

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

**Mechanistische Untersuchung der Makrophagen-Aktivierung
durch das Fusionsprotein rFlaA:Betv1**

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

Vorgelegt von

Garibald Papp
aus Lippstadt

Mainz, 2024

Wissenschaftlicher Vorstand: Univ.-Prof. Dr. Hansjörg Schild

Tag der Promotion: 14. Mai 2025

Inhaltsverzeichnis

I. Abkürzungsverzeichnis	1
II. Abbildungsverzeichnis	4
III. Tabellenverzeichnis	4
1 Einleitung	5
1.1 Zielsetzung der Arbeit	5
1.2 Das Immunsystem	6
1.2.1 Angeborenes und erworbenes Immunsystem	6
1.2.2 APZ und Toll-like-Rezeptoren	7
1.2.3 T-Zellen	8
1.2.3.1 CD4 ⁺ -T-Zellen	8
1.2.3.2 Th1-Zellen	10
1.2.3.3 Th2-Zellen	10
1.2.3.4 Regulatorische T-Zellen	10
1.2.3.5 CD8 ⁺ -T-Zellen	11
1.2.4 Zytokine	11
1.3 Vakzinierung und Allergie	12
1.3.1 Typ-I-Allergie	13
1.3.2 Allergenspezifische Immuntherapie	14
1.3.3 Adjuvantien in Vakzinen und Allergentherapeutika	15
1.4 Stimulationsproteine Bet v 1, FlaA und rFlaA:Betv1	18
1.4.1 Bet v 1	18
1.4.2 Flagellin A	18
1.4.3 rFlaA:Betv1	19
1.5 Signaltransduktionswege in aktivierten Makrophagen	20
1.5.1 Immunmetabolismus	20
1.5.2 mTORC1	22
1.5.3 MAP-Kinasen und Inflammation	24
1.5.4 Der Inflammasom-Komplex reguliert die Produktion pyrogener Zytokine nach Kontakt mit verschiedenen Stimuli	26
1.6 Immunologische Merkmale der untersuchten Mausstämmе	29
2 Material	30
2.1 Grundmaterialien	30

2.2	Stimulationsproteine.....	35
2.3	Inhibitoren.....	35
2.4	Software	35
3	Methoden	36
3.1	Gewinnung Knochenmarks-abgeleiteter Makrophagen.....	36
3.1.1	Mäuse	36
3.1.2	Gewinnung der Knochenmarkszellen.....	36
3.1.3	Ausdifferenzierung der Makrophagen	37
3.2	Stimulation und Prä-Inhibition der Makrophagen.....	37
3.2.1	SDS-PAGE der Stimulationsproteine.....	38
3.2.2	Stimulation	39
3.2.3	Inhibition.....	40
3.3	Ko-Kultur Experimente	40
3.3.1	Generierung Bet v 1-spezifischer, Th2-geprimter T-Zellen	40
3.3.2	Ansetzen der Ko-Kulturen	41
3.4	Aliquotieren der Überstände	42
3.4.1	FACS	42
3.4.2	Bestimmung des Warburg-Effektes	43
3.4.3	Bestimmung der Glucose-Spiegel im Zellkulturmedium.....	43
3.4.4	Sandwich-ELISA	44
3.5	Statistische Auswertung.....	45
4	Ergebnisse	46
4.1	Die Stimulation der Knochenmarkszellen mit M-CSF zeigte eine erfolgreiche Differenzierung hin zu hochreinen BMDMs	46
4.2	Die Stimulationsproteine rBet v 1, rFlaA, die Mixtur rBet v 1 + rFlaA und rFlaA:Betv1 zeigen eine hohe Reinheit.....	49
4.3	Eine Vorbehandlung der murinen Knochenmarksmakrophagen mit den verwendeten Inhibitoren zeigt nur eine geringe Toxizität	50
4.4	Die Aktivierung der BMDMs durch rFlaA:Betv1 führt zur Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine sowie zur Aktivierung des Zellmetabolismus	51
4.5	Die Aktivierung des Metabolismus der BMDMs ist mTOR-abhängig, wohingegen die Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine nach 96 Stunden nicht stark mTOR-abhängig ist.....	55
4.6	Die rFlaA:Betv1-induzierte IL-10-Sekretion ist abhängig von der p38- und p42/44-MAP-Kinase, die Rolle dieser MAP-Kinasen für die Aktivierung des Metabolismus sowie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine ist nicht eindeutig.....	58

4.7	Die Inhibition der Caspasen mit Z-VAD-FMK führt zu keiner signifikanten Veränderung des Zellmetabolismus oder der Zytokinsekretion bei Fusionsprotein-stimulierten BMDMs	62
4.8	rFlaA:Betv1 unterdrückt Bet v 1-spezifische Th2-Antworten in allergenspezifischen, ex-vivo-isolierten CD4 ⁺ -T-Zellen	64
5	Diskussion	67
5.1	Flagellin-Fusionsproteine	67
5.2	Die Aktivierung des Glucosemetabolismus der BMDMs durch rFlaA:Betv1 wird begleitet von der Ausschüttung sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine	69
5.3	Die Aktivierung des Metabolismus der BMDMs ist mTOR-abhängig, die Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine ist nach 96 Stunden nicht stark mTOR-abhängig	70
5.4	Die MAP-Kinase-Inhibitoren SB202190 und U0126 haben keinen Effekt auf die rFlaA:Betv1-induzierte Aktivierung des Zellmetabolismus, inhibieren jedoch die Ausschüttung von IL-10 und verstärken die Sekretion von IL-6	71
5.5	Eine Inhibition des Inflammasoms hat keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung der BMDMs durch das Fusionsprotein	72
5.6	Das Fusionsprotein unterdrückt Bet v 1-spezifische Th2-Antworten in vitro	73
6	Fazit	76
IV	Literaturverzeichnis	78
V	Anhangsverzeichnis	87
VI	Danksagung	Error! Bookmark not defined.
VI	Lebenslauf	Error! Bookmark not defined.

I. Abkürzungsverzeichnis

AIT	Allergenspezifische Immuntherapie
Akt	Proteinkinase B
APS	Ammonium persulfate Ammoniumperoxodisulfat
APZ	Antigenpräsentierende Zelle(n)
ASC	Apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD Apoptose-assoziiertes Speck-ähnliches Protein mit einer Caspase-Rekrutierungs-Domäne
BMDM	Bone marrow-derived macrophage Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen
CD	Cluster of differentiation Differenzierungscluster
DAMP	Damage-associated molecular pattern Schaden-assoziierte molekulare Muster
EGFP	Enhanced green fluorescent protein Verbessertes grün fluoreszierendes Protein
ERK	Extracellular signal-regulated kinases Extrazellulär signalregulierte Kinasen
FACS	Fluorescence-activated cell sorting Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung
(G)M-CSF	(Granulocyte-) macrophage colony-stimulating factor (Granulozyten-) Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
HIF-1-alpha	Hypoxia-inducible factor 1-alpha Hypoxie-induzierbarer Faktor 1 alpha
IRAK1/2	Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1 bzw. 2
IFNγ	Interferon- γ
IL	Interleukin
JNK	C-Jun amino-terminal kinases C-Jun-N-terminale Kinasen
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	Magnetic-activated cell sorting Magnetisch aktivierte Zellsortierung
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
(m)DC	(Myeloide) dendritische Zelle(n)
MPLA	Monophosphoryl lipid A Monophosphoryl-Lipid A
mRNA	Messenger ribonucleic acid Boten-Ribonukleinsäure
mTOR	Mammalian target of rapamycin Ziel des Rapamycins im Säugetier
mTORC1	mTOR-Komplex 1
MyD88	Myeloid differentiation primary response 88 Primäre Antwort der myeloiden Differenzierung 88
NF-κB	Nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells Transkriptionsfaktor Kappa-Leichtketten-Verstärker aktivierter B-Zellen
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
NLR	Nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors

	Nukleotid-bindende Oligomerisationsdomäne (NOD)-ähnliche Rezeptoren
NLRC4	NOD-like receptor family CARD domain-containing protein 4 NOD-ähnlicher Rezeptor mit der Caspase-Rekrutierungs-Domäne 4
NLRP3	NOD-like receptor family, pyrin domain-containing protein 3 NOD-ähnliche Rezeptorfamilie mit Pyrin-Domäne 3
Ova	Ovalbumin
PAMP	Pathogen-associated molecular pattern Pathogen-assoziiertes molekulares Muster
PBS	Phosphate-buffered saline Phosphatgepufferte Salzlösung
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell Mononukleäre Zelle des peripheren Blutes
PFA	Paraformaldehyd
p38/SAPK	Stress-activated protein kinase Stress-aktivierte Proteinkinase
PRR	Pattern recognition receptor Mustererkennungsrezeptor
rBet v 1	Rekombinantes Hauptallergen 1 der Birkenpollen (<i>Betula verrucosa</i>)
rFlaA	Rekombinantes Flagellin A aus <i>Listeria monocytogenes</i>
rFlaA:Betv1	Rekombinantes Fusionsprotein aus FlaA and Bet v 1
FSC	Forward scatter Vorwärtsstreuung
rmM-CSF	Recombinant mouse macrophage colony-stimulating factor Rekombinanter Maus-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
RPTOR	Regulatory-associated protein of mTOR Regulatorisch assoziiertes Protein des mTOR
Ras/Raf/MEK/ERK	Rat sarcoma/Rapidly accelerated fibrosarcoma/Mitogen-activated protein kinase/Extracellular-signal-regulated kinases Ratten-Sarkom/Rasch beschleunigtes Fibrosarkom/Mitogen-aktivierte Proteinkinase/Extrazellulär signalregulierte Kinasen
RLR	Retinoic acid-inducible gene I receptors Retinsäure-induzierbare Gen-I-Rezeptoren
ROS	Reactive oxygen species Reaktive Sauerstoffspezies
RPM	Revolutions per minute Umdrehungen pro Minute
SAP/JNK MAPK	Stress-activated protein kinase/c-Jun NH2-terminal kinase Stressaktivierte Proteinkinase/c-Jun-N-terminale Kinase MAP-Kinase
SD	Standard deviation Standardabweichung
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese
SSC	Side scatter Seitenstreuung
ssDNA	Single-stranded deoxyribonucleic acid Einzelstrang-Desoxyribonukleinsäure
TAK1	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase 7
TEMED	Tetramethylethyldiamin

Th1/2	T-Helferzelle Typ 1 oder 2
TLR	Toll-like receptor Toll-ähnlicher Rezeptor
TMB	3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin
TNF-α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TRAF6	TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6
Tregs	Regulatory T cells Regulatorische T-Zellen
iTregs, pTregs	Induced (peripheral) T regulatory cells Induzierte (periphere) regulatorische T-Zellen
nTregs	Natural T regulatory lymphocytes Natürliche regulatorische T-Zellen
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
Tr1	T Regulatory Type 1 Cell Regulatorische Typ-1-T-Zelle
TSC1/2	Tuberous sclerosis complex protein 1 and 2 Hamartin und Tuberin
TZR	T-Zell-Rezeptor

II. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.....	9
Abbildung 2.....	15
Abbildung 3.....	23
Abbildung 4.....	28
Abbildung 5.....	47
Abbildung 6.....	48
Abbildung 7.....	49
Abbildung 8.....	50
Abbildung 9.....	53
Abbildung 10.....	54
Abbildung 11.....	57
Abbildung 12.....	60
Abbildung 13.....	61
Abbildung 14.....	63
Abbildung 15.....	66
Abbildung 16.....	75

III. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1.....	11
Tabelle 2.....	30
Tabelle 3.....	38
Tabelle 4.....	39
Tabelle 5.....	40
Tabelle 6.....	42

1 Einleitung

1.1 Zielsetzung der Arbeit

Die Inzidenz allergischer Erkrankungen nimmt in den westlichen Zivilisationen zu (Yoo et al., 2015, Brozek et al., 2015). Die Hyposensibilisierung bzw. allergenspezifische Immuntherapie (AIT) allergischer Patientinnen/Patienten stellt hierbei momentan die einzige krankheitsmodifizierende Therapieoption dar. Die Effektormechanismen der AIT sind noch nicht vollständig verstanden, beinhalten aber u. a. die Bildung einer T-Zell-Toleranz, eine Induktion regulatorischer T-Zellen sowie die durch u. a. IL-10 vermittelte Bildung neutralisierender IgG4Antikörper (Fujita et al., 2012). Der prinzipiellen Wirksamkeit dieser Therapien stehen jedoch der hohe Zeitaufwand, das Risiko der Auslösung lokaler Reaktionen und insbesondere die Gefahr systemischer anaphylaktischer Reaktionen gegenüber (Fujita et al., 2012, Krishna and Huissoon, 2011).

