T-bet**

Dendritische Zellen von Gräserallergikern wurden wie beschrieben kultiviert und ohne Zugabe des Ausreifungscocktails an Tag 7 für 30 Minuten oder 60 Minuten mit 10 µg/ml Gräserpollenallergenextrakt beziehungsweise der darin enthaltenen Menge von 50 ng/ml LPS versetzt. Dendritische Zellen wurden außerdem auch mit 10 µg/ml Hausstaubmilbenallergenextrakt – einem Allergen, gegen das keine Sensibilisierung vorlag, gepulst. Der hier verwendete Hausstaubmilbenallergenextrakt wurde zuvor auf den LPS-Gehalt hin im LAL-Assay (siehe 2.3.3) untersucht und die respektive Menge von 5 ng/ml ebenfalls als Kontrolle mitgeführt. Nach Isolation der Gesamt-RNA und anschließender reverser Transkription wurde die gewonnene cDNA als Matrize in der PCR eingesetzt und mittels der unter 1.6.1 aufgeführten Primer auf das Genexpressionsmuster hin untersucht. Hierbei wurde das Gen *β-Aktin* als „Housekeeping gene“ bestimmt um eine gleiche Ausgangsmenge an cDNA und somit eine Vergleichsbasis der Genexpression zu gewährleisten.

Von insgesamt 9 Probanden wurden jeweils 3 unabhängige Versuche durchgeführt; wobei das Gen *GATA3* in keinem Versuch nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 7: Genexpression dendritischer Zellen nach Kontakt mit Proteinallergenen oder LPS**

Dendritische Zellen wurden wie in 2.1.5.2 beschrieben kultiviert und an Tag 7 mit 10 µg/ml Gräserpollenextrakt oder 50 ng/ml LPS, sowie 10 µg/ml Hausstaubmilbenallergenextrakt oder 5 ng/ml LPS gepulst und für 30 oder 60 Minuten inkubiert. Dargestellt ist die Genexpression in **A)** von *β-Aktin* **B)** von *SOCS1* **C)** *SOCS3* sowie **D)** von *T-bet* nach RT-PCR an einem repräsentativen Beispiel. Aufgetragen sind 10 µl des jeweiligen PCR-Ansatzes sowie 7µl des Gene-Ruler 100bp Ladder Plus auf ein Agarosegel (2%).

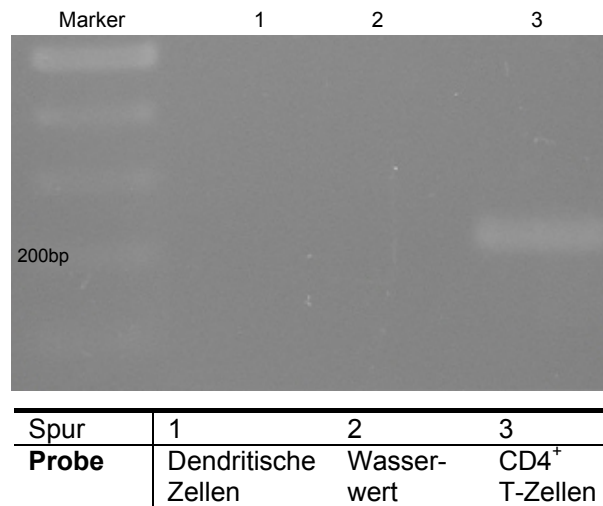
Die zu beobachtenden Unterschiede in der Genexpression fielen in dieser ausgewählten Methode sehr geringfügig aus; ein deutlicher Trend war nicht zuzuordnen und somit eine differenzierte Aussage über die Genexpression in diesem gewählten System nicht möglich (Abb. 7)

Um die Unterschiede tatsächlich quantitativ zu charakterisieren, wurde auf die herkömmliche RT-PCR verzichtet und die Methode der quantitativen Real-Time-PCR als Untersuchungsmethode gewählt (siehe Punkt 4).

### **3.2 Genotypische Kontrolle der dendritischen Zellen**

Die zur Untersuchung der Genexpression dendritischer Zellen gewählte Methode der RT-PCR (Reverse Transkription Polymerase-Kettenreaktion) ist bedingt durch das Prinzip der Amplifikation eines spezifischen Genabschnitts eine sehr sensitive Methode. So ergibt sich die Notwendigkeit einer ebenso sensitiven Überprüfung der Reinheit der isolierten Zellpopulationen. Die visuelle Kontrolle der Kulturen unter dem Lichtmikroskop zum einen, die phänotypische Überprüfung im Durchflußzytometer zum anderen sind gute Ausgangsbedingungen für diese Kontrolle, jedoch sind diese Methoden nicht sensitiv genug, um eine geringe Kontamination der dendritischen Zellen mit T-Zellen und somit falsche Aussagen auszuschließen.

Um dieses zu gewährleisten wurden dendritische Zellen wie beschrieben in Kultur genommen und an Tag 7 der Kultur geerntet. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert, gemessen und anschließend in cDNA revers transkribiert. Das so gewonnene Template wurde anschließend mittels der in 1.6.1 aufgeführten Primer in der PCR eingesetzt und auf die Expression von CD3, einem auf T-Zellen ubiquitär vorkommenden Markers, untersucht. Als Positivkontrolle diente eine CD4-positive T-Zellpopulation.



**Abbildung 8: Kontrolle der Präparation dendritischer Zellen auf Kontaminationen mit T-Zellen**

Dendritische Zellen wurden wie in 2.1.5.2 beschrieben kultiviert und an Tag 7 mittels RT-PCR auf die Expression des ubiquitären T-Zellmarkers CD3 und somit auf Kontaminationen von T-Zellen in der Präparation hin untersucht. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel. Aufgetragen sind 10 µl des jeweiligen PCR-Ansatzes sowie 7µl des Gene-Ruler 100bp Ladder Plus auf ein Agarosegel (2%).

Alle in dieser Arbeit untersuchten Populationen an dendritischen Zellen wiesen keine Genexpression von CD3 und somit keine Kontamination mit T-Zellen auf (Abb. 8).

## 4 Quantitative Real-Time-PCR dendritischer Zellen

### 4.1 Bestimmung der PCR-Effizienz

Um die Berechnungen der Genexpression bei der relativen Quantifizierung wie unter 2.3.7.4 beschrieben durchführen zu können, war es nötig für jeden einzelnen Primer Assay die PCR-Effizienz zu bestimmen, da das Berechnungsmodell nur bei identischen PCR-Effizienzen Gültigkeit besitzt.

Am Cycle Threshold  $C_T$  gilt in Abhängigkeit von der Produktmenge  $N$ , der Ausgangsmenge  $N_0$  und der PCR-Effizienz  $E$ :

$$N_{CT} = N_0 * E^{CT}$$

$$\log N_{CT} = \log N_0 + \log E^{CT} = \log N_0 + C_T * \log E$$

Löst man diese Gleichung nach dem Cycle Threshold auf, so bekommt sie die Form der allgemeinen Geradengleichung  $y = m * x + t$ .



$$C_T = (-1/\log E) * \log N_0 + (-1/\log E) * \log N_{CT}$$

Mit der linearen Abhängigkeit des  $C_T$ -Werts vom Logarithmus der Templatemenge ist somit die Steigung der Geraden abhängig von der Effizienz.

$$m = -1 / \log E$$

$$\log E = -1/m$$

$$E = 10^{(-1/m)}$$

Aus einer cDNA wurde 5-stufig mit einem Verdünnungsfaktor von  $10^{-1}$  eine Verdünnungsreihe hergestellt und jeweils als Doppelbestimmung für jeden Primer Assay in die PCR eingesetzt. Mittels der Software wurde die Effizienz der einzelnen Primer Assays berechnet. Die Ergebnisse für die einzelnen Primer sind in Tabelle 8 dargestellt.

Tabelle 8: PCR-Effizienzen der einzelnen Primer Assays

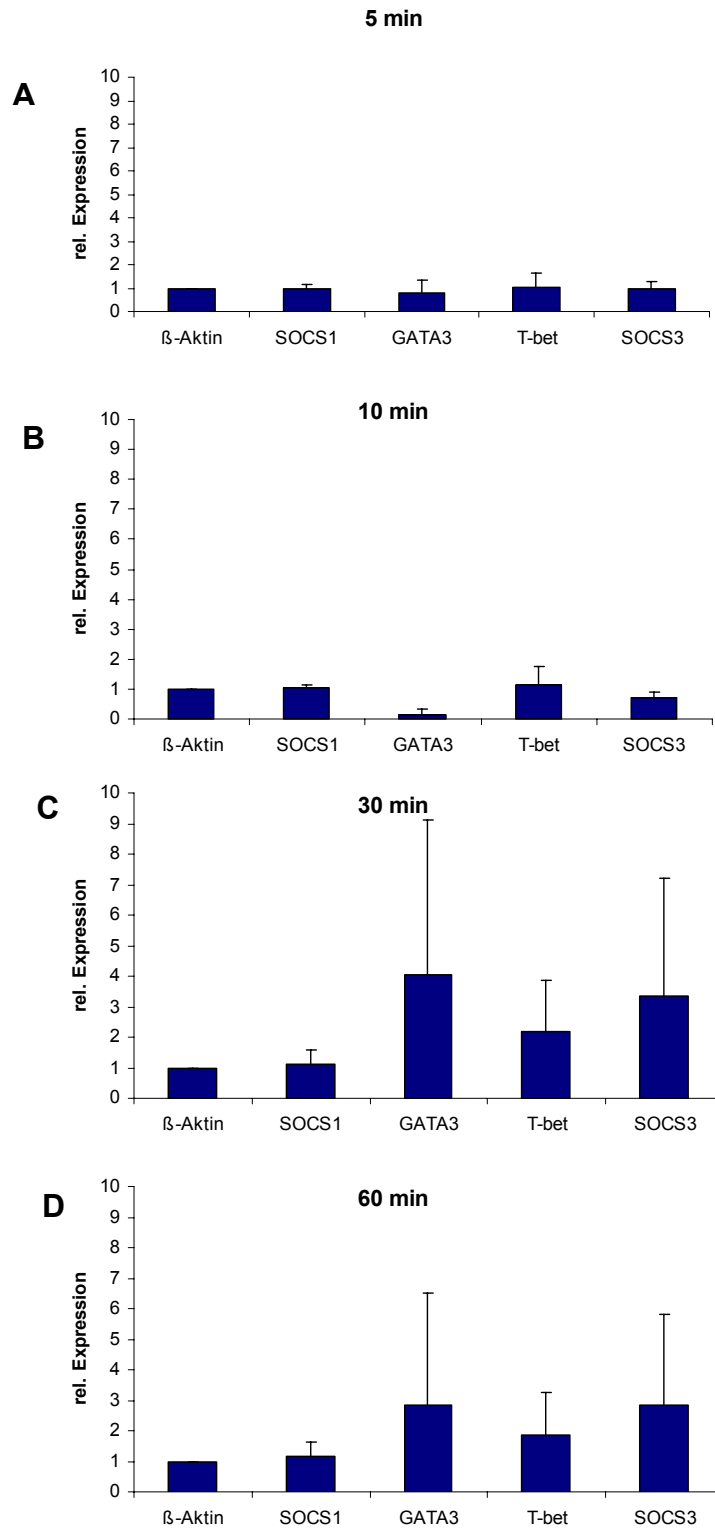
| Gen                             | Effizienz |
|---------------------------------|-----------|
| <i><math>\beta</math>-Aktin</i> | 1,97      |
| <i>SOCS1</i>                    | 1,88      |
| <i>SOCS3</i>                    | 1,94      |
| <i>GATA3</i>                    | 1,99      |
| <i>T-bet</i>                    | 1,96      |

Die Effizienzen der unterschiedlichen PCRs weichen weniger als 5% voneinander ab und sind nahezu identisch. Somit ist eine Berechnung der relativen Quantifizierung nach der unter 2.3.7.4 aufgeführten Gleichung möglich gewesen.

## **4.2 Dendritische Zellen zeigen nach Kontakt mit Proteinallergenen ein $T_H2$ -assoziiertes Genexpressionsprofil**

Unreife dendritische Zellen wurden an Tag 7 der Kultur für 5 min, 10 min, 30 min und 60 min mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Proteinallergenextrakt inkubiert. Hierzu wurden die dendritischen Zellen von Gräser- beziehungsweise Birkenpollenallergikern mit den entsprechenden Allergenextrakten versetzt, geerntet und anschließend die Gesamt-RNA wie unter 2.3.4 beschrieben isoliert. Nachfolgend wurde durch reverse Transkription cDNA hergestellt und diese in der quantitativen Real-Time-PCR als Template eingesetzt. Alle hier dargestellten relativen Expressionen wurden nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode wie unter 2.3.7.4 beschrieben ermittelt. Als Kontrollprobe dienten dendritische Zellen, die nur mit Medium inkubiert wurden.

Betrachtet wurde das Genexpressionsmuster dendritischer Zellen für die Gene *SOCS1*, *SOCS3*, *GATA3* und *T-bet*; als „Housekeeping Gene“ wurde das Gen  $\beta$ -*Aktin* gemessen. Nach fünf Minuten Kontakt zu den Proteinallergengemischen findet keine Regulierung der Genexpression in den dendritischen Zellen statt (Abb. 9A). Nach zehn Minuten Inkubation (Abb. 9B) befindet sich die Genexpression der untersuchten Gene ebenfalls auf gleichem Level, mit Ausnahme von *GATA3*, welches hier herabreguliert ist. Eine deutliche Veränderung der Genregulation findet nach 30 Minuten statt (Abb. 9C). Die der  $T_H2$ -Immunantwort assoziierten Gene *GATA3* und *SOCS3* sind hochreguliert; ebenso *T-bet*, allerdings in weniger starkem Ausmaß. Auch nach 60 Minuten Kontakt der Allergengemische zu den dendritischen Zellen persistiert dieses Genexpressionsmuster (Abb. 9D).



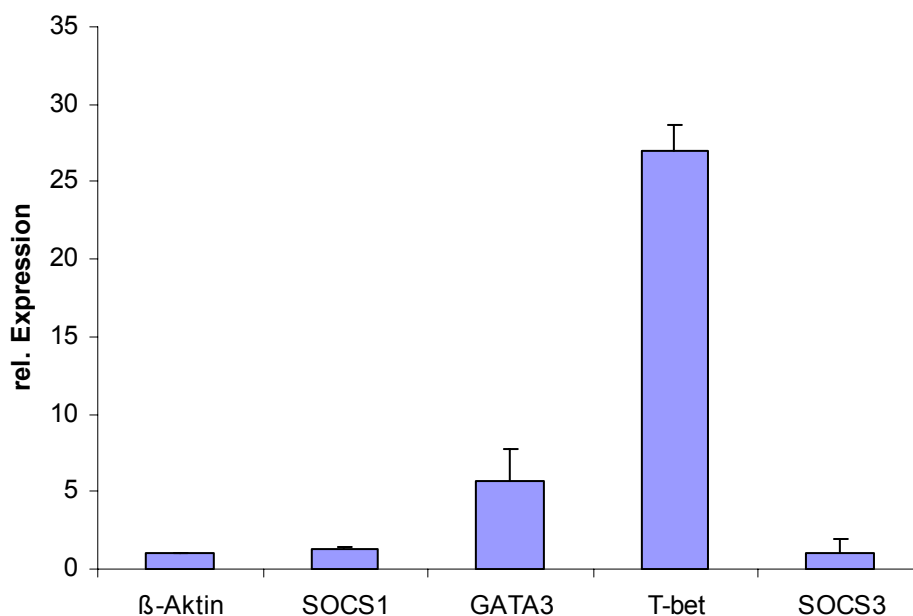
**Abbildung 9: Relative Genexpression von Proteinallergenextrakt gepulsten DC**

Unreife dendritische Zellen wurden für 5 min (A) 10 min (B) 30 min (C) und 60 min (D) mit 10  $\mu$ g/ml Proteinallergenextrakt (Gräser- bzw. Birkenpollenextrakt) inkubiert. Nach Isolierung der RNA und anschließender reversen Transkription wurden die Gene  $\beta$ -Aktin, SOCS1, SOCS3, GATA3 und T-bet in der quantitativen Real-Time PCR quantifiziert. Aufgetragen ist die relative Genexpression nach unterschiedlich langer Allergenexposition, ermittelt durch die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 9 unabhängigen Experimenten.

Humane dendritische Zellen von Gräserpollen- und Birkenpollenallergikern weisen hier ein T<sub>H</sub>2-assoziiertes Genexpressionsmuster auf, wie es bislang nur in T-Zellen beschrieben wurde.

#### 4.3 Genexpression dendritischer Zellen nach Exposition mit dem Kontaktallergen 5-Chlor-2-methyl-2,3-dihydroisothiazol-3-on/2-Methyl-2,3-dihydroisothiazol-3-on (MCI/MI)

Um zu untersuchen, ob dendritische Zellen eine Änderung der relativen Genexpression auf ein Kontaktallergen zeigen und wie sich dieses von Proteinallergenen unterscheidet, wurden diese für 60 Minuten mit 1 µg/ml MCI/MI inkubiert. Es wurde hier ebenfalls die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA transkribiert. Zur Bestimmung der relativen Genexpression wurde die so gewonnene cDNA als Template in der quantitativen Real-Time-PCR eingesetzt. Als Kontrolle wurden wiederum nur mit Medium behandelte dendritische Zellen eingesetzt.



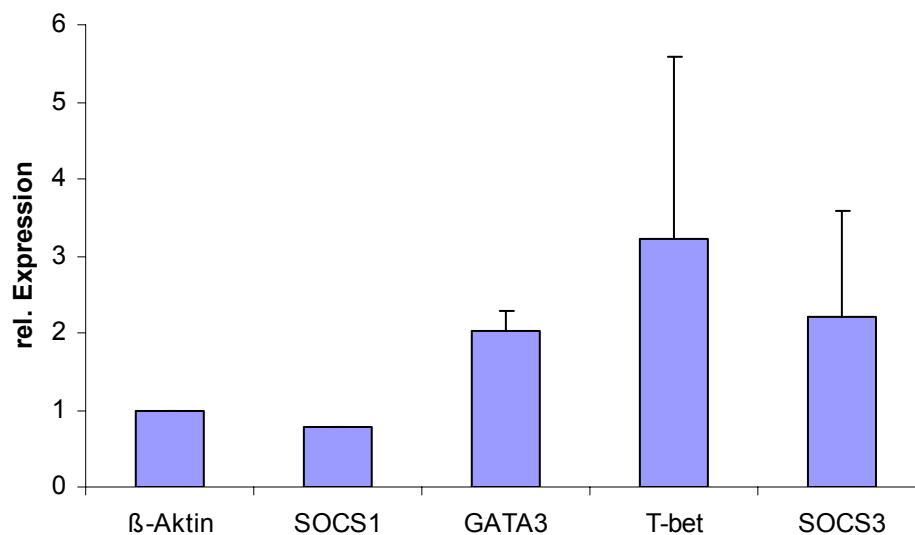
**Abbildung 10: Relative Genexpression von MCI/MI gepulsten dendritischen Zellen**

Unreife dendritische Zellen wurden für 60 min mit 1 µg/ml 5-Chlor-2methyl-2,3-dihydroisothiazol-3-on/2-Methyl-2,3-dihydroisothiazol-3-on (MCI/MI) inkubiert. Nach Isolierung der RNA und anschließender reversen Transkription wurden die Gene *β-Aktin*, *SOCS1*, *SOCS3*, *GATA3* und *T-bet* in der quantitativen Real-Time-PCR quantifiziert. Aufgetragen ist die relative Genexpression, ermittelt durch die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten.

Das Kontaktallergen MCI bewirkt nach 60 Minuten Inkubation eine Hochregulation von *GATA3* und eine noch fünfmal höhere Regulation des  $T_H1$ -assoziierten Transkriptionsfaktors *T-bet* (Abb. 10). Die Gene *SOCS1* und *SOCS3* bleiben auf Basislevel. Es lässt sich somit ein Trend des Genexpressionsprofils in Richtung  $T_H1$ -Muster beobachten, wie es sonst bislang ebenfalls nur für T-Zellen beschrieben wurde.

#### 4.4 Tetanustoxoid bewirkt eine $T_H1$ - und eine $T_H2$ -assoziierte Genexpression in dendritischen Zellen

Nach den Feststellungen für Protein- und Kontaktallergene wurde als Vergleich das Neurotoxin Tetanustoxoid untersucht. Das Tetanustoxoid (TT) ist einer neutralen Immunantwort zugeordnet; es weist sowohl  $T_H1$ - als auch  $T_H2$ -induzierende Eigenschaften auf. So wurden an Tag 7 der Kultur 1  $\mu\text{g/ml}$  TT zu dendritischen Zellen gegeben und für 60 Minuten inkubiert.



**Abbildung 11: Relative Genexpression von Tetanustoxoid gepulsten dendritischen Zellen**

Unreife dendritische Zellen wurden für 60 Minuten mit 1  $\mu\text{g/ml}$  Tetanustoxoid (TT) inkubiert. Nach Isolierung der RNA und anschließender reversen Transkription wurden die Gene  *$\beta$ -Aktin*, *SOCS1*, *SOCS3*, *GATA3* und *T-bet* in der quantitativen Real-Time-PCR quantifiziert. Aufgetragen ist die relative Genexpression, ermittelt durch die  $\Delta\Delta C_T$ -Methode. Dargestellt sind die Mittelwerte aus 2 unabhängigen Experimenten.

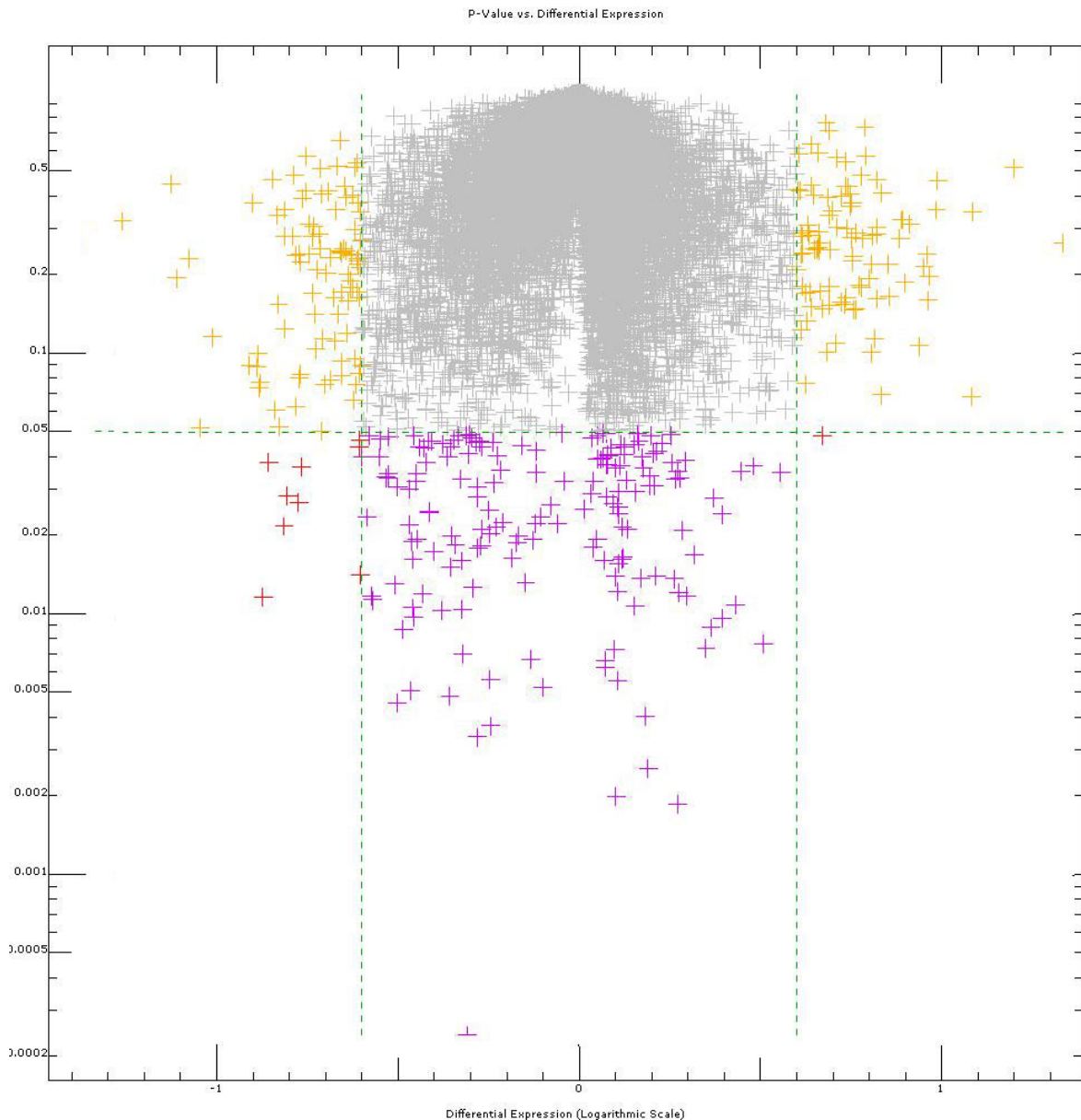
Anschließend erfolgte wiederum eine reverse Transkription der Gesamt-RNA und eine quantitative Real-Time-PCR-Analyse. Als Negativkontrolle wurden dendritische Zellen eingesetzt, die nur mit Medium inkubiert wurden.