Fusionsproteine aus Allergen und Antigen können diese Behandlung verbessern (Blanco et al., 2019). Das bakterielle Antigen Flagellin aktiviert als Agonist des TLR5 (Toll-like-Rezeptor 5) effizient das Immunsystem und wurde bereits in mehreren wissenschaftlichen Arbeiten als erfolgreicher Fusionspartner zur Immunisierung beschrieben (Schulke et al., 2018, Schülke et al., 2016, Schülke et al., 2014, Schulke et al., 2010). Toll-like-Rezeptoren sind hochkonservierte Rezeptoren des Immunsystems, welche als Teil des angeborenen Immunsystems pathogene Strukturen erkennen können (Kapitel 1.2.2, 1.4.2). In der hier vorliegenden Arbeit wurde Flagellin mit Bet v 1, dem Hauptallergen der Birkenpollen, fusioniert (rFlaA:Betv1).

Makrophagen spielen als antigenpräsentierende Zellen eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von T-Zellen. Die Effekte von rFlaA:Betv1 auf humane PBMCs („*peripheral blood mononuclear cells*“) und murine myeloische dendritische Zellen (mDC) wurden bereits untersucht (Schulke et al., 2018). Dabei gelang es, eine durch rFlaA:Betv1 vermittelte mTOR („*mammalian target of rapamycin*“)-abhängige Aktivierung von mDC nachzuweisen. Darüber hinaus konnte bereits in einer Ko-Kultur von murinen allergenspezifischen CD4⁺-T-Helferzellen und mDC eine Unterdrückung der allergiespezifischen (Th2-assoziierten) IL-5-Ausschüttung nachgewiesen werden (Moeller et al., 2019, Schulke et al., 2018). Die Effekte von Flagellin-Antigen-Fusionsproteinen auf Makrophagen sind bisher jedoch noch nicht untersucht worden.

Das Ziel dieser Arbeit war es, im Mausmodell die immunmodulatorische Wirkung des rekombinanten Fusionsproteins rFlaA:Betv1 auf Makrophagen sowie auf ihre Interaktion mit CD4⁺-T-Zellen zu untersuchen, um an die o. g. Ergebnisse anzuknüpfen.

Hierfür wurden BMDMs und CD4⁺-T-Zellen aus BALB/c-Mäusen gewonnen. Diese wurden dann in zwei experimentellen Ansätzen weiter untersucht: Das erste experimentelle Set-up diente der genaueren Charakterisierung der rFlaA:Betv1-vermittelten Makrophagen-Aktivierung. Als Kontrollen wurden die Makrophagen parallel mit rBet v 1, rFlaA und der Mixtur der beiden Proteine stimuliert. Es wurden nachfolgend der Zellmetabolismus (Glucoseverbrauch sowie Warburg-Effekt), die Sekretion von Zytokinen (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α) und deren Abhängigkeit von verschiedenen Stoffwechselwegen und Signaltransduktionskaskaden durch Vorinkubation mit bestimmten Inhibitoren (Rapamycin, Z-VAD-FMK, SB202190, U0126) untersucht, um analog zu den Ergebnissen bezüglich der mDC Aussagen über die durch rFlaA:Betv1 aktivierten Signaltransduktionskaskaden treffen zu können.

In Ko-Kultur- Experimenten wurden im Anschluss BALB/c-Mäuse gegen rBet v 1 sensibilisiert. Die dadurch erzeugten Th2-geprägten CD4⁺-T-Zellen, welche aus den Milzen der Mäuse extrahiert und mithilfe von FACS-Analyse überprüft wurden, wurden dann in Ko-Kultur mit Makrophagen gebracht. Hierbei wurde untersucht, inwiefern sich die allergietypische Sekretion von Zytokinen (IL-2, IL-5, IL-6, IL-13) nach Restimulation mit dem Allergen durch Zugabe von entweder rFlaA:Betv1 bzw. der Mixtur von rFlaA und rBet v 1 unterdrücken lässt. Darüber hinaus wurde auch hier der Metabolismus (Glucoseverbrauch sowie Warburg-Effekt) in den Ko-Kulturen untersucht.

Zusammengenommen sollten die durchgeführten Experimente den Aktivierungszustand rFlaA:Betv1-stimulierter Makrophagen, die beteiligten Signaltransduktionswege und die immunmodulierende Kapazität der Zellen untersuchen.

1.2 Das Immunsystem

Das Immunsystem ist ein körpereigener Abwehrmechanismus zur Bekämpfung von Krankheitserregern und deren Toxinen.

1.2.1 Angeborenes und erworbenes Immunsystem

Auf die Infektion mit einem Krankheitserreger reagiert das Immunsystem in der Regel mit einer unmittelbaren, relativ unspezifischen Immunantwort und bald darauf mit einer auf den Erreger abgestimmten, spezifischen Immunantwort. In dem Paradigma des angeborenen und adaptiven, erworbenen Immunsystems werden bestimmte Komponenten, Mechanismen und Zellen ersterer bzw. letzterer Antwort zugeordnet (Černý and Stříž, 2019).

Beispiele für Funktionen des angeborenen (auch innaten) Immunsystems sind die vor allem zytokingesteuerte Rekrutierung weiterer Immunzellen, das Komplementsystem, Vasodilatation und Veränderung der Gewebsdurchlässigkeit, Aufbau physikalischer Barrieren und die Präsentation pathogener Antigene auf MHC-Molekülen (Iwasaki and Medzhitov, 2015, Černý and Stříž, 2019).

Dabei kann das angeborene Immunsystem bei der Erkennung von Pathogenen auf hochkonservierte Mustererkennungsrezeptoren (Vasou et al., 2017) zurückgreifen, auf welche im nächsten Unterkapitel eingegangen wird.

Das adaptive oder erworbene Immunsystem zeichnet sich dadurch aus, dass spezifische zelluläre und humorale Antworten gegen definierte Antigene der pathogenen Erreger entwickelt werden. Diese Adaption wird durch die komplexen Anpassungsmechanismen von T- und B-Zellen ermöglicht (Černý and Stříž, 2019). Epigenetische und metabolische Anpassungsmechanismen der Zellen des angeborenen Immunsystems lassen interessanterweise ebenfalls eine Anpassung in Form gedächtnisähnlicher Antworten zu, werden aber der angeborenen Immunantwort zugeordnet (Černý and Stříž, 2019).

1.2.2 APZ und Toll-like-Rezeptoren

Der Name der antigenpräsentierenden Zellen (APZ) leitet sich von ihrer Fähigkeit ab, Antigene gegenüber T-Zellen zu präsentieren.

Makrophagen, dendritische Zellen und B-Zellen zählen zur Gruppe der professionellen antigenpräsentierenden Zellen und spielen somit eine entscheidende Rolle bei der Einleitung adaptiver Immunantworten (Germic et al., 2019, Smith-Garvin et al., 2009). Erwähnenswerte Randnotiz ist an dieser Stelle, dass auch Endothelzellen die Fähigkeit besitzen, MHC-Klasse-II-Komplexe exprimieren zu können (Mai et al., 2013).

In antigenpräsentierenden Zellen werden phagozytierte Proteine lysosomal gespalten, die entstehenden Peptide an MHC-Klasse-II-Komplex gebunden und an der Zelloberfläche an CD4⁺-T-Zellen präsentiert. Somit bilden MHC-Klasse-II-Peptid-Komplexe eine Schlüsselverbindung zwischen der angeborenen und adaptiven Immunantwort (Mantegazza et al., 2013).

Dendritische Zellen übernehmen bei dieser Verbindung eine zentrale Rolle, indem sie periphere Gewebe überwachen und Antigene, mit denen sie in Kontakt getreten sind, in den nächstgelegenen sekundären lymphatischen Organen gegenüber T-Zellen präsentieren (Mellman, 2013).

PRRs („*pattern recognition receptors*“) befinden sich entweder auf den Oberflächen oder in Endosomen von z. B. antigenpräsentierenden Zellen, neutrophilen Granulozyten bzw. Epithelzellen. Sie dienen der Erkennung von PAMPs („*pathogen-associated molecular patterns*“) und DAMPs („*damage-associated molecular patterns*“) (Vasou et al., 2017). Zu den PRRs gehören die Familie der TLRs, welche unter anderem der Erkennung von Flagellin (TLR5), LPS (Lipopolysaccharide) (TLR4) oder ssDNA („*single-stranded deoxyribonucleic acid*“) (TLR7) dienen, die RLRs („*retinoic acid-inducible gene 1 receptors*“), die NLRs („*nucleotide-binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*“) und weitere (Vasou et al., 2017). Insbesondere die Familie der membranständigen bzw. endosomalen TLRs ist mittlerweile breit beschrieben in ihrer Wichtigkeit für die Einleitung inflammatorischer Prozesse als Reaktion auf PAMPs (Vasou et al., 2017, Li and Wu, 2021). Mit diesen inflammatorischen Prozessen geht in DC die Produktion von Zytokinen (insbesondere Interferonen), Chemokinen, eine Steigerung der Antigenpräsentation und die verstärkte Migration in lymphatisches Gewebe zur aktiven Gestaltung der Immunantwort einher (Vasou et al., 2017). Ein PAMP, welches somit die Zytokinsekretion der APZ beeinflusst, beeinflusst auch die Differenzierung der T-Zelle (s. u.). Vergleichbare Prozesse gelten auch für die Aktivierung von Makrophagen über diese Rezeptoren (Draijer and Peters-Golden, 2017, Guerriero, 2019).

B-Zellen können auf zwei Wegen aktiviert werden: Einerseits können Sie mithilfe ihres BZRs und PRRs eigenständig und ohne zusätzliche Stimulation durch aktivierte T-Zellen Antigene erkennen, andererseits können sie durch aktivierte T-Zellen, welche vorher durch eine APZ aktiviert wurden, aktiviert werden.

1.2.3 T-Zellen

T-Zellen werden nach ihrer Funktion in zwei verschiedene Klassen unterschieden, CD4⁺- und CD8⁺-T-Zellen. Ob eine Vorläuferzelle nach Ausbildung der Oberflächenantigene und Selektion nach Immuntoleranz eine höhere Affinität zu MHC-Klasse-I- bzw. -II-Komplexen zeigt, entscheidet in der Ontogenese der T-Zellen letztendlich darüber, welcher Subtyp entsteht (Kumar et al., 2018).