Mit Ausnahme des Gens *SOCS1* sind die  $T_H1$ -assoziierten Gene *GATA3* und *SOCS3*, sowie das  $T_H1$ -assoziierte Gen *T-bet* hochreguliert (Abb. 11). Es lässt sich auch hier ein Trend erkennen, dass humane dendritische Zellen bei Kontakt mit Tetanustoxoid eine Veränderung des Genexpressionsmusters in Richtung  $T_H1$  und  $T_H2$  aufweisen.

## **5 Genexpression dendritischer Zellen mit Hilfe von High Density Micro Arrays**

Um nicht nur die Veränderungen vorausgewählter Gene unter dem Einfluss von Kontakt- versus Proteinallergenen zu untersuchen, wurden unreife dendritische Zellen von Gräserpollen-Allergikern mit 10 µg/ml Gräserpollenextrakt gepulst und für 1 h inkubiert. Um den Effekt der in dem Gräserpollenextrakt enthaltenen Menge an bakteriellem LPS zu untersuchen, wurden dendritische Zellen desselben Allergikers mit der entsprechenden Menge an LPS (50 ng/ml) aber ohne Allergen gepulst und ebenfalls für 1 h inkubiert. Als Basis- und damit Vergleichspopulation wurden dendritische Zellen desselben Allergikers ohne Zugabe von Allergen oder LPS benutzt. Die Zellen wurden geerntet, die Gesamt-RNA isoliert und wie unter 2.3.8 beschrieben in High Density Micro Array Experimenten in Zusammenarbeit mit der HDMA Core Facility der Johannes Gutenberg-Universität Mainz untersucht. Die Arrays wurden insgesamt dreimal mit jeweils unterschiedlichen Gräserpollenallergikern durchgeführt. Jeder einzelne Array untersuchte dabei die Genexpression von 22283 Genen. Die Auswertung dieser Dreiecks-Experimente erfolgte durch den Vergleich der Datensätze Gräserpollen gepulster dendritischer Zellen gegen die unbehandelten dendritischen Zellen, sowie der Datensätze LPS gepulster dendritischer Zellen gegen unbehandelte dendritische Zellen mittels der Software ArrayAssist in Form von Volcanoblots. Als Schwellenwerte wurden für die statistische Signifikanz im ungepaarten T-Test  $p \leq 0,05$ , für die differentielle Expression, logarithmiert zur Basis 2,  $-0,6 \leq DE \leq 0,6$  gewählt.

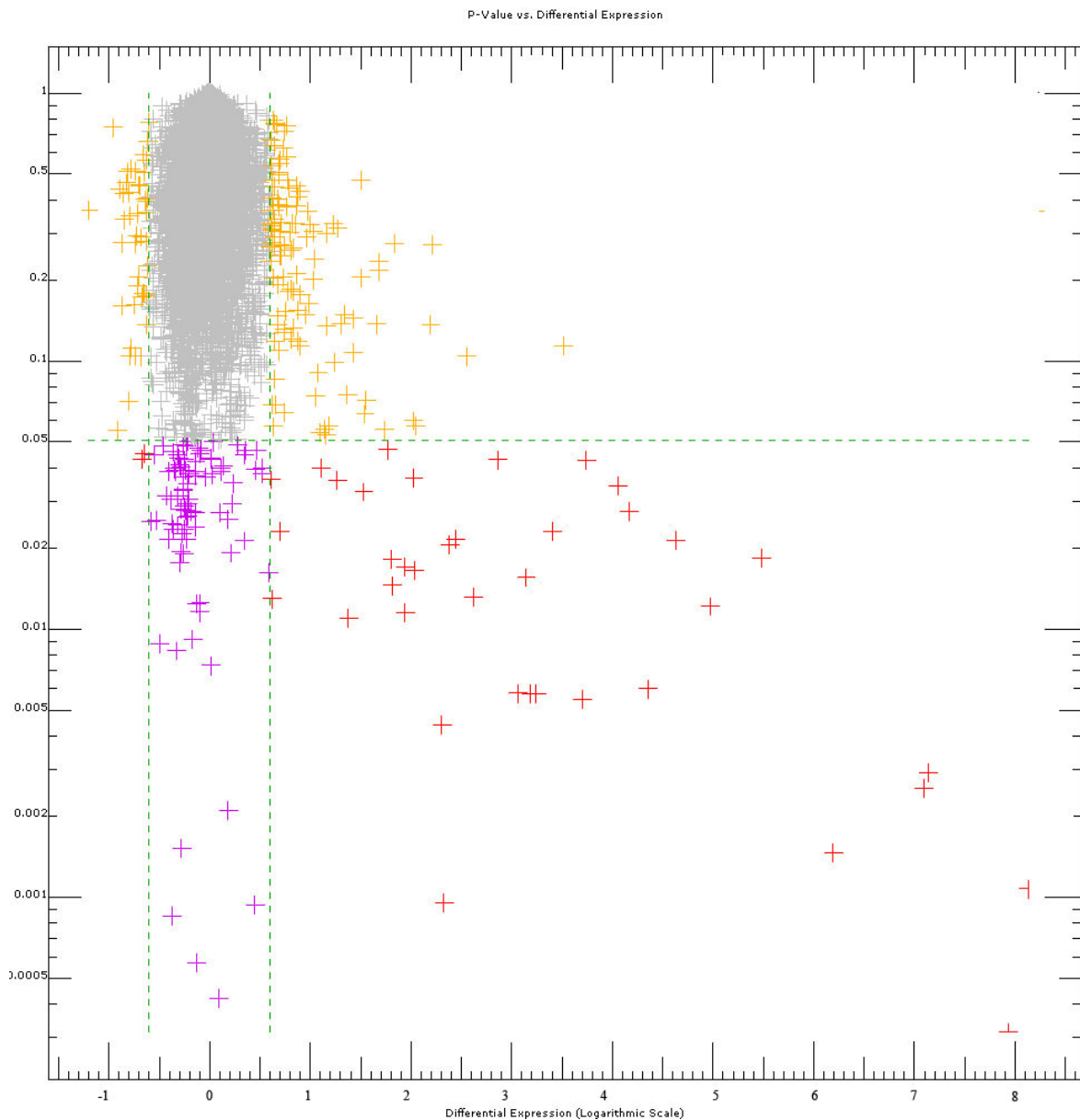
Betrachtet man die Genexpression von Gräserpollen gepulsten dendritischen Zellen mit der Genexpression der Kontrollzellen (Abb. 12), so lässt sich eine statistisch signifikante und mindestens 1,5fache Regulation von insgesamt 10 Genen erkennen. Von diesen 10 Genen sind 9 herunter- und 1 hochreguliert.



**Abbildung 12: Differentielle Genexpression von Gräserpollenextrakt gepulsten DC gegenüber unbehandelten DC**

Dendritische Zellen wurden für eine Stunde mit 10  $\mu\text{g/ml}$  Gräserpollenextrakt für 1 Stunde inkubiert und zusammen mit den unbehandelten Kontroll-DC im Microarray untersucht. Dargestellt ist die differentielle Expression in logarithmischer Darstellung (x-Achse) gegen die statistische Signifikanz, bestimmt durch den ungepaarten T-Test (y-Achse). Als Schwellenwerte wurden für den T-Test  $p = 0,05$ , für die differentielle Expression, logarithmiert zur Basis 2,  $-0,6 \leq DE \leq 0,6$  festgelegt.

Das Genexpressionsmuster der mit LPS behandelten dendritischen Zellen weist eine statistisch signifikante und mindestens 1,5fache Regulation gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen von insgesamt 40 Genen auf (Abb. 13), wobei hier 2 Gene herab- und 38 Gene hochreguliert sind. Eines der stark hochregulierten Gene ist *CXCL2* oder *Gro-beta*, welches eine 6,195fache differentielle Expression aufweist.

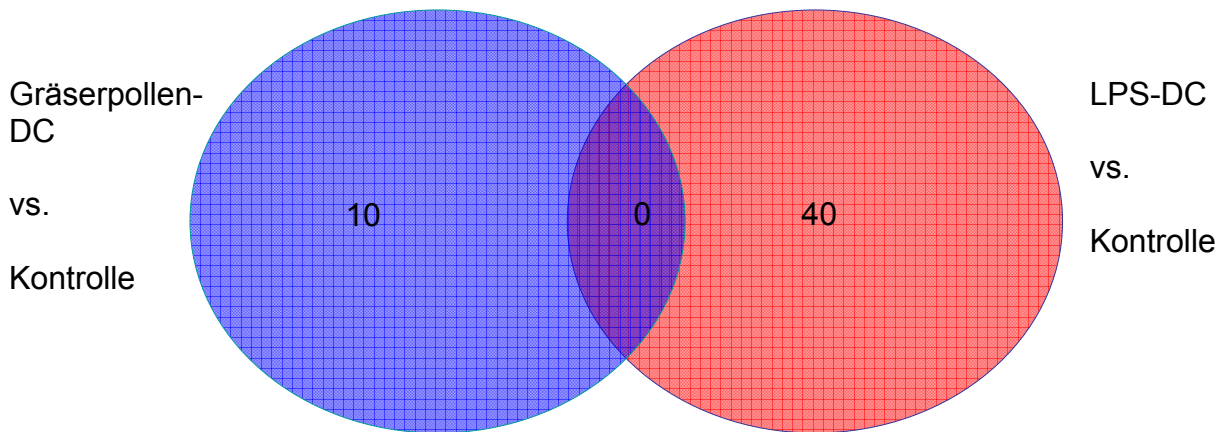


**Abbildung 13: Differentielle Genexpression von LPS gepulsten DC gegenüber unbehandelten DC**

Dendritische Zellen wurden für eine Stunde mit 50 ng/ml LPS für 1 Stunde inkubiert und zusammen mit den unbehandelten Kontroll DC im Micro Array untersucht. Dargestellt ist die differentielle Expression in logarithmischer Darstellung (x-Achse) gegen die statistische Signifikanz, bestimmt durch den ungepaarten T-Test (y-Achse). Als Schwellenwerte wurden für den T-Test  $p = 0,05$ , für die differentielle Expression, logarithmiert zur Basis 2,  $-0,6 \leq DE \leq 0,6$  festgelegt.



Vergleicht man die statistisch signifikant regulierten Gene untereinander, so findet man keine Schnittmenge (Abb. 14). Es werden keinerlei Gene sowohl durch den Gräserpollenextrakt als auch durch die darin enthaltene Menge an LPS reguliert.



**Abbildung 14: Vergleich der statistisch signifikant regulierten Gene**

Die statistisch signifikant differentiell expremierten Gene der beiden Vergleichsgruppen Gräserpollen gepulste DC gegen unbehandelte DC (blau dargestellt) und LPS gepulste gegen unbehandelte DC (rot dargestellt) weisen keine gemeinsame Schnittmenge auf.

In Tabelle 9 sind die statistisch signifikant regulierten Gene der Gräserpollenextrakt gepulsten dendritischen Zellen zusammengefasst.

**Tabelle 9: Statistisch signifikant regulierte Gene mit Gräserpollenextrakt gepulster dendritischer Zellen**

| Gen             | Beschreibung   | Differentielle Expression, logarithmiert zur Basis 2 |
|-----------------|--|--|
| <i>STX5A</i>    | syntaxin 5A  | 0,670  |
| <i>VRK1</i>     | vaccinia related kinase 1  | -0,604   |
| <i>PSMC6</i>    | proteasome (prosome, macropain)  | -0,604   |
|                 | 26S subunit, ATPase, 6   |  |
| <i>MRPS30</i>   | mitochondrial ribosomal protein S30                                      | -0,608   |
| <i>KIAA0157</i> | KIAA0157   | -0,766   |
| <i>SERPINB9</i> | serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9 | -0,775   |

|               |   |        |
|---------------|---|--------|
| <i>ATF7IP</i> | activating transcription factor 7 interacting protein | -0,805 |
| <i>SOS1</i>   | son of sevenless homolog 1 (Drosophila)               | -0,815 |
| <i>BICD2</i>  | bicaudal D homolog 2 (Drosophila)                     | -0,857 |
| <i>GMFB</i>   | glia maturation factor, beta                          | -0,872 |

Tabelle 10 zeigt die statistisch signifikant regulierten Gene der LPS gepulsten dendritischen Zellen.