1.2.3.1 CD4⁺-T-Zellen

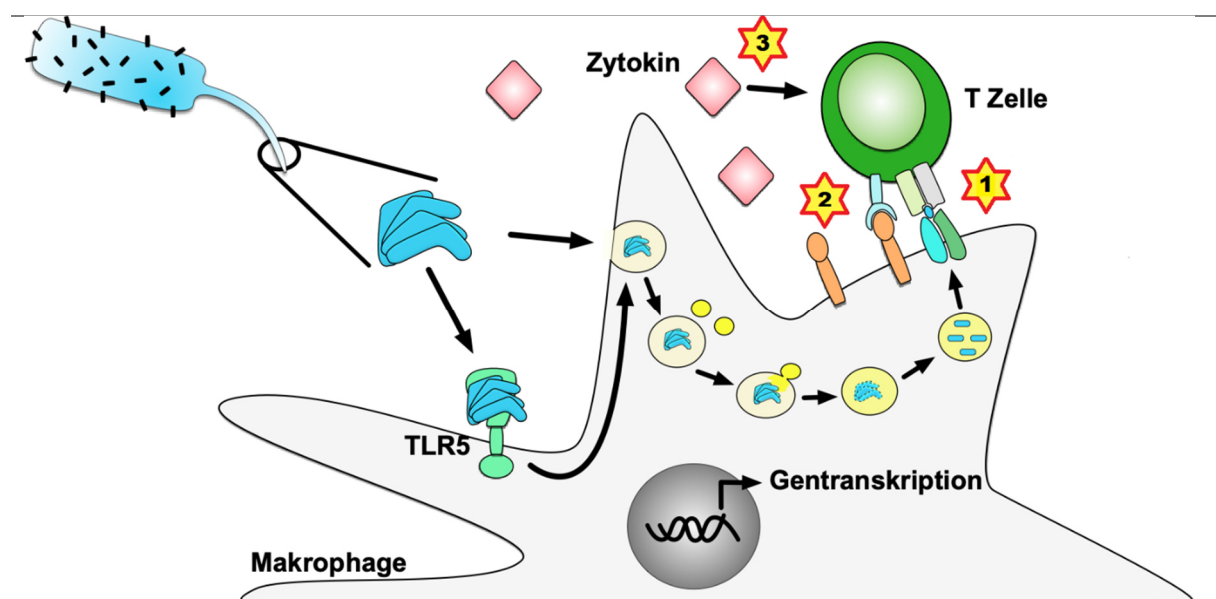
CD4⁺-T-Zellen spielen eine wichtige Rolle im adaptiven Immunsystem. Ihre Aktivierung lässt sich in drei Phasen einteilen, die Aktivierung, ein Überlebenssignal und das Signal zur Differenzierung (Smith-Garvin et al., 2009). Die Aktivierung der naiven T-Zelle erfolgt durch eine antigenpräsentierende Zelle, die mit dem MHC-Klasse-II-Peptid-Komplex an den T-Zell-Rezeptor andockt. Im Anschluss erfolgt das Überlebenssignal bzw. eine Kostimulation. Hierfür muss die T-Zelle ein weiteres Signal, welches nicht über den TZR vermittelt wird, erhalten.

Dies erfolgt u. a. durch die Oberflächenantigene der APZ, CD80 und CD86, welche an das Oberflächenantigen der CD4⁺-T-Helferzelle, CD28, binden. Bleibt eine zweite Stimulation aus, tritt die T-Zelle in einen Zustand der Anergie über (Smith-Garvin et al., 2009). CD28 spielt somit eine wichtige Rolle bei der Vermeidung autoimmuner T-Zell-Reaktionen (Smith-Garvin et al., 2009). Nach erfolgreicher Aktivierung sezerniert die T-Zelle im nächsten Schritt IL-2, dessen auto- und parakrine Wirkung eine Vielzahl von Effekten auf CD4⁺-T-Zellen entfaltet, in dessen Zentrum die Funktion als Wachstumsfaktor und Stimulator für T-Zellen steht. Es ermöglicht somit die klonale Expansion der aktivierten T-Zelle (Smith-Garvin et al., 2009, Luckheeram et al., 2012).

Die Zytokine im direkten Umfeld der aktivierten T-Zelle haben dabei einen Einfluss auf die Differenzierung der CD4⁺-T-Zelle in verschiedene Subtypen. Dieses Zytokinmilieu wird auch von der antigenpräsentierenden Zelle mit dem Profil ihrer Zytokinsekretion maßgeblich beeinflusst (Mosmann et al., 1986, Luckheeram et al., 2012).

Eine wichtige Funktion der aktivierten T-Zellen ist die Aktivierung von B-Zellen (welche dasselbe Peptid über ihren BZR erkennen) über die von ihnen sezernierten Zytokine (u. a. IL-2, IL-4, IFN γ) und den CD40-Liganden (Hoffman et al., 2016). Das Aufeinandertreffen der B-Zelle und T-Zelle mit derselben Antigenespezifität legt den Grundstein für die Bildung eines Keimzentrums in sekundären lymphatischen Organen als ersten Schritt in Richtung einer spezifischen Antikörperproduktion (Hoffman et al., 2016).

Abbildung 1



Eine Makrophage phagozytiert und verdaut Flagellin und aktiviert eine T-Zelle. Dabei erfolgen die drei Signale der T-Zellaktivierung. Die Erkennung durch den T-Zell-Rezeptor (1), die Koaktivierung durch kostimulatorische Moleküle (2) sowie die Aktivierung durch die von der T-Zelle und Makrophage sezernierten Zytokine (3).

1.2.3.2 Th1-Zellen

IL-12 und IFN γ spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung zu Typ-1-T-Helfer-Zellen, im Folgenden Th1 genannt (Luckheeram et al., 2012). Th1-Zellen leiten proinflammatorische zellvermittelte Reaktionen ein. Dies führt z. B. zur Abwehr intrazellulärer Pathogene (Luckheeram et al., 2012, Gor et al., 2003) sowie von Hypersensitivitätsreaktionen vom Spättyp, wie etwa die autoimmune Abstoßung von Organen (Luckheeram et al., 2012, Del Prete, 1992). Sie sezernieren IL-2 und IFN γ , jedoch kein IL-4 oder IL-5 (Del Prete, 1992).

1.2.3.3 Th2-Zellen

Für die Differenzierung zur Th2 sind vor allem die Zytokine IL-2 und IL-4 von Bedeutung. Erwähnenswert ist, dass IL-6 die Differenzierung zu Th2 verstärkt, während die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1 unterdrückt wird (Luckheeram et al., 2012). Th2-Zellen leiten humorale adaptive Immunantworten ein, in Folge ihrer Aktivierung kommt es zur IgG1- und IgE-Sekretion und damit u. a. zur Auslösung allergischer Reaktionen vom Soforttyp (Gor et al., 2003). Insbesondere IL-4 führt in beteiligten B-Zellen zum Antikörper-Switch zu IgE (Luckheeram et al., 2012). Wichtige sezernierte Zytokine der Th2-Zellen sind IL-4, IL-5, IL-9, IL-13, IL-10, IL-25 und Amphiregulin (Luckheeram et al., 2012). IL-2 oder IFN γ werden weniger häufig sezerniert (Del Prete, 1992).

Prinzipiell unterdrücken die von Th1- und Th2-Zellen sezernierten Zytokine die Differenzierung naiver T-Zellen in den jeweils anderen Subtyp, gleichzeitig ist dieses Prinzip jedoch von Ausnahmen geprägt. So führt das von Th2 sezernierte IL-13 beispielsweise dazu, dass Makrophagen und DC IL-12 sezernieren, welches wiederum die Differenzierung naiver T-Zellen zu Th1-Zellen fördert (Gor et al., 2003).

Bei der Sekretion der Zytokine IL-3, IL-6, GM-CSF, oder TNF- α überschneiden sich Th1- und Th2-Zellen (Del Prete, 1992).

1.2.3.4 Regulatorische T-Zellen

Regulatorische T-Zellen regulieren die erworbene Immunantwort (Zhang et al., 2014). Für die Unterdrückung allergischer Erkrankungen sind sie von großer Bedeutung. Die allergenspezifische Immuntherapie führt zur Erhöhung ihrer Aktivität (Akdis and Akdis, 2014, Wambre et al., 2012). Regulatorische T-Zellen sezernieren typischerweise IL-10 und TGF- β (Zhang et al., 2014). Außerdem zeigen nicht-allergische Menschen mit hoher Exposition gegenüber potenziellen Allergenen wie Bienengift oder Katzenhaar eine hohe Frequenz regulatorischer T-Zellen (Akdis and Akdis, 2014). Foxp3 (Forkhead-Box-Protein P3) ist ein für regulatorische T-Zellen typischer Transkriptionsfaktor, der von mehreren Subtypen regulatorischer T-Zellen ausgebildet wird (Zhang et al., 2014). Diese werden im Thymus

(nTregs „*natural T regulatory lymphocytes*“) oder außerhalb des Thymus (pTregs, iTregs „*induced (peripheral) T regulatory cells*“) generiert (Shevach and Thornton, 2014, Vignali et al., 2008). Tr1 („*type 1 regulatory T cells*“) sind interessanterweise Foxp3-negativ und entstehen hauptsächlich durch die Aktivierung durch DC und deren Sekretion von IL-10 (Roncarolo et al., 2018). Einzigartig an ihnen ist auch, dass sie ihre regulatorischen Funktionen erst durch Aktivierung des TZR entfalten (Roncarolo et al., 2018). Somit ist IL-10 für regulatorische T-Zellen sowohl ein wichtiges Induktions-Zytokin als auch ein wichtiges Effektor-Zytokin.

1.2.3.5 CD8⁺-T-Zellen

CD8⁺-T-Zellen dienen der Abwehr intrazellulärer Pathogene. Sie erkennen infizierte Zellen und entfalten ihnen gegenüber eine zytotoxische Wirkung (Zhang and Bevan, 2011). Auch sie exprimieren einen T-Zell-Rezeptor und werden über MHC-Klasse-I-Peptid-Komplexe aktiviert (Smith-Garvin et al., 2009). Die Apoptose infizierter Zellen können sie einerseits über die Bindung am Fas-Rezeptor, dem sogenannten „Todesrezeptor“, einleiten oder andererseits durch Sezernierung von Granzymen (Zelinskyy et al., 2004).

1.2.4 Zytokine

Zytokine sind von Zellen sezernierte Proteine, welche auto-, para- oder endokrine sowie pro- bzw. antiinflammatorische Wirkungen entfalten können (Zhang and An, 2007). Entsprechend tragend ist ihre Rolle für das Immunsystem. In der Tabelle 1 werden die zum Verständnis dieser Arbeit relevanten Zytokine aufgeführt (Kany et al., 2019, Bieber, 2020, Zhang and An, 2007, Hoffman et al., 2016).

Tabelle 1

Zytokin	Hauptquelle	Effekte
IL-1β	Neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen,	Akute-Phase-Reaktion, Kostimulation von APZ und T-Zellen, Inflammation, Hämatopoese (bei Kostimulation mit GM-CSF)
IL-2	Th1-Zellen, NK-Zellen	Proliferation aktivierter T-Zellen und B-Zellen
IL-4	Aktivierte T-Zellen	B-Zell-Proliferation, IgE, Stimulation eosinophiler Granulozyten und Mastzellen
IL-5	Th2-Zellen, Mastzellen	Stimulation eosinophiler Granulozyten
IL-6	Neutrophile Granulozyten, dendritische Zellen, Monozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, B-Zellen, T-Zellen, Makrophagen,	Synergistische (mit IL-1 β und TNF- α) Wirkung auf T-Zellen, Akute-Phase-Reaktion, B-Zell-Proliferation, Thrombopoese,
IL-10	Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen, T-Zellen (insbesondere aktivierte Th2-Zellen)	Entzündungshemmung, Inhibition der Zytokinsekretion

IL-12	B-Zellen, Makrophagen	Proliferation NK-Zellen, IFN γ -Produktion, Stimulation der zellulären Immunantwort
IL-13	Th2-Zellen	Ähnliches Aktivitätsprofil zu IL-4, betont peripher wirksam
IFNγ	Aktivierte Th1- und NK-Zellen	Stimulation der Expression von MHC-I auf somatischen Zellen und MHC-II auf APZ, aktiviert Makrophagen, neutrophile Granulozyten, NK-Zellen, Stimulation der zellulären Immunantwort
TNF-α	Neutrophile Granulozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, B-Zellen, T-Zellen, Monozyten	Verursacht Inflammation, Schmerzen, Zelltod und -überleben
Übersicht der für diese Arbeit relevanten Zytokine		

1.3 Vakzinierung und Allergie

Die Entdeckung der „Neuen Welt“ und die anschließende Einfuhr der damals in Europa vorhandenen Infektionskrankheiten hatte in der gegen diese Krankheiten naiven Bevölkerung Nord- und Südamerikas ein Massensterben von regional bis zu 90 % der Bevölkerung zur Folge (Naranjo, 1992). Dabei spielten neben Masern, Gelbfieber, Diphtherie und Typhus vor allem die Pocken eine entscheidende Rolle (Naranjo, 1992, Patterson and Runge, 2002). Mit dem Beginn der Impfung gegen die Pocken mit den Kuhpocken wurde durch Edward Jenner 1796 der Grundstein für die wissenschaftliche Entwicklung von Impfstoffen/Vakzinen gelegt (vgl. lat. vacca = Kuh) (Riedel, 2005). 1980 wurden die Pocken von der WHO für ausgerottet erklärt.