**Tabelle 10: Statistisch signifikant regulierte Gene mit LPS gepulster dendritischer Zellen**

| Gen                                 | Beschreibung  | Differentielle Expression<br>logarithmiert zur Basis 2 |
|-------------------------------------|---|--|
| <i>IL1B</i>                         | interleukin 1, beta   | 8,138  |
| <i>TNF</i>                          | tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2)   | 7,938  |
| <i>CCL20</i>                        | chemokine (C-C motif) ligand 20   | 7,145  |
| <i>IL1B</i>                         | interleukin 1, beta   | 7,099  |
| <b><i>CXCL2</i></b>                 | <b>chemokine (C-X-C motif) ligand 2</b>   | <b>6,195</b>   |
| <i>IL8</i>                          | interleukin 8   | 5,480  |
| <i>CXCL3</i>                        | chemokine (C-X-C motif) ligand 3  | 4,975  |
| <i>IL8</i>                          | interleukin 8   | 4,631  |
| <i>IER3</i>                         | immediate early response 3  | 4,357  |
| <i>IL1A</i>                         | interleukin 1, alpha  | 4,169  |
| <i>CCL4</i>                         | chemokine (C-C motif) ligand 4  | 4,057  |
| <i>PTX3</i>                         | pentraxin-related gene, rapidly induced by IL-1 beta  | 3,744  |
| <i>TNFAIP3</i>                      | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3  | 3,706  |
| <i>CCL3 /// CCL3L1 /// MGC12815</i> | chemokine (C-C motif) ligand 3 /// chemokine (C-C motif) ligand 3-like 1 /// chemokine (C-C motif) ligand 3-like, centromeric | 3,410  |
| <i>DUSP2</i>                        | dual specificity phosphatase 2  | 3,243  |
| <i>NFKBIA</i>                       | nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, alpha   | 3,191  |
| <i>DUSP1</i>                        | dual specificity phosphatase 1  | 3,144  |
| <i>TNFAIP3</i>                      | tumor necrosis factor, alpha-induced protein 3  | 3,071  |
| <i>EGR1</i>                         | early growth response 1   | 2,866  |

---

|                 |  |        |
|-----------------|--|--------|
| <i>BTG2</i>     | BTG family, member 2   | 2,623  |
| <i>TNFAIP6</i>  | tumor necrosis factor, alpha-<br>induced protein 6                     | 2,444  |
| <i>PPP1R15A</i> | protein phosphatase 1, regulatory<br>(inhibitor) subunit 15A           | 2,383  |
| <i>MCPIP</i>    | MCP-1 treatment-induced protein  | 2,328  |
| <i>TNFAIP6</i>  | tumor necrosis factor, alpha-<br>induced protein 6                     | 2,306  |
| <i>F3</i>       | coagulation factor III<br>(thromboplastin, tissue factor)              | 2,033  |
| <i>GADD45B</i>  | growth arrest and DNA-damage-<br>inducible, beta                       | 2,031  |
| <i>BTG2</i>     | BTG family, member 2   | 1,943  |
| <i>KLF6</i>     | Kruppel-like factor 6  | 1,941  |
| <i>PPP1R15A</i> | protein phosphatase 1, regulatory<br>(inhibitor) subunit 15A           | 1,816  |
| <i>KLF6</i>     | Kruppel-like factor 6  | 1,811  |
| <i>ICAM1</i>    | intercellular adhesion molecule 1<br>(CD54), human rhinovirus receptor | 1,772  |
| <i>GADD45B</i>  | growth arrest and DNA-damage-<br>inducible, beta                       | 1,532  |
| <i>DUSP1</i>    | dual specificity phosphatase 1   | 1,380  |
| <i>GADD45B</i>  | growth arrest and DNA-damage-<br>inducible, beta                       | 1,270  |
| <i>SOD2</i>     | superoxide dismutase 2,<br>mitochondrial                               | 1,106  |
| <i>MCRS1</i>    | microspherule protein 1  | 0,698  |
| <i>BRD2</i>     | bromodomain containing 2   | 0,624  |
| <i>ZNF318</i>   | zinc finger protein 318  | 0,612  |
| <i>PTPRC</i>    | protein tyrosine phosphatase,<br>receptor type, C                      | -0,651 |
| <i>UBE3B</i>    | ubiquitin protein ligase E3B   | -0,672 |

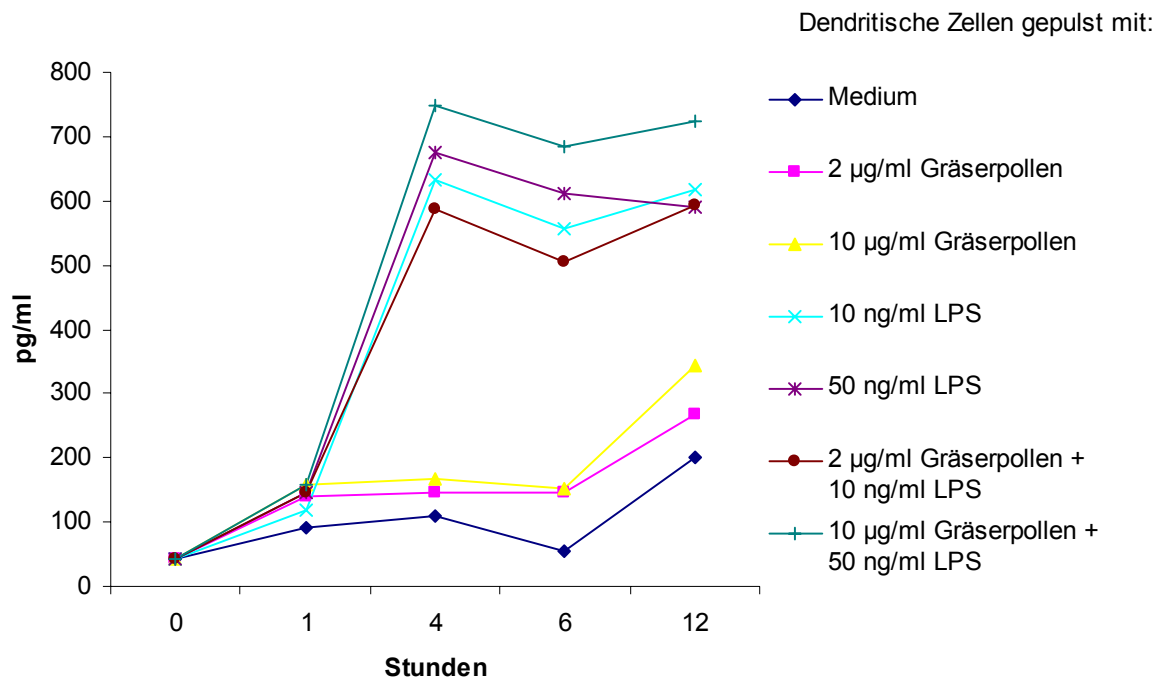
---

### **5.1 Verifizierung der Micro Array Daten am Beispiel des Chemokins CXCL2 (Gro-beta)**

Zur Verifizierung der Microarray Experimente wurde das in LPS gepulsten dendritischen Zellen statistisch signifikant hochregulierte Gen CXCL2 im ELISA untersucht. Hierzu wurde zu unreifen dendritischen Zellen an Tag 7 der Kultur 10 µg/ml oder 2 µg/ml Gräserpollenallergenextrakt, sowie den respektiven Mengen an LPS, 50 ng/ml bzw. 10 ng/ml, gegeben. Zusätzlich wurde die Kombination aus Gräserpollenextrakt und LPS zu den Zellen gegeben. Als Negativkontrolle wurden dendritische Zellen mitgeführt, die weder mit Gräserpollenallergenextrakt noch mit LPS behandelt wurden. Die Zellen wurden über einen Zeitraum von 12 Stunden inkubiert und die Produktion des Chemokins CXCL2 zu unterschiedlichen Zeitpunkten wie unter 2.2.2 beschrieben gemessen (Abb. 15).

Die Zugabe von Gräserpollenallergenextrakt führt nahezu dosisunabhängig zu einer gesteigerten Produktion des CXCL2. Es lässt sich allerdings eine deutlich erhöhte Menge des Chemokins bei Zugabe von LPS bereits nach 4 Stunden Inkubationszeit feststellen. Der gleiche Effekt ist bei den Zellen zu beobachten, die mit der Kombination aus Gräserpollenallergenextrakt und LPS behandelt worden sind. Bei der Hochdosis-Kombination aus 10 µg/ml Gräserpollenallergenextrakt und 50 ng/ml LPS lässt sich ein additiver Effekt beobachten.

Diese Beobachtungen decken sich mit der Aussage der Microarrays: CXCL2, auch Gro-beta genannt, wird durch die Zugabe von LPS stark hochreguliert. Die Regulation auf mRNA-Ebene konnte durch den Nachweis auf Proteinebene bestätigt werden.



**Abbildung 15: Kinetik der Produktion des Chemokins CXCL2 in dendritischen Zellen nach Kontakt mit Gräserallergen und/oder LPS**

Unreife dendritische Zellen wurden an Tag 7 der Kultur mit 10 bzw. 2 µg/ml Gräserallergen, den respektiven Mengen 50 bzw. 10 ng/ml LPS, sowie der Kombination gepulst. Als Negativkontrolle wurden unbehandelte dendritische Zellen mitgeführt. Aufgetragen sind die gemessenen Mengen an CXCL2 gegen die Zeitpunkte der Messung. Dargestellt ist ein repräsentatives Beispiel aus 9 unabhängigen Experimenten.

## IV Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Proteinallergenen auf unreife dendritische Zellen von Allergikern untersucht. Zunächst wurde die phänotypische Auswirkung von Proteinallergenen auf dendritische Zellen betrachtet. Durch die Zugabe von Proteinallergenen zur Kultur der Zellen konnte das Ausbilden der Dendriten, der charakteristischen Zellfortsätze reifer dendritischer Zellen, rein optisch beobachtet werden. Dieses Phänomen trat auch durch die Zugabe des proinflammatorischen Ausreifungscocktails aus PGE<sub>2</sub>, IL-1 $\beta$  und TNF- $\alpha$  auf, wobei hier eine vollständige Maturierung induziert wurde.

Um den Ausreifungsstatus der dendritischen Zellen näher zu charakterisieren, wurden die dendritischen Zellen eines Allergikers mit unterschiedlichen Dosen des Allergens ohne die Zugabe des Cocktails gepulst und anschließend im Durchflußzytometer auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, sowie auf den Marker für reife dendritische Zellen, CD83, hin analysiert. Es wurde eine dosisabhängige beginnende Ausreifung der Zellen beobachtet, die mit der morphologischen Veränderung der Zellen einherging. Der Ausreifungsstatus zeigte unter diesen Umständen allerdings ein deutlich geringeres Level als bei dendritischen Zellen, die nur mit dem proinflammatorischen Zytokincocktail ausgereift wurden.