Das Ausmaß und die Abwendbarkeit des Schadens insbesondere neu auftretender Infektionskrankheiten durch den Einsatz von Impfungen sind angesichts der COVID19-Pandemie der Vergegenwärtigung im besonderen Maße würdige Themen.

Ansätze der Impfung gegen allergische Erkrankungen existieren bereits seit 1911 (Noon, 1911, Bachmann et al., 2020). Zwar nahm Leonard Noon noch an, es handele sich bei der Pollenallergie um eine durch ein Toxin vermittelte Erkrankung, doch konnte er zeigen, dass eine „Immunsierung“ gegen eine Allergie möglich war, und legte den Grundstein für die allergenspezifische Immuntherapie (Noon, 1911).

1.3.1 Typ-I-Allergie

Mit ihrem 1963 erschienenen Buch etablierten Coombs und Gell die noch heute in medizinischen Büchern kanonisch gelehrt vier Typen der allergischen Reaktion (Gell, 1963). Die Unterteilung in Sofort- (I), Zytotoxischen- (II), Immunkomplex- (III) und Spät-Typ (IV) ist insofern zu relativieren, dass es durchaus zu Überschneidungen zwischen den verschiedenen Typen kommen kann (Descotes and Choquet-Kastylevsky, 2001).

Bei der in dieser Arbeit beforschten Allergie gegen Bet v 1 einem Hauptbirkenpollenallergen, handelt es sich in erster Linie um eine Typ-I-Allergie (Wiedermann et al., 1999).

Die Typ-I-Allergie, wie sie bei der Birkenpollenallergie gegen verschiedene Epitope, darunter vordergründig Bet v 1, auftritt, entsteht durch eine fehlgeleitete Sensibilisierung des Immunsystems.

Nach der Phagozytose des Allergens präsentieren antigenpräsentierende Zellen dessen Peptide den CD4⁺-T-Helfer-Zellen. Dabei detektiert die T-Zelle mithilfe des T-Zell-Rezeptors das über den MHC-Klasse-II-Peptid-Komplex präsentierte Epitop und wird zusätzlich durch zwei weitere Mechanismen aktiviert: Einerseits erfolgt eine Kostimulation zwischen APZ und T-Zelle über bestimmte kostimulatorische Moleküle, und andererseits wird über lösliche extrazelluläre Signalgeber, z. B. Zytokine (Kap. 1.2.3.1), die T-Zelle zur Differenzierung in bestimmte Subtypen angeregt (van Ree et al., 2014).

So ist IL-4 als von den Th2-Zellen sezerniertes Zytokin ein dominanter Treiber der allergischen Reaktion. Zu seinen Effekten zählen die Differenzierung von T-Zellen hin zu Th2-Zellen, der Antikörperswitch von B-Zellen hin zu IgE-sezernierenden B-Zellen und die Expression von hochaffinen IgE-Rezeptoren auf Mastzellen und basophilen Granulozyten, an welche die produzierten allergenspezifischen IgE-Antikörper binden (Luckheeram et al., 2012). Der entscheidende Schritt, der die IL-4-Sekretion nach der o. g. Stimulation der naiven, allergenspezifischen T-Zellen initiiert, ist noch nicht vollständig verstanden (van Ree et al., 2014). Von besonderer Bedeutung ist hier ein bestimmter Zelltyp des angeborenen Immunsystems, welcher in allergischen Reaktionen die angeborene und erworbene Immunantwort verbindet: In Haut und Schleimhäuten lokalisierte ILC2 (*innate-like lymphoide Zellen vom Typ 2*) tragen entscheidend zur Entstehung allergischer Reaktionen bei und sezernieren gerade in der Initiationsphase allergischer Reaktionen unter anderem große Mengen an IL-4 und IL-13 (Martinez-Gonzalez et al., 2015, Noval Rivas et al., 2016).

Die Antigen-Antikörper-Bindung von Allergen und IgE-Antikörpern und die folgende Aktivierung von Mastzellen sowie basophilen Granulozyten, deren Degranulation dann spezifische Signalmoleküle freisetzt, darunter Histamine, Prostaglandine und

proinflammatorische Zytokine, führt schließlich zur Entwicklung der allergischen Entzündung mit den mit ihr assoziierten Symptomen (Abbas et al., 2021).

1.3.2 Allergenspezifische Immuntherapie

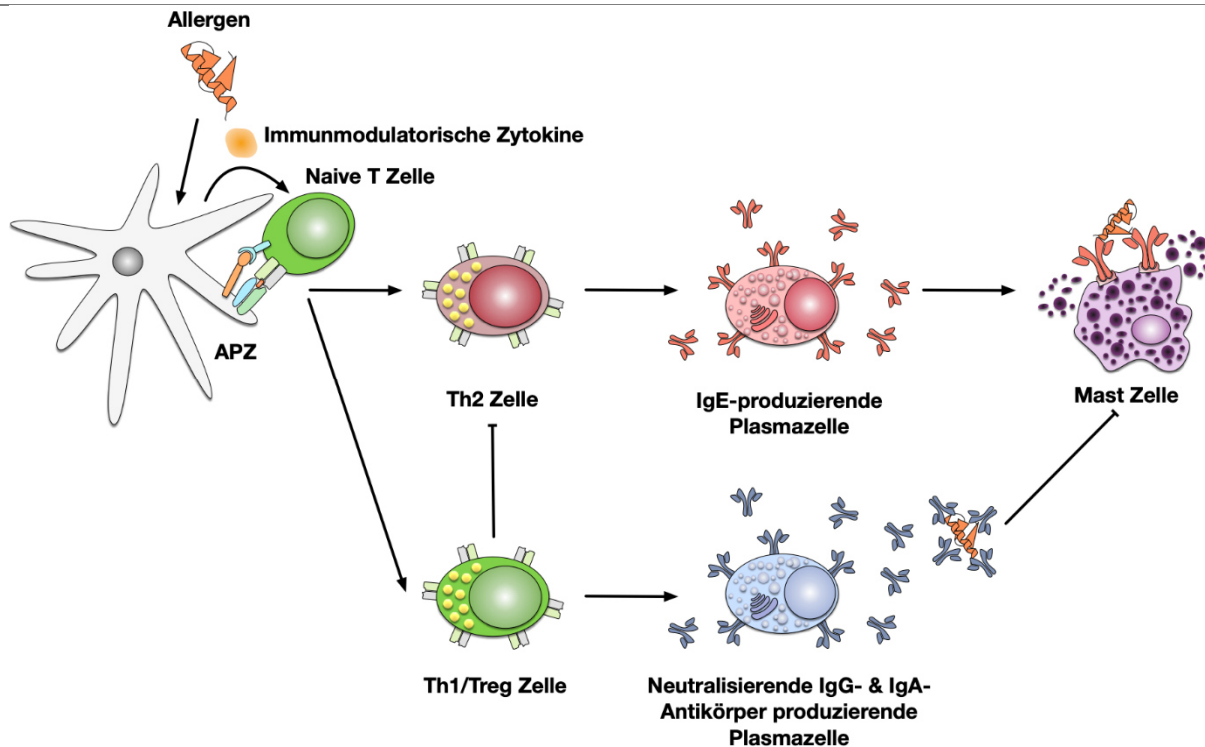
Wie oben bereits erwähnt, ist die einzige krankheitsmodulierende und nachhaltige Therapie allergischer Erkrankungen vom Typ I die allergenspezifische Immuntherapie (AIT) (Moote et al., 2018, Wiedermann et al., 1999, van der Valk et al., 2015).

Die AIT basiert auf der wiederholten Applikation des Allergens und einer daraus resultierenden Hyposensibilisierung (Abbildung 2). In der Therapie von Patienten/Patientinnen mit Allergien vom Soforttyp lässt sich die Hyposensibilisierung in zwei Phasen unterscheiden: In der Anfangsphase verringert sich dabei die Rekrutierung eosinophiler Granulozyten, basophiler Granulozyten und Mastzellen (van der Valk et al., 2015). Außerdem werden vermehrt allergenspezifische IgA- und IgG4-Antikörper gebildet (van der Valk et al., 2015). In der Spätphase erhöht sich die Aktivität IL-10- und TGF- β -sezernierender regulatorischer T-Zellen (van der Valk et al., 2015, Akdis et al., 2006, Wambre et al., 2012), welche die allergenspezifische IgE-Produktion inhibieren und die allergenspezifische IgG4-Produktion fördern. Begleitet wird dies von dem Wechsel einer Th2-Antwort zu einer ausgeglicheneren Antwort mit mehr Th1-Anteil (Wambre et al., 2012, Moote et al., 2018). Allerdings gibt es auch Daten, die darauf hinweisen, dass weniger allein der Wechsel einer Th2- zu einer Th1-Antwort, sondern sogar die Verringerung beider Antworten für die Hyposensibilisierung von Bedeutung sind (Akdis and Akdis, 2014). Regulatorische B-Zellen scheinen auch eine Rolle bei der Suppression der Produktion von IgE zu spielen (Akdis and Akdis, 2014).

Die Herausforderung der allergenspezifischen Immuntherapie besteht darin, dass die Applikation des Allergens das Risiko eines anaphylaktischen Schocks birgt (Moote et al., 2018). Dementsprechend können Erkrankungen wie beispielsweise Asthma oder kardiovaskuläre Erkrankungen, welche die Gefährlichkeit einer systemischen Reaktion erhöhen, Kontraindikationen der AIT darstellen (Moote et al., 2018). Während die allergenspezifische Immuntherapie eine insgesamt sichere und etablierte Therapie allergischer Erkrankungen wie Heuschnupfen, allergischem Asthma und Hymenopteren-, darunter Wespen und Bienen, Allergie darstellt (Moote et al., 2018, van der Valk et al., 2015), existiert dennoch Raum zur Verbesserung. Neben dem Ausschluss von Patienten/Patientinnen mit Kontraindikationen bestehende Einschränkungen beinhalten die Langwierigkeit der Behandlung mit etwaigen Rückfällen sowie die Tatsache, dass nicht jede/r Patient/Patientin von der Behandlung profitiert (Akdis and Akdis, 2014).

Eine Verbesserung der Therapie durch Adjuvans-Allergen-Fusionsproteine bietet die Chance, die Potenz der Immunmodulation zu steigern und gleichzeitig das Risiko schwerer allergischer Reaktionen der AIT zu senken (Blanco et al., 2019).

Abbildung 2



Die allergenspezifische Immuntherapie führt zur Hyposensibilisierung: Bei der AIT beeinflussen Th1/Treg-Zellen die allergenspezifische Immunantwort durch Hemmung der Th2-Zellen und Hemmung der IgE- zu Gunsten einer IgA- und IgG-Immunantwort. Die gebildeten IgA- und IgG-Antikörper haben das Potential, Allergene zu neutralisieren, bevor diese Mastzell-gebundene IgE-Antikörper kreuzvernetzen können.

1.3.3 Adjuvantien in Vakzinen und Allergentherapeutika

Das Ziel von Impfungen ist es, B- und T-Gedächtniszellen für die spezifische Bekämpfung von Infektionen oder Toxinen bzw. im Rahmen der allergenspezifischen Immuntherapie für die Wiederherstellung der allergenspezifischen immunologischen Toleranz zu generieren (Coffman et al., 2010, Blanco et al., 2019).

Der Weg dahin führt dabei über die Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Antigen-präsentierende Zellen werden u. a. über ihre Mustererkennungsrezeptoren (PRRs) aktiviert (Coffman et al., 2010). Die Ausschüttung von Zytokinen führt dann zur Rekrutierung weiterer Immunzellen, infolgedessen es zur Aktivierung von CD4⁺-T-Zellen sowie B-Zellen

kommt, von denen dann im Folgenden einige wenige als Gedächtniszellen verbleiben (Coffman et al., 2010, Smith-Garvin et al., 2009).

Sowohl für Viren als auch Bakterien existieren zahlreiche effektive attenuierte Lebendimpfstoffe wie gegen beispielsweise Mumps, Masern, Röteln, Gelbfieber, Varizella und Cholera (Minor, 2015, Cabrera et al., 2017). Für viele Infektionskrankheiten ließen sich erfolgreiche Lebendimpfstoffe bisher jedoch nicht umsetzen (Coffman et al., 2010). Zentrale Schwierigkeiten in der Erschließung neuer Lebendimpfstoffe sind die Gefahr der Verursachung der Krankheit oder eine mangelnde Wirksamkeit in der Auslösung ausreichender Immunantworten durch die abgeschwächten Erreger (Minor, 2015).

Diese Lücken können durch Totimpfstoffe geschlossen werden, deren wichtige Vertreter u. a. Toxoidimpfstoffe, inaktivierte Impfstoffe, Untereinheitenimpfstoffe und Konjugatimpfstoffe sind. Die Herausforderung bei Totimpfstoffen besteht vordergründig in der Erzeugung einer Immunantwort, welche zu einer langfristigen T-Zell-Immunität führt (Reed et al., 2013, Coffman et al., 2010). Verwendung finden daher zusätzlich Adjuvantien, um die Immunogenität zu verstärken. Sie stellen als PAMPs ein Immunzellen-aktivierendes Gefahrensignal zur Verfügung und verstärken dadurch sowohl die Prozessierung als auch die Präsentation der Antigene durch die antigenpräsentierenden Zellen. Coffman et al. teilen Adjuvantien in ihrem Review in empirisch erschlossene und in auf PRR-Aktivierung abzielende Adjuvantien ein (Coffman et al., 2010). Generell ist eine strikte Einteilung jedoch sehr schwierig, zumal es eine stetig zunehmende Anzahl an Ansätzen gibt, wie beispielsweise mit mRNA-Impfstoffen, in denen die mRNA sowohl für das Antigen transkribiert als auch selbst inhärente immunstimulatorische Funktionen besitzt (Pardi et al., 2018).

Im Folgenden soll kurz auf die bereits in der AIT eingesetzten Adjuvantien (Aluminiumsalze, MPLA, Calciumchlorid und mikrokristallines Tyrosin) eingegangen werden.

Aluminiumsalze gehören zu den empirisch erschlossenen Wirkverstärkern und werden seit 1926 als Adjuvantien in einer Vielzahl von Impfstoffen, in der Mehrzahl allergenhaltiger Präparate (Moingeon, 2012) und beispielsweise auch im inaktivierten COVID-19-Impfstoff CoronaVac verwendet (Zhang et al., 2021). Vordergründig ist bei ihnen die Erzeugung einer humoralen Immunantwort mit antigenspezifischen Th1- und Th2-Antworten im Menschen. Interessanterweise wird bei Mäusen hauptsächlich eine Th2-Antwort ausgelöst (Coffman et al., 2010). Hiermit übereinstimmend ist die Eignung von Aluminiumsalzen als Adjuvantien zur Auslösung einer allergischen Sensibilisierung im Mausallergiemodell (Dearman and Kimber, 2007). Auch im Menschen verursacht Aluminium lokale Entzündungen an der Einstichstelle und Prostaglandin-abhängige Th2-Antworten (Hogenesch, 2012, Jensen-Jarolim, 2015). Für die Eignung als Adjuvans im Rahmen einer AIT bedeutet dies ein potenzielles Hindernis, da

nicht nur Th1- sondern auch Th2-Antworten mit dieser einhergehen (1.3.2). Auch ist eine potenzielle Toxizität von Aluminiumhydroxid noch nicht vollständig geklärt.

Monophosphoryl-Lipid A ist eine abgewandelte Form von aus Salmonellen gewonnen Lipopolysacchariden, welches sich aufgrund seiner gegenüber LPS reduzierten Toxizität bei bestehender starker immunogener Aktivierung als Adjuvans eignet (Qureshi et al., 1982, Kwissa et al., 2007, Schülke et al., 2016). Mit der Entdeckung des TLR4-Rezeptors wurde der Mechanismus der Aktivierung der Immunzellen bekannt (Poltorak et al., 1998). Schülke et al. konnten in ihrer Arbeit 2016 zeigen, dass die Eignung von MPLA als Adjuvans in einem Fusionsprotein für die Vakzinierung gegen eine Ovalbumin-Allergie dadurch eingeschränkt ist, dass es eine starke Th2-Aktivierung von T-Zellen bewirken kann (Schülke et al., 2016). Gleichzeitig konnte die klinische Wirksamkeit eines Birkenpollen-Allergentherapeutikums mit MPLA als Adjuvans gezeigt werden; neben der Verschiebung einer Th2- zu einer Th1-Antwort und der Steigerung der spezifischen IgG-Produktion war eine Reduktion klinischer Symptome aufgetreten (Drachenberg et al., 2001). Mit POLLINEX® Quattro ist ein Allergentherapeutikum mit MPLA als Adjuvans in Deutschland im Zulassungsprozess und damit bedingt verkehrsfähig (Rosewich et al., 2013). Dabei sind die Pollenallergoide an mikrokristallines L-Tyrosin gebunden und mit MPLA adjuvantiert (Gawchik and Saccar, 2009).

Aufgereinigtes L-Tyrosin ordnet sich aufgrund seiner Polarität in kristallinen Strukturen an. Es wird als Adjuvans in der Form von Mikrokristallen verwendet (Gawchik and Saccar, 2009). Der offensichtliche Vorteil des MCT („*microcrystalline tyrosine*“) besteht in der evident biologischen Abbaubarkeit der nicht-essenziellen Aminosäure L-Tyrosin. Als Adjuvans kann es die T-Zell-Antwort verstärken und somit die Wirkung von MPLA steigern (Leuthard et al., 2018).

Kalziumphosphat stellt ein weiteres mögliches Adjuvans dar. Bei einer zwar verringerten Immunogenität gegenüber Aluminium (Goto et al., 1997) besitzt es eine bessere Verträglichkeit und zeigt ein reduziertes Risiko der IgE-Produktion (Ickovic et al., 1983). Aktuell wird Kalziumphosphat jedoch nicht mehr in Allergenprodukten verwendet.

Die Fusion von Antigen bzw. Allergen und Adjuvans in Fusionsproteinen bietet gegenüber der einfachen Koadministration beider Komponenten weitere Vorteile. So führt sie zu einer direkten Adressierung des fusionierten Antigens an entsprechende für das Adjuvans vorhandene Rezeptoren des Immunsystems (und damit die sie exprimierenden Immunzellen). Darüber hinaus wird die Prozessierung wie auch die Präsentation des Antigens durch den Verdau als Bestandteil eines Fusionsproteins ebenfalls stark beeinflusst (Huleatt et al., 2007, Khan et al., 2007). Die hierbei verwendeten Adjuvantien sind vielfältig (Blanco et al., 2019). Das Adjuvans FlaA und das in dieser Arbeit verwendete Fusionsprotein rFlaA:Betv1 wird im folgenden Kapitel genauer beleuchtet.

1.4 Stimulationsproteine Bet v 1, FlaA und rFlaA:Betv1

1.4.1 Bet v 1

Bet v 1 ist das Hauptallergen der Birkenpollen und Teil der Bet v 1-like *superfamily* (Smole et al., 2015). Interessanterweise existiert im Pflanzenreich eine Vielzahl von mit Bet v 1 verwandten Proteinen, deren gemeinsamer Vorläufer ein Grundgerüst für die Bindung von hydrophoben Bindungspartnern, beispielsweise Lipiden, darstellt (Radauer et al., 2008).

Im Rahmen der allergischen Erkrankung kommt es zur Ausbildung von Bet v 1-spezifischen IgE-Antikörpern und Th2-Antworten. Während der exakte zugrundeliegende Mechanismus noch nicht in allen Details verstanden ist, zumal viele Bet v 1-ähnliche Proteine keine solchen Effekte zeigen (Smole et al., 2010, Smole et al., 2015), konnte mit einer Veränderung der Faltung bereits eine deutlich abgeschwächte T-Zell-Antwort bei gleichzeitiger abgeschwächter IgE-Bindung erzielt werden (Kitzmüller et al., 2012).

Die Prävalenz der Sensibilisierung gegenüber Bet v 1 beträgt in der europäischen Bevölkerung etwa 8-16 % (Biedermann et al., 2019). Nicht nur leiden die Patienten/Patientinnen unter einer Birkenpollenallergie, auch gehen mit dieser Sensibilisierung Kreuzallergien gegen zahlreiche Lebensmittel, darunter Apfel, Haselnuss, Pfirsich, Pflaume, Nektarine, Aprikose, Kiwi, Kirsche, Karotte, Sellerie, Kartoffel, Soja, Feige, (Worm et al., 2014) einher. Dies liegt an der Ähnlichkeit der Struktur der entsprechenden Zielantigene, mit welcher eine Kreuzreaktivität der gegen Bet v 1 sensibilisierten T-Zellen und IgE-Antikörper einhergeht (Kazemi-Shirazi et al., 2000).

1.4.2 Flagellin A

Flagellen bzw. Geißeln sind in der Fortbewegung sowohl gram-negativer als auch gram-positiver Bakterien von großer Bedeutung (Nakamura and Minamino, 2019, DeRosier, 1998).

Flagellin als TLR5-Agonist ist ein potenter Aktivator des Immunsystems. Dabei sind für die Induktion proinflammatorischer Antworten und die Erkennung durch den TLR5 vor allem die konservierten Regionen D1 und D2 erforderlich, die hypervariable Region dagegen nicht (Hajam et al., 2017). Intrazellulär erfolgt die Aktivierung des NLRC4-Inflammasom-Signalweges über eine direkte Erkennung des intrazellulären Flagellin A über NAIP5 (Zhao et al., 2011). Hier sind die C-terminal lokalisierten Leucin-Reste des Flagellins für die volle Aktivierung ausschlaggebend (Zhao et al., 2011).

Neben stark bindenden und TLR5-aktivierenden Flagellinen, wie z. B. Flagellin C (FlhC) aus *Salmonella Typhimurium*, und schwächer bindenden und TLR5-aktivierenden Flagellinen, wie z. B. das Flagellin des *Helicobacter pylori*, kommen in der kommensalen Darmflora zudem

Flagelline vor, die zwar stark am TLR5 binden können, ihn jedoch weniger stark aktivieren (Clasen et al., 2023). Diesen sogenannten „stillen“ Flagelline fehlt ein allosterischer Aktivator, um die TLR5-Bindung in ein zellaktivierendes Signal umzusetzen (Clasen et al., 2023).

Sowohl im Rahmen einer Koadministration (Skountzou et al., 2010, Hajam et al., 2017, Hajam et al., 2013) als auch in Form von Fusionsproteinen (McDonald et al., 2007, Taylor et al., 2011, Weimer et al., 2009, Zieglmayer et al., 2016, Schülke et al., 2014, Schulke et al., 2010, Schulke et al., 2018, Kitzmüller et al., 2018, Turley et al., 2011) fand Flagellin bereits in mehreren Arbeiten Anwendung als Adjuvans. Es konnte dabei gezeigt werden, dass das aus *Listeria monocytogenes* gewonnene Flagellin ähnlich stark aktivierende Eigenschaften gegenüber dem TLR5-Rezeptor dendritischer Zellen wie das oft als Referenzflagellin verwendete FliC aus *Salmonella* besitzt (Schulke et al., 2010).

1.4.3 rFlaA:Betv1

Flagellin wurde bisher in mehreren Arbeiten als Adjuvans in Adjuvans-Antigen-Fusionsproteinen verwendet, darunter unter anderem für Impfungen gegen das West-Nil-Virus (McDonald et al., 2007), Influenza (Taylor et al., 2011, Turley et al., 2011) oder *Pseudomonas* (Weimer et al., 2009). In klinischen Phase-I- und -II-Studien konnten beispielsweise Antikörper gegen den mit Flagellin fusionierten M2-Ionenkanal des Influenza-Virus induziert werden, welcher neben den stark immunogenen Antigenen Neuraminidase und Hämagglutinin ein interessantes Ziel für Vakzin-induzierte Immunantworten darstellt. Dabei konnte die Sicherheit dieses rekombinanten M2e-Flagellin-Influenza-Vakzins herausgestellt werden (Turley et al., 2011). Die immunogenen Eigenschaften des Flagellins bieten ebenfalls ein großes Potential in der Behandlung allergischer Erkrankungen (Schulke et al., 2010, Schulke et al., 2018, Kitzmüller et al., 2018).

rFlaA:Betv1, ein Fusionsprotein aus Flagellin A von *Listeria monocytogenes* und dem Hauptbirkenpollenallergen Bet v 1, konnte bereits in einer Ko-Kultur muriner mDC und gegen Bet v 1 sensibilisierter CD4⁺-T-Zellen die allergietypische Th2-Zytokinantwort vermindern. Darüber hinaus zeigte sich bei der Vakzinierung von Mäusen mit dem Fusionsprotein in einem Allergiemodell eine stärkere Suppression der rBet v 1-spezifischen IgE-Antwort bei gleichzeitiger Stimulation Th1-assoziiierter Antikörperproduktion verglichen mit äquimolaren Mengen der Mischung (Schulke et al., 2018). Bereits in einer Arbeit mit einem Flagellin-Ova-Fusionsprotein konnte eine gegenüber der Applikation der Einzelproteine stärkere adjuvante Wirkung festgestellt werden (Bates et al., 2009).