Die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente wurden mit Allergenextrakten durchgeführt, die ebenfalls in der klinischen Anwendung zum Einsatz kommen und auf die diese Patienten im durchgeführten Haut-Prick-Test positiv reagierten. Da eine Ausreifung von dendritischen Zellen auch durch bakterielles Lipopolysaccharid Gram-negativer Bakterien beschrieben wurde,<sup>106</sup> wurden die Extrakte auf den Endotoxingehalt hin im Limulus-Amöbocytenlysat-Test untersucht. Es wurde für eine eingesetzte Menge an Gräserpollenallergenextrakt von 10  $\mu$ g/ml ein LPS-Gehalt von 50 ng/ml festgestellt. Um den Einfluss des in dem Allergenextrakt enthaltenen bakteriellen Lipopolysaccharids auf die beginnende Ausreifung dendritischer Zellen zu analysieren, wurden diese mit dem Gräserpollenallergenextrakt sowie der darin enthaltenen Mengen an LPS gepulst und im Durchflußzytometer wiederum auf die Expression der kostimulatorischen Moleküle CD80, CD86 und den

Ausreifungsmarker CD83 hin untersucht. Humane dendritische Zellen wiesen, sowohl durch die Zugabe des Gräserallergenextrakts als auch durch die reine Zugabe von LPS, eine beginnende Ausreifung auf. Die Zugabe der respektiven Menge an LPS zu den Zellen zeigte sogar eine geringfügig höhere Expression des Markers CD83 als durch das Allergengemisch alleine. Dendritische Zellen, die mit der Kombination aus Gräserpollenallergenextrakt und der respektiven Menge an LPS zusammen gepulst worden sind, zeigten ebenfalls eine beginnende Maturierung. Durch Zugabe des zyklischen, kationischen Antibiotikums Polymyxin B, welches in der Lage ist, Endotoxine zu eliminieren,<sup>107,108</sup> konnte der zu beobachtende Effekt der beginnenden Reifung dendritischer Zellen sowohl für die nur mit LPS gepulsten Zellen, als auch für die mit Gräserpollenextrakt gepulsten Zellen sowie der Kombination hieraus aufgehoben werden. Die Ausreifung der dendritischen Zellen scheint somit ein durch das bakterielle Lipopolysaccharid ausgelöster Effekt zu sein.

*Allakhverdi et al.* konnten ebenfalls zeigen, dass dendritische Zellen durch die Zugabe von Gräserpollenextrakt eine erhöhte Expression von CD83 aufweisen und LPS gepulste dendritische Zellen ebenfalls eine leicht erhöhte Expression des Markers zeigen.<sup>109</sup> Im Gegensatz zu dieser Arbeit schließen die Autoren in ihrer Studie allerdings die Kontamination mit LPS als Ursache der Maturierung aus, sondern erklären die intakte Struktur der Pollen als adjuvanten Effekt. Das im Mitogen der amerikanischen Kermesbeere, *Phytolacca americana*, (pokeweed mitogen, PWM) enthaltene Endotoxin ist nach einer Studie von *Yang et al.*, ebenfalls in der Lage eine Ausreifung humaner dendritischer Zellen herbeizuführen.<sup>110</sup> Eine weitere Untersuchung, die für den LPS-Effekt spricht, zeigt die Maturierung dendritischer Zellen nach Kontakt mit LPS-kontaminierten Nanopartikeln. Die in der Produktion dieser Partikel auftretende Kontamination mit bakteriellem LPS induziert eine erhöhte Expression des CD83 und lässt sich durch die Zugabe von Polymyxin B, wie auch in dieser Arbeit gezeigt, wieder auf Basislevel zurückführen.<sup>111</sup>

Die Expression des kostimulatorischen Moleküls CD80 ist in humanen dendritischen Zellen durch die Zugabe von Gräserpollenallergenextrakt oder den darin enthaltenen Mengen an LPS, sowie der Kombination daraus, erhöht. Der Effekt kann, wie auch bei CD83, durch die Zugabe von Polymyxin B aufgehoben werden und scheint damit ebenfalls durch das Endotoxin begründet zu sein. Dies lässt sich durch den, seit 1955 bekannten, adjuvanten Effekt des LPS erklären.<sup>112</sup> Eine neuere Studie von

*Hoebe et al.* konnte zeigen, dass die durch Lipopolysaccharide induzierte Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle über das dem TLR4 nachgeschaltete Protein Trif erfolgt.<sup>113</sup>

Die Rolle der negativen Regulatoren der Zytokinsignaltransduktion, den SOCS-Proteinen, ist in T-Zellen relativ gut untersucht. Die Zytokine IL-12 und IFN- $\gamma$  fördern die T<sub>H</sub>1-Differenzierung und inhibieren die T<sub>H</sub>2-Differenzierung, wohingegen IL-4 die Entwicklung in T<sub>H</sub>1-Zellen inhibiert und die Differenzierung in Richtung T<sub>H</sub>2 drückt.<sup>114</sup> SOCS1 ist für die Differenzierung der T<sub>H</sub>1-Zellen wichtig, da es in der Lage ist, die Aktivierung von STAT6 zu hemmen.<sup>115</sup> SOCS3 ist in der Lage, die durch IL-12 stattfindende Aktivierung von STAT4 zu unterbinden und so die T<sub>H</sub>1-Entwicklung zu hemmen und eine T<sub>H</sub>2-Differenzierung zu fördern.<sup>100</sup> *Seki et al.* konnten die Bedeutung von SOCS3 anhand der Korrelation von SOCS3 mit einem erhöhten Serumspiegel an IgE in Patienten mit atopischer Dermatitis, sowie dem Fehlen einer T<sub>H</sub>2-Immunantwort bei Mäusen mit einer hetero- oder homozygoten Deletion des Gens SOCS3 zeigen.<sup>99</sup> SOCS5 ist ebenfalls für die T-Zell Differenzierung wichtig und kommt vornehmlich auf T<sub>H</sub>1-Zellen vor. Es blockiert die Signaltransduktion von IL-4 und wahrscheinlich auch von IL-13 und fördert damit eine T<sub>H</sub>1-Differenzierung.<sup>99</sup> SOCS1 spielt ebenfalls eine Rolle in der angeborenen Immunität, da die Expression von SOCS1 durch LPS oder CpG-DNA induziert wird.<sup>116,117</sup> Makrophagen aus SOCS1 transgenen Mäusen sind nicht fähig auf LPS zu reagieren, was bestätigt, dass SOCS1 sowohl die TLR-, als auch die JAK/STAT- Signaltransduktion inhibieren kann. Umgekehrt zeigen SOCS1 defiziente Mäuse eine Hypersensibilität auf LPS, was zu erhöhter Produktion an TNF- $\alpha$  und IL-12 führt.<sup>118,119</sup> SOCS1 ist ebenfalls an der Homeostase dendritischer Zellen beteiligt: SOCS1 defiziente dendritische Zellen werden durch IL4 und IFN- $\gamma$  hyperaktiviert. SOCS1 -/- Mäuse, in die selektiv in T- und B-Zellen SOCS1 eingebracht wurde, zeigen einen dramatischen Anstieg in der Akkumulierung und Aktivierung in Thymus und Milz. Diese Tiere zeichnen sich durch Hypogammaglobulinämie – dem Mangel oder Fehlen von Immunglobulinen – und Hautkrebs aus, was auf eine wichtige Funktion von SOCS1 in der Regulation der dendritischen Zelle und der Unterdrückung von Autoimmunerkrankungen hinweist.<sup>120</sup> SOCS3 defiziente Makrophagen zeigen eine fortwährende Aktivierung von STAT3 als Antwort auf das proinflammatorische Zytokin IL-6, wohingegen STAT3 effektiv



durch die Zugabe von IL-10 herabreguliert wurde.<sup>121</sup> SOCS3 ist ein negativer Regulator der IL-6, nicht aber der IL-10 Signaltransduktion in humanen Makrophagen, was durch die spezifische Wirkung von SOCS3 auf das SHP-2-bindende Tyrosin der gp130 Rezeptoruntereinheit myeloider Zellen zurückzuführen zu sein scheint. Zudem bindet SOCS3 nicht an den IL-10 Rezeptor.<sup>88</sup> Des Weiteren wurde SOCS3 über die IL-6 vermittelte Aktivierung von STAT3 in Zusammenhang mit inflammatorischen Erkrankungen gebracht, wie zum Beispiel rheumatoide Arthritis oder Morbus Crohn.<sup>122</sup>

Die von *Bellinghausen et al.* gemachte Entdeckung, dass unreife, humane dendritische Zellen nach Kontakt mit Proteinallergenen eine Aktivierung von STAT6 zeigen,<sup>11</sup> warf die Frage auf, ob die Regulation dieses Prozesses ebenfalls über die nachgeschalteten SOCS-Moleküle laufen. In der vorliegenden Arbeit konnte nach Zugabe von Proteinallergen zu unreifen humanen dendritischen Zellen ein T<sub>H</sub>2-assoziiertes Genexpressionsprofil nachgewiesen werden: Die relative Expression der Gene *SOCS3* und *GATA3* war nach 30 Minuten Kontakt zu dem Allergen deutlich erhöht und blieb auch nach 60 Minuten weiterhin bestehen. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass die dendritischen Zellen selbst eine, durch den Allergenextrakt bedingte, phänotypische Veränderung erfahren, die eine Differenzierung von naiven T-Zellen in T<sub>H</sub>2-Zellen fördert. Dendritische Zellen sind in der Lage, sowohl eine T<sub>H</sub>1- als auch eine T<sub>H</sub>2-Differenzierung von T-Zellen zu induzieren.<sup>58,123</sup> Hierfür sind mehrere von dendritischen Zellen stammende Faktoren identifiziert worden, wie die T<sub>H</sub>1-polarisierenden Zytokine IL-12 und IL-23, sowie das T<sub>H</sub>2-polarisierende Zytokin IL-13.<sup>11</sup> *Parham et al.* konnten auf dendritischen Zellen Rezeptoren für IL12 und IL-23 nachweisen, was als Hinweis auf einen autokrinen Regelkreis interpretiert wird.<sup>124</sup> Der positive Regelkreis von IL-12 auf dendritische Zellen wird als Grund für die starke T<sub>H</sub>1-Polarisierung von T-Zellen angenommen.<sup>125,126</sup> IL-23 bindet an seinen Rezeptoren in dendritischen Zellen und induziert somit die Produktion von IL-12 und IFN- $\gamma$ .<sup>127</sup> Weitere Studien haben dendritische Zellen, aufgrund ihrer T<sub>H</sub>-Polarisierungsfähigkeit, in 2 Subtypen eingeteilt: DC1 und DC2. DC1 sind T<sub>H</sub>1-polarisierende dendritische Zellen, die hohe Mengen an IL-12 sezernieren; DC2 sind dendritische Zellen, die weniger IL-12 produzieren und T<sub>H</sub>2-Zellen induzieren.<sup>128-133</sup>

Die für die allergische Erkrankung typische  $T_H2$ -Immunantwort scheint ebenfalls in dem vorliegenden humanen System durch die dendritische Zelle direkt beeinflusst zu sein. In der vorliegenden Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass für die  $T_H2$ -Polarisierung typischen Veränderungen sich nicht nur in T-Zellen, sondern nach Exposition gegenüber Proteinallergenen auch bereits in dendritischen Zellen finden. Diese Theorie wird untermauert durch die Ergebnisse von *Li et al.*, die durch die Expression von SOCS3 in murinen dendritischen Zellen einen DC2-Phänotyp nachgewiesen haben, der in der Lage ist *in vivo* und *in vitro* eine  $T_H2$ -Differenzierung zu induzieren.<sup>134</sup>

Die Veränderung des Genexpressionsprofils in humanen dendritischen Zellen durch die Zugabe des Kontaktallergens MCI/MI weist eine Assoziation mit einer  $T_H1$ -Immunantwort auf, die sich besonders durch die erhöhte Expression des Gens *T-bet* auszeichnet. Auch hier konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal gezeigt werden, dass die für die  $T_H1$ -Polarisierung typischen Veränderungen sich nicht nur in T-Zellen, sondern nach Exposition gegenüber Kontaktallergenen auch bereits in dendritischen Zellen finden. Diese Beobachtungen passen zu der Studie von *Lugo-Villarino et al.*, die an murinen dendritischen Zellen zeigen konnten, dass *T-bet* in ähnlichem Maße wie in  $T_H1$ -Zellen produziert wird und für die optimale Produktion von IFN- $\gamma$  und der optimalen Aktivierung von antigenspezifischen  $T_H1$ -Zellen nötig ist.<sup>125</sup>

Der Einfluss des Tetanustoxoids auf humane dendritische Zellen weist ein Genexpressionsprofil auf, welches sowohl einer späteren  $T_H1$ - als auch einer  $T_H2$ -Antwort zugeordnet ist. So sind die Gene *GATA3*, *T-bet* und *SOCS3* hochreguliert. Dies passt dazu, dass Tetanustoxoid in T-Zellklonen zu einer neutralen  $T_H$ -Antwort führt.<sup>135</sup>

Die im Rahmen dieser Arbeit gefundenen Ergebnisse geben Anlass zur Hypothese, dass sich die Polarisation der Immunreaktion nicht erst auf Ebene der Effektor-T-Zellen, sondern bereits im Vorfeld auf Ebene der dendritischen Zellen ausbildet.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten High Density Micro Array Analysen ergaben distinkte Unterschiede zwischen mit Proteinallergenen gepulsten und mit der respektiven Menge an LPS gepulsten dendritischen Zellen. Es konnte für jede der beiden Zellpopulationen Gene identifiziert werden, die statistisch signifikant reguliert

sind, jedoch keine gemeinsame Schnittmenge bilden. Demnach existieren in dem hier gewählten System keine gemeinsam regulierten Gene, die sowohl durch den Proteinallergenextrakt als auch durch das bakterielle Lipopolysaccharid reguliert wurden. Literaturrecherchen über die durch das Allergen regulierten zehn Gene ergaben keine bis dato bekannten Zusammenhänge mit der allergischen Erkrankung oder ihrer direkten Funktion in dendritischen Zellen. Die Relevanz dieser hier identifizierten Gene erscheint – bezogen auf den heutigen Stand der Forschung – fragwürdig. Dies mag zum einen durch die relativ niedrige differentielle Expression der Gene, zum anderen durch die Dauer der Einwirkung des Allergens auf die dendritischen Zellen bedingt zu sein. Weiterführende Experimente, wie zum Beispiel Kinetiken mit unterschiedlich langen Expositionen des Allergens auf die Zellen und anschließende GeneChip-Analysen, sind durchaus denkbar. Allerdings sind diese mit einem hohen finanziellen und arbeitszeitintensiven Aufwand verbunden.