Die Gründe dafür liegen nach Spekulation von Schülke et al. wahrscheinlich in der verstärkten Präsentation des jeweiligen Antigens durch APZ, da die Fusionierung mit dem TLR5-Liganden

die Aufnahme, die Verarbeitung sowie die Aktivierung der antigenpräsentierenden Zellen steigern kann (Schulke et al., 2010). Zudem ist erwähnenswert, dass rFlaA:Betv1 ein verglichen mit der Mixtur aus rFlaA bzw. rBet v 1 hohes Maß an Aggregation zeigt. Diese Aggregation tritt bei den Einzelproteinen nicht in dem Maße auf und birgt ebenso das Potential einer verstärkten Immunantwort durch die involvierten APZ (Schülke et al., 2014, Schulke et al., 2018).

1.5 Signaltransduktionswege in aktivierten Makrophagen

Makrophagen lassen sich durch eine Vielzahl verschiedener Stimuli aktivieren, welche in der Aktivierung verschiedener Signalkaskaden resultieren (Martinez and Gordon, 2014). Klassische Immunsignaltransduktionskaskaden werden über zentrale Proteine gesteuert, wie z. B. das *Mammalian Target of Rapamycin* (Byles et al., 2013, Linke et al., 2017), Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (Morrison, 2012) oder das Inflammasom (Man and Kanneganti, 2015). Gleichzeitig beschreibt der Immunmetabolismus das Phänomen der starken Vernetzung und wechselseitigen Beeinflussung von Zellstoffwechsel und zellulärer Effektorfunktion in Immunzellen (Makowski et al., 2020, Vats et al., 2006).

Im Folgenden sollen diese, für die vorliegende Arbeit relevanten, Signaltransduktionswege in Makrophagen erläutert werden.

1.5.1 Immunmetabolismus

Eine Verbindung zwischen Übergewicht und latenter chronischer Inflammation im Körper als Bestandteil des metabolischen Syndroms, der sog. Metaflammation, ist ein beschriebenes Problem vor dem Hintergrund der Epidemie des Übergewichts im 21. Jahrhundert (Saltiel and Olefsky, 2017, Hotamisligil, 2017).

Ursächlich sind hier zumindest zum Teil die auf Zellebene ebenfalls vorhandenen direkten Assoziationen zwischen Zellmetabolismus und Aktivierungszustand von (Immun-)Zellen.

Immunzellen durchlaufen im Rahmen ihrer Aktivierung, Differenzierung, Migration, Proliferation und dem Ausüben ihrer Effektorfunktionen signifikante Änderungen in ihrem Zellmetabolismus. Hierbei ist der Gesamtmetabolismus der jeweiligen Zelle ein komplexes Netzwerk aus vielen miteinander interagierenden anabolen und katabolen Stoffwechselwegen, von denen die meisten im Mitochondrium konvergieren (Michaeloudes et al., 2020). Der Kontakt von Immunzellen mit bestimmten Stimuli kann dazu führen, dass die

aktivierte Immunzelle die Biosynthese bestimmter Moleküle oder reaktiver Sauerstoffspezies gegenüber der Energieproduktion priorisiert (Michaeloudes et al., 2020).

Die Untersuchung des Zusammenhanges zwischen Immunzellfunktion und dem zellulären Stoffwechselstatus ist Gegenstand des relativ neuen Forschungsfeldes „Immunmetabolismus“.

Bereits 1927 zeigte Otto Warburg in Krebszellen eine Verschiebung des Zellstoffwechsels in Richtung verstärkter anaerober Glykolyse, welche mit einer verstärkten Produktion von Laktat aus Glucose einherging (Warburg et al., 1927). Aus Tumorzellen zurückfließendes venöses Blut enthielt Laktat, welches durch gesundes Gewebe nur unter Sauerstoffmangel in den Körper sezerniert wird (Warburg et al., 1927). Diese trotz der Verfügbarkeit von Sauerstoff stattfindende Fermentation von Glucose zu Laktat in Tumor-Zellen bezeichnet man als Warburg-Effekt (Warburg et al., 1927).

Im Immunsystem wurde eine Verbindung zwischen Metabolismus und Zellfunktion bereits unter anderem für T-Zellen, DC und Makrophagen gezeigt (Makowski et al., 2020). Aufgrund meiner Arbeit mit und der zentralen Rolle von Makrophagen sollen die Erkenntnisse zum Immunmetabolismus in aktivierten Makrophagen im Folgenden exemplarisch vorgestellt werden.

Vats et al. zeigten erstmalig, dass der Metabolismus von Makrophagen deren Zytokinsekretion beeinflusst (Vats et al., 2006, Makowski et al., 2020). Hierbei waren Fettsäurestoffwechsel und insbesondere die β -Oxidation stark ausgeprägt in sogenannten alternativ aktivierten Makrophagen (Vats et al., 2006). Dies zeigte sich beim Vergleich von mit IL-4- gegenüber mit IFN γ - und LPS-stimulierten Makrophagen in der translatierten mRNA (erhöhte Expression zentraler Gene der β -Oxidation und verringerte Expression proinflammatorischer Gene) und in der Analyse der zellulären Enzyme (erhöhte Synthese von Acyl-CoA-Dehydrogenasen und Enoyl-CoA-Hydratasen) (Vats et al., 2006). Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den sogenannten klassisch aktivierten, mit LPS und IFN γ stimulierten, Makrophagen eine verstärkte Aufnahme von Glucose und reduzierte Rate der β -Oxidation (Vats et al., 2006). Erwähnenswert ist, dass bei der Stimulation durch IL-4 nicht nur die β -Oxidation zunahm, sondern auch die Glucoseaufnahme, wenn auch nicht so stark ausgeprägt wie bei den klassisch aktivierten Makrophagen (Vats et al., 2006). In der Literatur werden Makrophagen heute unterschieden in den klassisch aktivierten proinflammatorischen M1-Phänotyp und den alternativ aktivierten antiinflammatorischen M2-Phänotyp (Martinez and Gordon, 2014). Diese binäre Einteilung scheidet bisweilen an der wachsenden Diversität von Makrophagensubtypen, dessen Komplexität man mit der Abbildung auf einem fließenden Spektrum besser erfassen könnte. Die Einteilung in M1- und M2-Makrophagen eignet sich allerdings nach wie vor als hilfreiches Modell (Martinez and Gordon, 2014).

Zentrale Stimuli, welche zu einer Differenzierung in Richtung M1-Makrophagen führen, sind IFN γ , TNF- α und LPS (Viola et al., 2019). Die Hauptaufgaben von M1-Makrophagen sind vor allem proinflammatorischer Natur (Viola et al., 2019): Die Sekretion einer Vielzahl proinflammatorischer Zytokine wie TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23 und die Auslösung und Unterhaltung einer Th1-Antwort sind dabei zentral (Shapouri-Moghaddam et al., 2018, Martinez and Gordon, 2014), während auf metabolischer Seite die Glykolyse, der Pentosephosphatweg und die Fettsäuresynthese forciert werden (Viola et al., 2019).

Im Gegensatz dazu sind in M2-Makrophagen die oxidative Phosphorylierung, der Citratzyklus und die β -Oxidation von Fettsäuren von entscheidender Bedeutung für die Effektorfunktion dieser Zellen (Viola et al., 2019). Aktiviert werden M2-Makrophagen insbesondere durch IL-4, IL-13, IL-10 oder Glucocorticoide (Martinez and Gordon, 2014). M2-Makrophagen sezernieren sowohl IL-10 als auch proinflammatorische Zytokine wie TNF- α , IL-1 β und IL-6. Die Funktionen der M2-Makrophagen umfassen ein scheinbar sehr breites Spektrum, darunter antiinflammatorische immunmodulatorische Aufgaben, Phagozytose apoptotischer Zellen, Angiogenese, Gewebsmodellierung, das Einkapseln von Parasiten sowie die Aktivierung von Th2-Zellen (Martinez and Gordon, 2014, Shapouri-Moghaddam et al., 2018).

Eine auf das metabolische Syndrom bezugnehmende interessante Erwähnung wert ist an dieser Stelle die Tatsache, dass Fettsäuren, Glucose und Insulin die Polarisierung von Makrophagen umgekehrt genauso in einen proinflammatorischen M1-Phänotyp antreiben können (Viola et al., 2019).

In Experimenten mit mDC konnten Schülke et al. bereits zeigen, dass die durch rFlaA:Betv1 ausgelöste Immunantwort u. a. über eine mTOR-vermittelte Aktivierung des Metabolismus erfolgte (Schulke et al., 2018). Ziel dieser Arbeit war es, sowohl einen Teil der im Folgenden erwähnten Signalkaskaden bei Aktivierung der Makrophagen durch das Fusionsprotein zu untersuchen als auch gleichzeitig mithilfe des Profils der Zytokinsekretion rFlaA:Betv1-stimulierter Makrophagen eine Abschätzung über den Polarisierungszustand der Makrophagen zu treffen.

1.5.2 mTORC1

Mammalian Target of Rapamycin, mTOR, ist eine evolutionär hochkonservierte Serin/Threonin-Kinase, welche als Regulator eine herausragende Funktion in einer Vielzahl von Signaltransduktionswegen, vor allem aber im Zellmetabolismus, besitzt (Kim et al., 2017). Damit spielt eine Fehlregulation von mTOR u. a. eine wichtige Rolle für onkologische Erkrankungen (Kim et al., 2017), aber auch für die Funktion von Zellen des Immunsystems (Linke et al., 2017).

Rapamycin ist ein durch *Streptomyces hygroscopicus* synthetisiertes Antimykotikum, welches antiproliferative und immunsuppressive Eigenschaften in Säugetierzellen besitzt (Li et al., 2014). Die Wirkungsweise von Rapamycin wird vordergründig durch eine partielle Inhibition von mTOR vermittelt, indem sich mTOR dabei in einen Rapamycin-sensitiven Komplex, den mTORC1 und einen deutlich Rapamycin-unempfindlicheren Komplex, den mTORC2 unterteilen lässt (Abbildung 3) (Linke et al., 2017, Li et al., 2014, Kim et al., 2017).

mTORC1 und mTORC2 fördern in Immunzellen vor allem die Syntheseleistung (Linke et al., 2017). Dies geht mit einer erhöhten Glykolyse, Lipidsynthese sowie der Aktivierung mitochondrialer Funktionen einher (Linke et al., 2017). Eine weitere Funktion ist die Regulation der Autophagozytose abhängig vom Nährstoffstatus. Diese wird bei einem Nährstoffmangel durch die Inhibition von mTOR aktiviert (Jung et al., 2010). Die Funktionen von mTORC2, welche vor allem das Überleben der Zelle und die Organisation des Zytoskeletts einschließen, sind hierbei nicht so gut verstanden, wie von mTORC1 (Linke et al., 2017).

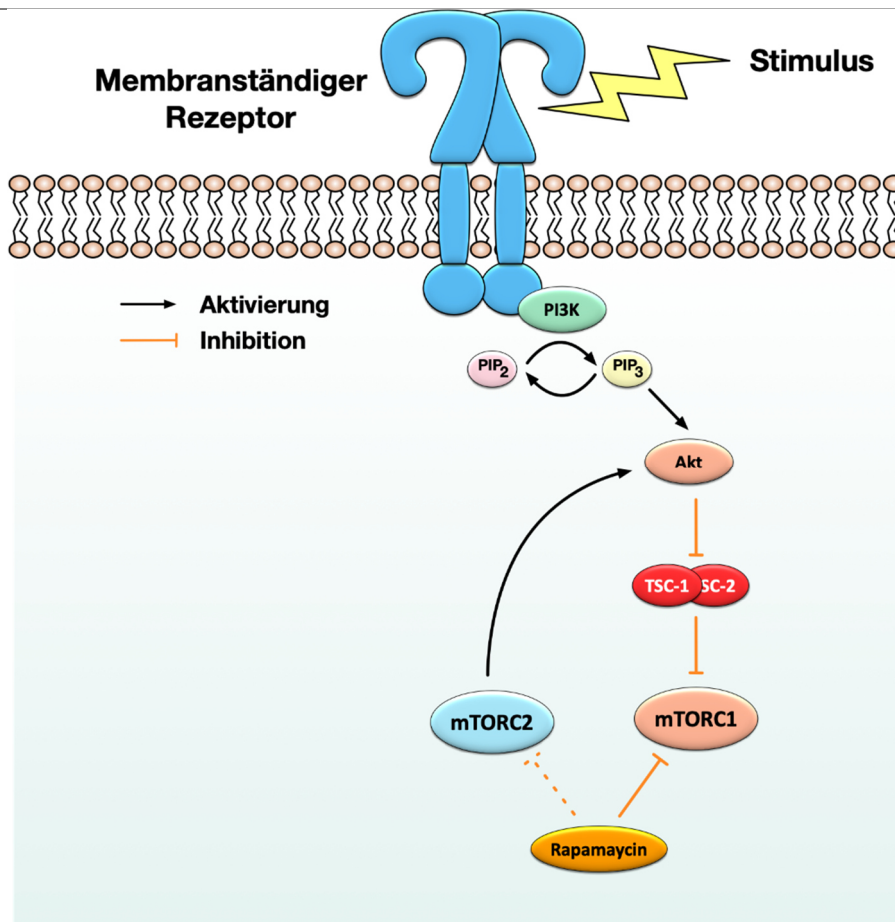
mTORC1 wird in Immunzellen aktiviert durch Zytokine, den TZR, Wachstumsfaktoren und PAMPs (Linke et al., 2017). Dabei werden membranständige Rezeptoren wie Rezeptortyrosinkinasen oder G-Protein-gekoppelte Rezeptoren rekrutiert, welche dann wiederum die wichtigen Phosphoinositid-3-Kinasen, kurz PI3K, aktivieren (Huang and Manning, 2009). PI3K führt zur Phosphorylierung und Aktivierung von Akt (Proteinkinase B) (Huang and Manning, 2009). Akt hebt dann im nächsten Schritt eine über TSC2 („*tuberous sclerosis complex protein 2*“ bzw. Tuberin) vermittelte Inhibition von mTORC1 durch den TSC1/TSC2-Komplex auf. Es kommt zur Aktivierung von mTOR und der Bildung des mTOR-Komplexes (mTORC) (Huang and Manning, 2009) (Abbildung 3). Erwähnenswert ist die ebenfalls erforderliche Aktivierung von Akt durch mTORC2 (Huang and Manning, 2009).

In Makrophagen im Besonderen führt eine Aktivierung von mTORC1 zu einer Polarisation in Richtung M1-Makrophagen (Byles et al., 2013). Es konnte gezeigt werden, dass TSC1/TSC2-defiziente, also in der Inhibition von mTORC1 defizitäre, murine Knochenmarks-abgeleitete Makrophagen eine verminderte Fähigkeit zur Ausprägung des M2-Phänotyps und eine erhöhte proinflammatorische Zytokin- sowie verringerte antiinflammatorische IL-10-Produktion aufwiesen (Byles et al., 2013).

Schülke et al. konnten 2018 für murine dendritische Zellen zeigen, dass für eine Aktivierung des Zellmetabolismus und der IL-10-Sekretion durch rFlaA:Betv1 eine Aktivierung von mTORC1 erforderlich war. Interessanterweise war dies für die Sekretion proinflammatorischer Zytokine nicht der Fall (Schulke et al., 2018).

Ein Ziel dieser Arbeit war es daher, die Rolle von mTORC1 auch im Modell der BMDMs bei einer Aktivierung durch rFlaA:Betv1 zu untersuchen.

Abbildung 3



Rapamycin hemmt die Aktivierung des mTORC1-Komplexes. Über einen membranständigen Rezeptor erfolgt die Aktivierung von PI3 und Akt. Daraus resultiert die eine Enthemmung von mTORC1 und eine proinflammatorische Reaktion der Makrophagen. Diese mTORC1-Aktivierung lässt sich mit Rapamycin hemmen.

1.5.3 MAP-Kinasen und Inflammation

Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, im Folgenden MAPKs, sind Bestandteil verschiedener Kinase-Kaskaden und besitzen einen wichtigen Anteil an der Regulation von Zellproliferation, Zelldifferenzierung und dem Zelltod (Morrison, 2012). Sie koordinieren die zelluläre Beantwortung von extrazellulären Signalen, indem sie diese in die Zelle weitergeben und entsprechende Signalkaskaden anstoßen (Cargnello and Roux, 2011). Die Länge dieser Signalkaskaden hat dazu geführt, dass laut Nomenklatur häufig eine MAPKKK (MAPK-Kinase-Kinase) eine MAPKK (MAPK-Kinase) aktiviert, welche wiederum eine MAPK aktiviert (Morrison, 2012).

Das aktuelle Paradigma der MAP-Kinasen unterscheidet dabei drei Gruppen (Morrison, 2012): ERKs („*extracellular signal-regulated kinases*“) haben wichtige Effekte auf das Zellwachstum

und -überleben sowie die Zelldifferenzierung (Morrison, 2012). JNKs („*c-Jun amino-terminal kinases*“) werden aktiviert durch externe Stressoren und haben wichtige Effekte auf den Zellmetabolismus, inflammatorische Reaktionen, Zytokinsekretion sowie die Apoptose (Morrison, 2012). Ähnliche Aufgaben übernehmen p38/SAPKs („*stress-activated protein kinases*“). Ebenfalls durch externe Stressoren aktiviert, spielen auch sie eine Rolle bei der Zelldifferenzierung und -regulation mit Schwerpunkt auf Inflammation und Apoptose (Morrison, 2012).

Aus Vorarbeiten in unserer Arbeitsgruppe, in denen die MAP-Kinase-Aktivierung in rFlaA:Betv1-stimulierten murinen mDC untersucht wurde, ging dabei ein Arbeitsmodell für eine durch das Fusionsprotein ausgelöste, der MAP-Kinasen-Aktivierung vorgeschaltete Signalkaskade hervor: Im Konkreten wurde vorgeschlagen, dass das TLR-Adapterprotein MyD88 („*myeloid differentiation primary response 88*“) den Komplex aus IRAK1/IRAK2/TRAF6 (Interleukin-1-Rezeptor-assoziierte Kinase 1 bzw. 2/TNF-Rezeptor-assoziiierter Faktor 6) aktiviert, welcher wiederum über TAK1 (Mitogen-aktivierte Protein-Kinase-Kinase-Kinase 7) zu einer Aktivierung der MAPK führt (Moeller et al., 2019).

Zur Untersuchung des Beitrags verschiedener Typen von MAPK zur rFlaA:Betv1-vermittelten Makrophagen-Aktivierung wurden in dieser Arbeit verschiedene Inhibitoren verwendet, die im Nachfolgenden kurz eingeführt werden sollen.

SB202190 ist ein niedermolekularer Wirkstoff, welcher die p38-MAP-Kinase inhibieren kann (Menon et al., 2011). Darüber hinaus kann SB202190 jedoch ebenfalls eine Inhibition vieler weiterer intrazellulärer Proteine, etwa der PI3-Kinase (Menon et al., 2011), bewirken, welchen eine Bedeutung in den Bereichen Autophagozytose und Apoptose zukommt (Menon et al., 2011). Insbesondere die p38/MAP-Kinase spielt dabei in der Regulation von Autophagozytose eine Rolle (Menon et al., 2011).

U0126 ist ein niedermolekularer, hochspezifischer Inhibitor von MEK1/2 (Favata et al., 1998) und blockiert damit den Ras/Raf/MEK/ERK- („*rat sarcoma/rapidly accelerated fibrosarcoma/mitogen-activated protein kinase/extracellular signal-regulated kinases*“) Signalweg (McCubrey et al., 2007, Miranda et al., 2002). Dieser Signalweg, synonym als ERK1/ERK2- bzw. p42/44-Signalweg bezeichnet, vermittelt extrazelluläre Signale bis zur DNA in den Zellkern und hat einen starken Einfluss auf Genexpression und Zellproliferation. In onkologischen Erkrankungen kann er von entscheidender Bedeutung sein (McCubrey et al., 2007). Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass der ERK-Signalweg auch in der Ausdifferenzierung von Monozyten hochrelevant ist (Miranda et al., 2002). Des Weiteren wird durch U0126-Inhibition der TSC1/TSC2-Komplex durch Einflussnahme auf seine Phosphorylierung beeinflusst. Der MEK/ERK-Signalweg spielt somit auch eine noch nicht

genau erforschte Rolle in der Aktivierung von mTOR und damit des Zellstoffwechsels (Tee et al., 2003).

MAP-Kinase-Signalwege sind eng verzahnt mit dem PI3K/Akt/mTOR-Signalweg, welcher als bedeutender Zellsignaltransduktionsweg vor allem in onkologischen Erkrankungen relevant ist (Shorning et al., 2020, Polivka and Janku, 2014, Moeller et al., 2019). Jedoch kommt diesem Signalweg ebenfalls eine entscheidende Bedeutung im Immunmetabolismus und der Aktivierung von Makrophagen zu (Makowski et al., 2020), welche ausschnittsweise in dieser Arbeit untersucht werden konnte.

Von Bedeutung sind die MAP-Kinasen ebenfalls für die Aktivierung von NF- κ B (*“nuclear factor ‘kappa-light-chain-enhancer’ of activated B-cells”*), einem für inflammatorische Prozesse verantwortlichen Transkriptionsfaktor, welcher für die Vermittlung der oben erwähnten Effekte der MAP-Kinasen zentral ist (Schulze-Osthoff et al., 1997). Generell gilt NF- κ B als ausschlaggebend für das Überleben und die Aktivierung von Immunzellen (Liu et al., 2017).

Bei der Aktivierung von mDC durch das Fusionsprotein war interessanterweise eine, bislang unbekannte, der MAP-Kinase-Aktivierung vorgeschaltete Signalkaskade als für die Aktivierung von NF- κ B verantwortlich identifiziert worden (Moeller et al., 2019).

1.5.4 Der Inflammasom-Komplex reguliert die Produktion pygener Zytokine nach Kontakt mit verschiedenen Stimuli

Inflammasome sind große zytosolische Proteinkomplexe, welche in einer Vielzahl von Erkrankungen eine Rolle spielen (Man and Kanneganti, 2015). Ihre Aktivierung wird durch diverse Infektions- bzw. Stressstimuli eingeleitet, so zum Beispiel Anthrax-Toxin, PAMPs, Bakterien, Flagellin, mikrobielle DNA und DAMPs, freigesetzte Zell-DNA, Kristalle, ROS sowie erhöhten Kalium-Einstrom (de Zoete et al., 2014, Man and Kanneganti, 2015).