Die Microarray-Analysen LPS gepulster humaner dendritischer Zellen zeigten hingegen insgesamt 40 statistisch signifikant regulierte Gene. Hierbei fällt besonders auf, dass eine Vielzahl der hochregulierten Gene eine differentielle Expression weit ab des als Schwellenwert definierten  $DE = 0,6$  aufweisen. Einige dieser differentiell hochregulierten Gene wie zum Beispiel IL-1 $\beta$  und TNF sind Faktoren, die für die Maturierung dendritischer Zellen verantwortlich sind. Diese proinflammatorischen Zytokine kommen im Ausreifungscocktail zum Einsatz und bewirken das vollständige Ausreifen der dendritischen Zellen. Auf Proteinebene konnten diese Zytokine, wie auch das als signifikant hochreguliert identifizierte IL-8, von *Bueno et al.* mittels Durchflußzytometrie an humanen dendritischen Zellen durch die Stimulation mit LPS nachgewiesen werden.<sup>136</sup> Ein weiteres durch LPS hochreguliertes Gen, *CXCL2* (*Gro- $\beta$* ), konnte von *Hammer et al.* als im Mausmodell durch LPS induziertes Chemokin gezeigt werden. Die Autoren zeigen in ihrer Studie, dass die Regulation von *Gro- $\beta$*  durch die „dual specificity phosphatase 1“ (*DUSP1*) erfolgt.<sup>137</sup> Das Gen *DUSP1* konnte auch in den hier durchgeführten Microarrays ebenfalls als statistisch signifikant hochreguliert identifiziert werden.

Die Aussagen der Arraydaten konnten, im dem in dieser Arbeit benutzen humanen *in vitro* System dendritischer Zellen, ebenfalls auf Proteinebene verifiziert werden. Es war möglich *Gro- $\beta$*  mittels ELISA zu messen; das Chemokin wird besonders stark durch den Kontakt mit LPS von humanen dendritischen Zellen produziert.

Generell scheint das LPS einen stärkeren Stimulus als der Allergenextrakt für dendritische Zellen darzustellen. Dies geht mit der beobachteten, durch LPS ausgelösten, Maturierung der dendritischen Zellen konform. Warum sich die beobachteten Effekte sowohl durch den Proteinallergenextrakt als auch durch die darin enthaltene respektive Menge an LPS voneinander unterscheiden, könnte durch eine unterschiedliche vorliegende Form des LPS erklärt werden. Vorstellbar wäre eine im Allergenextrakt gebundene Form, die weniger aktiv wäre, als die frei lösliche Form. Andererseits ist es durchaus denkbar, dass die Quantifizierung der Endotoxinkontamination durch den LAL-Assay eine potentielle Fehlerquelle darstellt. Bedingt durch die Sensitivität des Assays wurden hohe Verdünnungsstufen der Allergenextrakte quantifiziert und auf die Gesamtmenge hochgerechnet. Es ist so nicht komplett auszuschließen, dass der ermittelte Gehalt der Endotoxinkontamination höher als der real enthaltene ist. Schließlich erscheint es auch möglich, dass der Allergenextrakt Faktoren enthält, die die Effekte von LPS blockieren beziehungsweise antagonisieren.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist es gelungen, den Einfluss unterschiedlicher Allergene auf die Signaltransduktion unreifer humaner dendritischer Zellen näher zu charakterisieren. So konnten Unterschiede in der Expression der SOCS-Moleküle und der T<sub>H</sub>1- beziehungsweise T<sub>H</sub>2- spezifischen Transkriptionsfaktoren GATA3 und T-bet sowohl für Proteinallergene als auch für Kontaktallergene gefunden werden, die Anlass zur Hypothese geben, dass sich die Polarisierung der Immunreaktion in Richtung T<sub>H</sub>1 oder T<sub>H</sub>2 bereits auf Ebene der bis dato als potentesten bekannten antigenpräsentierenden Zellen manifestiert.

Microarrayanalysen unreifer humaner dendritischer Zellen, die entweder mit Proteinallergenextrakt oder mit LPS in Berührung kamen, zeigten statistisch signifikant hochregulierte Gene, die keine Gemeinsamkeiten aufwiesen. Einzelne Aussagen der GeneChip-Daten konnten auf Proteinebene verifiziert werden. Jedoch war es nicht möglich, die durch das Allergen regulierten Gene näher zu deuten oder diese in einen Zusammenhang mit der allergischen Erkrankung oder der dendritischen Zelle zu bringen. Zu dem hier untersuchten Zeitpunkt stellte LPS einen stärkeren Stimulus für die dendritischen Zellen dar.

## V Literaturverzeichnis

1. Janeway C.A.Jr, Travers P., Walport M. & Shlomchick M. *Immunologie*. Spektrum Akademischer Verlag GmbH, Heidelberg, Berlin (2002).
2. Akira, S. & Hemmi, H. Recognition of pathogen-associated molecular patterns by TLR family. *Immunol. Lett.* **85**, 85-95 (2003).
3. Gordon, S. Pattern recognition receptors: doubling up for the innate immune response. *Cell* **111**, 927-930 (2002).
4. Bjorkman, P. J. *et al.* The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* **329**, 512-518 (1987).
5. Mosmann, T. R. & Coffman, R. L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* **7**, 145-173 (1989).
6. Trinchieri, G. Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. *Immunol. Today* **14**, 335-338 (1993).
7. Trinchieri, G. & Scott, P. The role of interleukin 12 in the immune response, disease and therapy. *Immunol. Today* **15**, 460-463 (1994).
8. Trinchieri, G. Proinflammatory and immunoregulatory functions of interleukin-12. *Int. Rev. Immunol.* **16**, 365-396 (1998).
9. Snijders, A., Kalinski, P., Hilkens, C. M. & Kapsenberg, M. L. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int. Immunol.* **10**, 1593-1598 (1998).
10. Verhasselt, V. *et al.* Bacterial lipopolysaccharide stimulates the production of cytokines and the expression of costimulatory molecules by human peripheral blood dendritic cells: evidence for a soluble CD14-dependent pathway. *J. Immunol.* **158**, 2919-2925 (1997).
11. Bellinghausen, I. *et al.* Production of interleukin-13 by human dendritic cells after stimulation with protein allergens is a key factor for induction of T helper 2 cytokines and is associated with activation of signal transducer and activator of transcription-6. *Immunology* **108**, 167-176 (2003).
12. Coffman, R. L. *et al.* B cell stimulatory factor-1 enhances the IgE response of lipopolysaccharide-activated B cells. *J. Immunol.* **136**, 4538-4541 (1986).
13. Snapper, C. M. & Paul, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. *Science* **236**, 944-947 (1987).
14. Yssel, H. *et al.* IL-10 is produced by subsets of human CD4+ T cell clones and peripheral blood T cells. *J. Immunol.* **149**, 2378-2384 (1992).

15. Swain, S. L. Generation and in vivo persistence of polarized Th1 and Th2 memory cells. *Immunity*. **1**, 543-552 (1994).
16. Mosmann, T. R. & Sad, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol. Today* **17**, 138-146 (1996).
17. Pirquet, C. v. Allergie. *Münch Med Wschr* **30**, 1457-1458. 1906.  
Ref Type: Magazine Article
18. Coombs, R. R. & Gell, P. G. H. The classification of allergic reactions underlying disease. *Clinical Aspects of Immunology* , 317. 1963.  
Ref Type: Magazine Article
19. Wills-Karp, M., Santeliz, J. & Karp, C. L. The germless theory of allergic disease: revisiting the hygiene hypothesis. *Nat. Rev. Immunol.* **1**, 69-75 (2001).
20. Warner, J. O. *et al.* Allergy practice worldwide: a report by the World Allergy Organization Specialty and Training Council. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **139**, 166-174 (2006).
21. Godfrey, R. C. Asthma and IgE levels in rural and urban communities of The Gambia. *Clin. Allergy* **5**, 201-207 (1975).
22. Strachan, D. P. Hay fever, hygiene, and household size. *BMJ* **299**, 1259-1260 (1989).
23. Blumenthal, M. N. The role of genetics in the development of asthma and atopy. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* **5**, 141-145 (2005).
24. Nicolai, T. & von, M. E. Pollution and the development of allergy: the East and West Germany story. *Arch. Toxicol. Suppl* **19**, 201-206 (1997).
25. Wright, R. J. Stress and atopic disorders. *J. Allergy Clin. Immunol.* **116**, 1301-1306 (2005).
26. Wan, H. *et al.* Der p 1 facilitates transepithelial allergen delivery by disruption of tight junctions. *J. Clin. Invest* **104**, 123-133 (1999).
27. Huby, R. D., Dearman, R. J. & Kimber, I. Why are some proteins allergens? *Toxicol. Sci.* **55**, 235-246 (2000).
28. Furmonaviciene, R. *et al.* An attempt to define allergen-specific molecular surface features: a bioinformatic approach. *Bioinformatics.* **21**, 4201-4204 (2005).
29. Matsuda, T., Matsubara, T. & Hino, S. Immunogenic and allergenic potentials of natural and recombinant innocuous proteins. *J. Biosci. Bioeng.* **101**, 203-211 (2006).

30. Bohle, B. T-cell epitopes of food allergens. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **30**, 97-108 (2006).
31. Vitetta, E. S., Fernandez-Botran, R., Myers, C. D. & Sanders, V. M. Cellular interactions in the humoral immune response. *Adv. Immunol.* **45**, 1-105 (1989).
32. del, P. G. *et al.* IL-4 is an essential factor for the IgE synthesis induced in vitro by human T cell clones and their supernatants. *J. Immunol.* **140**, 4193-4198 (1988).
33. Charlesworth, E. N. The role of basophils and mast cells in acute and late reactions in the skin. *Allergy* **52**, 31-43 (1997).
34. Galli, S. J. Mast cells and basophils. *Curr. Opin. Hematol.* **7**, 32-39 (2000).
35. Pawankar, R. Mast cells in allergic airway disease and chronic rhinosinusitis. *Chem. Immunol. Allergy* **87**, 111-129 (2005).
36. Bieber, T. *et al.* Human epidermal Langerhans cells express the high affinity receptor for immunoglobulin E (Fc epsilon RI). *J. Exp. Med* **175**, 1285-1290 (1992).
37. Schwartz, L. B. Mast cells: function and contents. *Curr. Opin. Immunol.* **6**, 91-97 (1994).
38. Greenfeder, S., Umland, S. P., Cuss, F. M., Chapman, R. W. & Egan, R. W. Th2 cytokines and asthma. The role of interleukin-5 in allergic eosinophilic disease. *Respir. Res.* **2**, 71-79 (2001).
39. Romagnani, S. Cytokines and chemoattractants in allergic inflammation. *Mol. Immunol.* **38**, 881-885 (2002).
40. Christie, P. E. & Henderson, W. R., Jr. Lipid inflammatory mediators: leukotrienes, prostaglandins, platelet-activating factor. *Clin. Allergy Immunol.* **16**, 233-254 (2002).
41. Peters-Golden, M. & Henderson, W. R., Jr. The role of leukotrienes in allergic rhinitis. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* **94**, 609-618 (2005).
42. Fireman, P. Understanding asthma pathophysiology. *Allergy Asthma Proc.* **24**, 79-83 (2003).
43. NOON, L. Prophylactic inoculation against hay fever. *Lancet* **1**, 572-573 (1911).
44. Ciprandi, G., Marseglia, G. L. & Tosca, M. A. Allergen-specific immunotherapy: an update on immunological mechanisms of action. *Monaldi Arch. Chest Dis.* **65**, 34-37 (2006).

45. Bellinghausen, I. *et al.* Insect venom immunotherapy induces interleukin-10 production and a Th2-to-Th1 shift, and changes surface marker expression in venom-allergic subjects. *Eur. J. Immunol.* **27**, 1131-1139 (1997).
46. Rogala, B. Risk and safety of immunotherapy. *Allergy* **53**, 473-476 (1998).
47. Gidaro, G. B. *et al.* The safety of sublingual-swallow immunotherapy: an analysis of published studies. *Clin. Exp. Allergy* **35**, 565-571 (2005).
48. Didier, A. Future developments in sublingual immunotherapy. *Allergy* **61 Suppl 81**, 29-31 (2006).
49. Chang, T. W. & Shiung, Y. Y. Anti-IgE as a mast cell-stabilizing therapeutic agent. *J. Allergy Clin. Immunol.* **117**, 1203-1212 (2006).
50. Strunk, R. C. & Bloomberg, G. R. Omalizumab for asthma. *N. Engl. J. Med* **354**, 2689-2695 (2006).
51. Simon, D., Braathen, L. R. & Simon, H. U. Anti-interleukin-5 antibody therapy in eosinophilic diseases. *Pathobiology* **72**, 287-292 (2005).
52. Spiegelberg, H. L. & Raz, E. DNA-based approaches to the treatment of allergies. *Curr. Opin. Mol. Ther.* **4**, 64-71 (2002).
53. Klostermann, B. *et al.* Modification of the human allergic immune response by allergen-DNA-transfected dendritic cells in vitro. *J. Allergy Clin. Immunol.* **113**, 327-333 (2004).
54. Bellinghausen, I. *et al.* Inhibition of human allergic T-cell responses by IL-10-treated dendritic cells: differences from hydrocortisone-treated dendritic cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* **108**, 242-249 (2001).
55. Bellinghausen, I. *et al.* Interleukin-10-Treated Dendritic Cells Do Not Inhibit Th2 Immune Responses in Ovalbumin/Alum-Sensitized Mice. *Int. Arch. Allergy Immunol.* **141**, 61-69 (2006).
56. Steinman, R. M., Lustig, D. S. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. 3. Functional properties in vivo. *J. Exp. Med.* **139**, 1431-1445 (1974).
57. Steinman, R. M. & Cohn, Z. A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. *J. Exp. Med.* **137**, 1142-1162 (1973).
58. Moser, M. & Murphy, K. M. Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development. *Nat. Immunol.* **1**, 199-205 (2000).
59. O'Byrne, P. M. Cytokines or their antagonists for the treatment of asthma. *Chest* **130**, 244-250 (2006).



60. Steinman, R. M. & Swanson, J. The endocytic activity of dendritic cells. *J. Exp. Med.* **182**, 283-288 (1995).
61. Engering, A. J. *et al.* The mannose receptor functions as a high capacity and broad specificity antigen receptor in human dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* **27**, 2417-2425 (1997).
62. Sallusto, F., Cella, M., Danieli, C. & Lanzavecchia, A. Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* **182**, 389-400 (1995).
63. Bluestone, J. A. New perspectives of CD28-B7-mediated T cell costimulation. *Immunity.* **2**, 555-559 (1995).
64. Makgoba, M. W. *et al.* ICAM-1 a ligand for LFA-1-dependent adhesion of B, T and myeloid cells. *Nature* **331**, 86-88 (1988).
65. Teft, W. A., Kirchhof, M. G. & Madrenas, J. A molecular perspective of CTLA-4 function. *Annu. Rev. Immunol.* **24**, 65-97 (2006).
66. Beier, K. C. *et al.* Induction, binding specificity and function of human ICOS. *Eur. J. Immunol.* **30**, 3707-3717 (2000).
67. Hutloff, A. *et al.* ICOS is an inducible T-cell co-stimulator structurally and functionally related to CD28. *Nature* **397**, 263-266 (1999).
68. Bellinghausen, I., Klostermann, B., Bottcher, I., Knop, J. & Saloga, J. Importance of the inducible costimulator molecule for the induction of allergic immune responses and its decreased expression on T helper cells after venom immunotherapy. *Immunology* **112**, 80-86 (2004).
69. McKenzie, G. J. *et al.* Impaired development of Th2 cells in IL-13-deficient mice. *Immunity.* **9**, 423-432 (1998).
70. Barner, M., Mohrs, M., Brombacher, F. & Kopf, M. Differences between IL-4R alpha-deficient and IL-4-deficient mice reveal a role for IL-13 in the regulation of Th2 responses. *Curr. Biol.* **8**, 669-672 (1998).
71. Padilla, J. *et al.* IL-13 regulates the immune response to inhaled antigens. *J. Immunol.* **174**, 8097-8105 (2005).
72. Shuai, K. & Liu, B. Regulation of JAK-STAT signalling in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 900-911 (2003).
73. Kurata, H., Lee, H. J., O'Garra, A. & Arai, N. Ectopic expression of activated Stat6 induces the expression of Th2-specific cytokines and transcription factors in developing Th1 cells. *Immunity.* **11**, 677-688 (1999).
74. Shimoda, K. *et al.* Lack of IL-4-induced Th2 response and IgE class switching in mice with disrupted Stat6 gene. *Nature* **380**, 630-633 (1996).

75. Valk, E., Zahn, S., Knop, J. & Becker, D. JAK/STAT pathways are not involved in the direct activation of antigen-presenting cells by contact sensitizers. *Arch. Dermatol. Res.* **294**, 163-167 (2002).
76. Afkarian, M. *et al.* T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naive CD4<sup>+</sup> T cells. *Nat. Immunol.* **3**, 549-557 (2002).
77. Zheng, W. & Flavell, R. A. The transcription factor GATA-3 is necessary and sufficient for Th2 cytokine gene expression in CD4 T cells. *Cell* **89**, 587-596 (1997).
78. Nakamura, Y. *et al.* Gene expression of the GATA-3 transcription factor is increased in atopic asthma. *J. Allergy Clin. Immunol.* **103**, 215-222 (1999).
79. Ouyang, W. *et al.* Inhibition of Th1 development mediated by GATA-3 through an IL-4-independent mechanism. *Immunity.* **9**, 745-755 (1998).
80. Alexander, W. S. Suppressors of cytokine signalling (SOCS) in the immune system. *Nat. Rev. Immunol.* **2**, 410-416 (2002).
81. Hilton, D. J. *et al.* Twenty proteins containing a C-terminal SOCS box form five structural classes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **95**, 114-119 (1998).
82. Naka, T. *et al.* Structure and function of a new STAT-induced STAT inhibitor. *Nature* **387**, 924-929 (1997).
83. Matsumoto, A. *et al.* Suppression of STAT5 functions in liver, mammary glands, and T cells in cytokine-inducible SH2-containing protein 1 transgenic mice. *Mol. Cell Biol.* **19**, 6396-6407 (1999).
84. Yasukawa, H. *et al.* The JAK-binding protein JAB inhibits Janus tyrosine kinase activity through binding in the activation loop. *EMBO J.* **18**, 1309-1320 (1999).
85. Nicholson, S. E. *et al.* Mutational analyses of the SOCS proteins suggest a dual domain requirement but distinct mechanisms for inhibition of LIF and IL-6 signal transduction. *EMBO J.* **18**, 375-385 (1999).
86. Nicola, N. A. *et al.* Negative regulation of cytokine signaling by the SOCS proteins. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* **64**, 397-404 (1999).
87. Sasaki, A. *et al.* CIS3/SOCS-3 suppresses erythropoietin (EPO) signaling by binding the EPO receptor and JAK2. *J. Biol. Chem.* **275**, 29338-29347 (2000).
88. Nicholson, S. E. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-3 preferentially binds to the SHP-2-binding site on the shared cytokine receptor subunit gp130. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **97**, 6493-6498 (2000).
89. Hansen, J. A., Lindberg, K., Hilton, D. J., Nielsen, J. H. & Billestrup, N. Mechanism of inhibition of growth hormone receptor signaling by suppressor of cytokine signaling proteins. *Mol. Endocrinol.* **13**, 1832-1843 (1999).

90. Cohnen, S. J. *et al.* SOCS-3 is tyrosine phosphorylated in response to interleukin-2 and suppresses STAT5 phosphorylation and lymphocyte proliferation. *Mol. Cell Biol.* **19**, 4980-4988 (1999).
91. Kamura, T. *et al.* The Elongin BC complex interacts with the conserved SOCS-box motif present in members of the SOCS, ras, WD-40 repeat, and ankyrin repeat families. *Genes Dev.* **12**, 3872-3881 (1998).
92. Zhang, J. G. *et al.* The conserved SOCS box motif in suppressors of cytokine signaling binds to elongins B and C and may couple bound proteins to proteasomal degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **96**, 2071-2076 (1999).
93. Yu, C. L. & Burakoff, S. J. Involvement of proteasomes in regulating Jak-STAT pathways upon interleukin-2 stimulation. *J. Biol. Chem.* **272**, 14017-14020 (1997).
94. Verdier, F. *et al.* Proteasomes regulate erythropoietin receptor and signal transducer and activator of transcription 5 (STAT5) activation. Possible involvement of the ubiquitinated Cis protein. *J. Biol. Chem.* **273**, 28185-28190 (1998).
95. Chai, S. K., Nichols, G. L. & Rothman, P. Constitutive activation of JAKs and STATs in BCR-Abl-expressing cell lines and peripheral blood cells derived from leukemic patients. *J. Immunol.* **159**, 4720-4728 (1997).
96. Frank, D. A., Mahajan, S. & Ritz, J. B lymphocytes from patients with chronic lymphocytic leukemia contain signal transducer and activator of transcription (STAT) 1 and STAT3 constitutively phosphorylated on serine residues. *J. Clin. Invest* **100**, 3140-3148 (1997).
97. Gouilleux-Gruart, V. *et al.* STAT-related transcription factors are constitutively activated in peripheral blood cells from acute leukemia patients. *Blood* **87**, 1692-1697 (1996).
98. Kubo, M. & Inoue, H. Suppressor of cytokine signaling 3 (SOCS3) in Th2 cells evokes Th2 cytokines, IgE, and eosinophilia. *Curr. Allergy Asthma Rep.* **6**, 32-39 (2006).
99. Seki, Y. *et al.* SOCS-3 regulates onset and maintenance of T(H)2-mediated allergic responses. *Nat. Med* **9**, 1047-1054 (2003).
100. Egwuagu, C. E. *et al.* Suppressors of cytokine signaling proteins are differentially expressed in Th1 and Th2 cells: implications for Th cell lineage commitment and maintenance. *J. Immunol.* **168**, 3181-3187 (2002).
101. Chen, Z. *et al.* Selective regulatory function of Socs3 in the formation of IL-17-secreting T cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **103**, 8137-8142 (2006).
102. Romani, N. *et al.* Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Methods* **196**, 137-151 (1996).

103. Laemmli, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685 (1970).
104. Weisser, M., Haferlach, T., Schoch, C., Hiddemann, W. & Schnittger, S. The use of housekeeping genes for real-time PCR-based quantification of fusion gene transcripts in acute myeloid leukemia. *Leukemia* **18**, 1551-1553 (2004).
105. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-408 (2001).
106. Rescigno, M., Granucci, F. & Ricciardi-Castagnoli, P. Molecular events of bacterial-induced maturation of dendritic cells. *J. Clin. Immunol.* **20**, 161-166 (2000).
107. Bhor, V. M., Thomas, C. J., Surolia, N. & Surolia, A. Polymyxin B: An ode to an old antidote for endotoxic shock. *Mol. Biosyst.* **1**, 213-222 (2005).
108. Pulaski, E. J., Baker, H. J., Rosenberg, M. L. & Connell, J. F. LABORATORY AND CLINICAL STUDIES OF POLYMYXIN B AND E. *J. Clin. Invest* **28**, 1028-1031 (1949).
109. Allakhverdi, Z., Bouguermouh, S., Rubio, M. & Delespesse, G. Adjuvant activity of pollen grains. *Allergy* **60**, 1157-1164 (2005).
110. Yang, J. S. *et al.* Endotoxin contamination in commercially available pokeweed mitogen contributes to the activation of murine macrophages and human dendritic cell maturation. *Clin. Vaccine Immunol.* **13**, 309-313 (2006).
111. Vallhov, H. *et al.* The Importance of an Endotoxin-Free Environment during the Production of Nanoparticles Used in Medical Applications. *Nano. Lett.* **6**, 1682-1686 (2006).
112. CONDIE, R. M., ZAK, S. J. & GOOD, R. A. Effect of meningococcal endotoxin on the immune response. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* **90**, 355-360 (1955).
113. Hoebe, K. *et al.* Upregulation of costimulatory molecules induced by lipopolysaccharide and double-stranded RNA occurs by Trif-dependent and Trif-independent pathways. *Nat. Immunol.* **4**, 1223-1229 (2003).
114. Agnello, D. *et al.* Cytokines and transcription factors that regulate T helper cell differentiation: new players and new insights. *J. Clin. Immunol.* **23**, 147-161 (2003).
115. Yu, C. R. *et al.* Cell proliferation and STAT6 pathways are negatively regulated in T cells by STAT1 and suppressors of cytokine signaling. *J. Immunol.* **173**, 737-746 (2004).
116. Crespo, A., Filla, M. B., Russell, S. W. & Murphy, W. J. Indirect induction of suppressor of cytokine signalling-1 in macrophages stimulated with bacterial

- lipopolysaccharide: partial role of autocrine/paracrine interferon-alpha/beta. *Biochem. J.* **349**, 99-104 (2000).
117. Dalpke, A. H., Opper, S., Zimmermann, S. & Heeg, K. Suppressors of cytokine signaling (SOCS)-1 and SOCS-3 are induced by CpG-DNA and modulate cytokine responses in APCs. *J. Immunol.* **166**, 7082-7089 (2001).
118. Kinjyo, I. *et al.* SOCS1/JAB is a negative regulator of LPS-induced macrophage activation. *Immunity.* **17**, 583-591 (2002).
119. Nakagawa, R. *et al.* SOCS-1 participates in negative regulation of LPS responses. *Immunity.* **17**, 677-687 (2002).
120. Hanada, T. *et al.* Suppressor of cytokine signaling-1 is essential for suppressing dendritic cell activation and systemic autoimmunity. *Immunity.* **19**, 437-450 (2003).
121. Yasukawa, H. *et al.* IL-6 induces an anti-inflammatory response in the absence of SOCS3 in macrophages. *Nat. Immunol.* **4**, 551-556 (2003).
122. Suzuki, A. *et al.* CIS3/SOCS3/SSI3 plays a negative regulatory role in STAT3 activation and intestinal inflammation. *J. Exp. Med.* **193**, 471-481 (2001).
123. de Jong, E. C., Smits, H. H. & Kapsenberg, M. L. Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Semin. Immunopathol.* **26**, 289-307 (2005).
124. Parham, C. *et al.* A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J. Immunol.* **168**, 5699-5708 (2002).
125. Lugo-Villarino, G., Maldonado-Lopez, R., Possemato, R., Penaranda, C. & Glimcher, L. H. T-bet is required for optimal production of IFN-gamma and antigen-specific T cell activation by dendritic cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 7749-7754 (2003).
126. Kadowaki, N. *et al.* Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J. Exp. Med.* **194**, 863-869 (2001).
127. Belladonna, M. L. *et al.* IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells. *J. Immunol.* **168**, 5448-5454 (2002).
128. Frucht, D. M. *et al.* IFN-gamma production by antigen-presenting cells: mechanisms emerge. *Trends Immunol.* **22**, 556-560 (2001).
129. Pulendran, B. *et al.* Developmental pathways of dendritic cells in vivo: distinct function, phenotype, and localization of dendritic cell subsets in FLT3 ligand-treated mice. *J. Immunol.* **159**, 2222-2231 (1997).
130. Kalinski, P. & Moser, M. Consensual immunity: success-driven development of T-helper-1 and T-helper-2 responses. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 251-260 (2005).

131. Kapsenberg, M. L. & Kalinski, P. The concept of type 1 and type 2 antigen-presenting cells. *Immunol. Lett.* **69**, 5-6 (1999).
132. Tas, S. W. *et al.* Selective inhibition of NF-kappaB in dendritic cells by the NEMO-binding domain peptide blocks maturation and prevents T cell proliferation and polarization. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1164-1174 (2005).
133. Rissoan, M. C. *et al.* Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* **283**, 1183-1186 (1999).
134. Li, Y., Chu, N., Rostami, A. & Zhang, G. X. Dendritic cells transduced with SOCS-3 exhibit a tolerogenic/DC2 phenotype that directs type 2 Th cell differentiation in vitro and in vivo. *J. Immunol.* **177**, 1679-1688 (2006).
135. Parronchi, P. *et al.* Allergen- and bacterial antigen-specific T-cell clones established from atopic donors show a different profile of cytokine production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **88**, 4538-4542 (1991).
136. Bueno, C. *et al.* Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and incubation periods. *Cytometry* **46**, 33-40 (2001).
137. Hammer, M. *et al.* Dual specificity phosphatase 1 (DUSP1) regulates a subset of LPS-induced genes and protects mice from lethal endotoxin shock. *J. Exp. Med* **203**, 15-20 (2006).

## VI Zusammenfassung

Allergische Erkrankungen, wie zum Beispiel die allergische Rhinitis, die allergische Konjunktivitis oder das allergische Asthma haben im Verlauf der letzten vier Jahrzehnte extrem stark zugenommen. So leidet heute jeder vierte bis fünfte Mensch an einer Allergie. Ausgelöst wird diese Hypersensibilitätsreaktion des Typs I von Allergenen: kleine, meist wasserlösliche Proteine mit einem Molekulargewicht von 10 bis 50 Kilodalton, die auf kleinen Partikeln vorkommen und über diese in den Organismus gelangen.

Bedingt durch die sehr schnell auftretenden Symptome wird diese Form der Allergie auch Allergie vom Soforttyp genannt. Die Reaktion ist IgE-vermittelt und beruht auf der Aktivierung von Mastzellen durch die Interaktion eines Allergens mit dem an eine Mastzelle über die  $Fc\epsilon$ -Rezeptoren gebundenen IgE-Molekül. Die degranulierende Mastzelle sezerniert Mediatoren, was innerhalb von wenigen Minuten zu einem Auftreten von allergischen Symptomen führt. Die Bildung von IgE wird durch das von  $T_H2$ -Zellen produzierte Zytokin IL-4 induziert. Das von  $T_H1$ -Zellen produzierte Zytokin  $IFN-\gamma$  ist in der Lage die Sekretion von IL-4 zu inhibieren, wie auch IL-4 hemmend auf die Produktion von  $IFN-\gamma$  wirkt. Dieses  $T_H1$ -/ $T_H2$ -Gleichgewicht ist bei allergischen Erkrankungen in Richtung  $T_H2$  verschoben.

In den Körper gelangte Allergene werden von antigenpräsentierenden Zellen aufgenommen, prozessiert und auf der Zelloberfläche präsentiert. Die bis heute als potentesten bekannten antigenpräsentierenden Zellen sind die dendritischen Zellen, die ihren Namen aufgrund der charakteristischen Fortsätze tragen. Sie wandern nach Kontakt mit einem Allergen in die benachbarten Lymphknoten, wo sie ausreifen und kostimulatorische Moleküle exprimieren. Über diese sind sie in der Lage T-Zellen zu aktivieren und entweder in  $T_H1$ - oder in  $T_H2$ -Zellen differenzieren zu lassen.

Die zytokinabhängige  $T_H1$ - beziehungsweise  $T_H2$ -Entwicklung führt zur Aktivierung der Januskinasen. Im aktiven Zustand phosphorylieren sie STAT-Moleküle, die dimerisieren und in den Zellkern translozieren, wo sie unter anderem als Transkriptionsfaktoren für Zytokingene dienen. Unreife humane dendritische Zellen von Allergikern zeigen nach Stimulation mit Proteinallergenen eine schnelle Phosphorylierung des mit der  $T_H2$ -Entwicklung assoziierten STAT6. Dahingegen sind

T<sub>H</sub>1-Antwort hervorrufende Kontaktallergene nicht in der Lage STAT6 oder andere STAT-Moleküle in dendritischen Zellen zu induzieren. Die Transkriptionsfaktoren T-bet und GATA3 sind ebenfalls von Bedeutung für die T<sub>H</sub>1-/T<sub>H</sub>2-Entwicklung, da T-bet ausschließlich in T<sub>H</sub>1-Zellen, GATA3 nur in T<sub>H</sub>2-Zellen exprimiert wird.

Die Regulation der Zytokinsignaltransduktion über den JAK/STAT-Weg unterliegt den Molekülen der intrazellulär vorkommenden Familie der SOCS-Proteine. Im allergischen Mausmodell gibt es Hinweise, die auf die Beteiligung der SOCS-Moleküle an der allergischen Erkrankung schließen lassen. So sind SOCS3 und SOCS5 prädominant in T<sub>H</sub>2-Zellen exprimiert und SOCS3 *-/-* Mäuse zeigen eine verminderte T<sub>H</sub>2-Entwicklung. SOCS3 ist in T<sub>H</sub>2-Zellen höher exprimiert als SOCS1, wohingegen SOCS1 in T<sub>H</sub>1-Zellen eine erhöhte Expression gegenüber SOCS3 aufweist.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Proteinallergenen auf humane dendritische Zellen untersucht. Zunächst konnte eine morphologische Veränderung der unreifen dendritischen Zellen nach Kontakt mit dem Allergenextrakt beobachtet werden. Die beginnende Ausreifung der Zellen konnte mittels Durchflußzytometrie anhand der kostimulatorischen Moleküle CD80 und CD86, insbesondere aber über den Marker für reife dendritische Zellen CD83, nachgewiesen werden. Die zu beobachtende beginnende Ausreifung scheint ein Effekt des bakteriellen Lipopolysaccharids (LPS) zu sein, das in dem Allergenextrakt vorkommt, da sich durch Zugabe des kationischen Antibiotikums Polymyxin B die beginnende Reifung verhindern ließ.

Auf RNA-Ebene war es im Rahmen dieser Arbeit möglich, den Einfluss verschiedener Allergene auf unreife humanen dendritischen Zellen mittels molekularbiologischer Methoden näher zu charakterisieren. So weisen unreife humane dendritische Zellen nach Kontakt mit Proteinallergenextrakt ein T<sub>H</sub>2-assoziiertes Genexpressionprofil auf, was sich durch eine erhöhte relative Expression der Gene SOCS3 und GATA3 auszeichnet. Im Gegensatz hierzu zeigen unreife humane dendritische Zellen nach Inkubation mit dem Kontaktallergen MCI/MI eine erhöhte relative Expression des Gens *T-bet*, was mit einer T<sub>H</sub>1-Antwort assoziiert ist. Nach Zugabe des „T<sub>H</sub>1/T<sub>H</sub>2-neutralen“ Tetanustoxoids konnten erhöhte relative Expressionen der Gene GATA3, *T-bet* und SOCS3 gemessen werden. Die Ergebnisse in dem in dieser Arbeit benutzten humanen *in vitro* System geben Anlass



zur Hypothese, dass die Art der Immunantwort ( $T_H1$  versus  $T_H2$ ) sich bereits auf Ebene der dendritischen Zellen anbahnt.

GeneChip-Analysen mittels High Density Micro Arrays von unreifen humanen dendritischen Zellen, die entweder mit Proteinallergenextrakt oder mit LPS in Berührung kamen, zeigten statistisch signifikant regulierte Gene, die jedoch keine Gemeinsamkeiten aufwiesen. Es konnten für die mit Allergenextrakt gepulsten dendritischen Zellen insgesamt 10 Gene identifiziert werden, jedoch gelang es nicht, diese näher zu deuten oder in einen Zusammenhang mit der allergischen Erkrankung oder der dendritischen Zelle zu bringen. Für die mit LPS, dem stärkeren Stimulus, gepulsten dendritischen Zellen konnten 40 Gene identifiziert werden, die unter anderem für die Maturierung der dendritischen Zelle verantwortlich sind. Zudem war es möglich, die Daten der Arrays auf Proteinebene exemplarisch anhand des Chemokins CXCL2 (Gro- $\beta$ ) zu verifizieren.