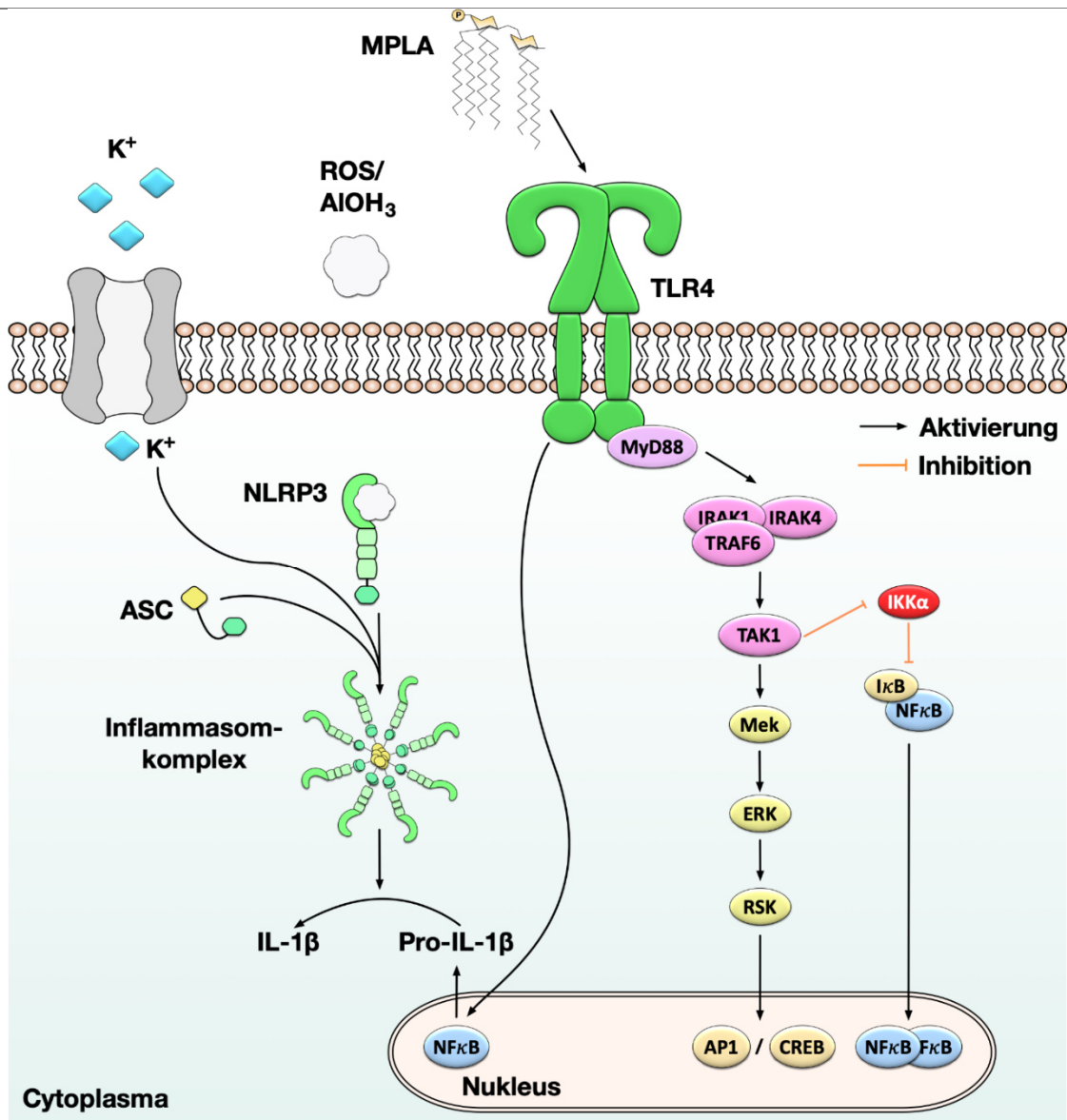
Zwei Signalwege sind für die Funktion eines Inflammasoms erforderlich:

1. Es erfolgt das Signal für die Produktion von pro-IL-1 β bzw. pro-IL-18. Bei der Aktivierung durch Flagellin wird dieses beispielsweise über den TLR5 und MyD88 vermittelt. Die Transkription und Translation von pro-IL-1 β wird dann über eine, den oben genannten Proteinen nachgeschaltete, NF- κ B-Aktivierung vermittelt. (Man and Kanneganti, 2015).
2. Je nach ursprünglichem Signal führen verschiedene Wege über die zugehörigen Sensorproteine zu dem Zusammenbau des zugehörigen Inflammasoms (s. u.). Das Resultat ist unter anderem die proteolytische Spaltung von pro-IL-1 β bzw. pro-IL-18 in

deren aktive Formen IL-1 β bzw. IL-18 durch die Caspase 1 (Man and Kanneganti, 2015). Dabei bildet das auf den jeweiligen Stimulus abgestimmte Sensorprotein einen Komplex mit ASC („apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD“), einem Adapterprotein, welches die Aktivierung und Bindung an die Caspase 1 vermittelt (Abbildung 4).

Der Zusammenbau des NLRC4-Inflammasoms wird gemäß seiner Spezialisierung typischerweise durch Typ-III-Sekretionssysteme bestimmter Bakterien oder Flagellin aktiviert (Zhao et al., 2011, de Zoete et al., 2014, Man and Kanneganti, 2015). Das NLRP3-Inflammasom ist weniger stark spezialisiert und reagiert auf eine sehr breite Vielfalt verschiedener PAMPs und DAMPs (Man and Kanneganti, 2015). Erwähnenswert ist zudem, dass es zwischen dem NLRP3- und dem NLRC4-Inflammasom Wechselwirkungen gibt, welche eine Überbrückung des jeweils anderen Weges ermöglichen können (Qu et al., 2016). Z-VAD-FMK ist ein Pancaspase-Inhibitor. Dementsprechend führt er neben der Inhibierung der Caspase-1 und der damit einhergehenden Inhibition der IL-1 β - und IL-18-Sekretion (Lipinska et al., 2014, Li et al., 2019) zur Inhibition weiterer proinflammatorischer Prozesse; so konnten Lipinska et al. zeigen, dass die Zugabe zu einer mit LPS stimulierten Vollblutkultur zur Inhibition der Sekretion der Zytokine TNF- α , IL-8 und IL-6 führt, was die Autoren auf die Inhibition pro-apoptotischer Caspasen zurückführten (Lipinska et al., 2014). Die Mechanismen, mit denen Z-VAD-FMK die Aktivierung von Makrophagen beeinflusst, sind noch nicht umfänglich verstanden (Li et al., 2019). Ziel dieser Arbeit war es, eine mögliche Beteiligung des Inflammasoms für die mit dem Fusionsprotein aktivierten Makrophagen zu untersuchen. In der Abbildung 4 dargestellt ist ebenfalls die der durch das Inflammasom ausgelösten Sekretion von IL-1 β vorgeschaltete Aktivierung von NF- κ B, hier beispielhaft dargestellt als Ergebnis der MPLA-vermittelten TLR4-Aktivierung.

Abbildung 4



Der Inflammasom-Komplex reguliert die Produktion pyrogener Zytokine nach Kontakt mit verschiedenen Stimuli: Die Aktivierung von Toll-like-Rezeptoren (hier am Beispiel von TLR4) führt über die Aktivierung von NF-κB zur Transkription von pro-IL-1β. Für die Aktivierung des NLRP3-Inflammasom-Komplexes ist der Ausstrom von Kalium-Ionen ein potenter Auslöser. Pro-IL-1β wird durch den Inflammasom-Komplex in die aktive Form gespalten.

1.6 Immunologische Merkmale der untersuchten Mausstämme

C57BL/6-Mäuse sind ein weit verbreiteter Mausstamm in der biomedizinischen Forschung, in welcher sie wegen der robusten Einleitung von Immunantworten gegen viele Antigene oft Verwendung finden (Song and Hwang, 2017). Für mechanistische Untersuchungen stehen eine große Anzahl an gendefizienten oder genmodifizierten Mausstämmen auf dem C57BL/6-Hintergrund zur Verfügung. Die von C57BL/6-Mäusen gebildeten Immunantworten sind jedoch häufig Th1-geprägt und für die Untersuchung allergischer, Th2-dominieter, Immunantworten nicht optimal geeignet. BALB/c-Mäuse hingegen eignen sich als Mausstamm für die Etablierung von Allergiemodellen (z. B. für die Sensibilisierung mit Bet v 1), da sie oft vergleichsweise hohe IgE-Spiegel gegen die applizierten Allergene bilden (Bauer et al., 1997). Die intraperitoneale Applikation von Allergenen mit und ohne Adjuvans bei Mäusen ist ein bewährtes Allergiemodell und die damit einhergehende Sensibilisierung kann bei BALB/c-Mäusen stärker ausfallen als bei C57BL/6-Mäusen (Conrad et al., 2009). Vor diesem Hintergrund erfolgten die in dieser Arbeit durchgeführten Experimente zur Erforschung der Aktivierung der Makrophagen durch das Fusionsprotein in erster Linie unter Verwendung von Zellen, die aus C57BL/6-Mäusen differenziert wurden; für das Ko-Kultur-Experiment zur Untersuchung der Th2-modulierenden Eigenschaften der rFlaA:Betv1-stimulierten Makrophagen wurden aus BALB/c-Mäusen isolierten T-Zellen und Makrophagen verwendet.

2 Material

2.1 Grundmaterialien

Tabelle 2

Grundmaterialien	
Entsorgungsbeutel 200x300 mm	Carl Roth
Eco Nitrile PF 250 Handschuhe Category III	ecoShield
Falcon Tube CELLSTAR Teströhrchen 50 ml	Greiner Bio-One
Falcon Tube CELLSTAR Teströhrchen 15 ml	Greiner Bio-One
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Sarstedt
Reaktionsgefäß 200 µl	Simport
Reaktionsgefäß Safe-Lock Gefäß Biopur 1,5 ml	Eppendorf
Reaktionsgefäß Eppendorf Tube 5 ml	Eppendorf
Spritze Luer Lock Injekt 10 ml	Braun
Spritze Luer Lock Injekt 5 ml	Braun
Rotilabo Abdeckfolien Mikrottestplatten 50 µm unsteril	Carl Roth
Rotilabo Aluminiumfolie 30 µm	Carl Roth
Nadelcontainer sharpsafe 4 l	Frontiermedicalgroup
Pipettierreservoir unsteril 25 ml	Argos
Präzisionsreinigungstücher	Kimberly-Clark
Kanüle 0,45x25 mm Sterican	Braun
Rotilabo Signal Timer mit Zeituhr	Carl Roth
Mikrottestplatte 96 Well, F	Sarstedt
Gläser	
Duran 50 ml	Schott
Duran 100 ml	Schott
Duran 250 ml	Schott
Duran 400 ml	Schott
Duran 500 ml	Schott
Duran 1000 ml	Schott
Erlenmeyerkolben 300 ml	Schott
Pipetten	
Elektrische Multistepmultipipette Xplorer, 50-1200 µl	Eppendorf
Multipette plus	Eppendorf
Reference, 0,1-10 µl	Eppendorf
Reference, 0,5-20 µl	Eppendorf
Reference, 10-20 µl	Eppendorf
Reference, 10-100 µl	Eppendorf
Reference, 50-200 µl	Eppendorf
Reference, 100-1000 µl	Eppendorf

PIPETBOY 2 acu	Integra Biosciences
Multipipette FINNPIPETTE F2, 1-10 µl	Thermo Scientific
Multipipette FINNPIPETTE F2, 5-50 µl	Thermo Scientific
Multipipette FINNPIPETTE F2, 30-300 µl	Thermo Scientific
Pipettenspitzen	
epT.I.P.S. PCR clean, 0.1–10 µL S, 34 mm	Eppendorf
epT.I.P.S. PCR clean, 0.5–20 µL L, 46 mm	Eppendorf
epT.I.P.S. PCR clean, 2–200 µL, 53 mm	Eppendorf
epT.I.P.S. PCR clean, 50–1,000 µL, 71 mm	Eppendorf
Serologische Pipette Cellstar, 5 ml in 1/10 ml	Greiner Bio-One
Serologische Pipette Cellstar, 10 ml in 1/10 ml	Greiner Bio-One
Serologische Pipette Cellstar, 25 ml in 2/10 ml	Greiner Bio-One
Finntip, 10 µl	Thermo Scientific
Finntip, 300 µl	Thermo Scientific
ELISA Grundmaterialien	
ELISA-Platte, „High Binding“	Sarstedt
FCS	Sigma-Aldrich
PBS-FCS 10 %	Paul-Ehrlich-Institut Medienküche
PBS ohne Ca u. Mg., pH 7.1	Paul-Ehrlich-Institut Medienküche
Coating Puffer I 8,49 g NaHCO ₃ , 3,56 g Na ₂ CO ₃ , pH 9,5	Paul-Ehrlich-Institut Medienküche
Coating Puffer II 0,2 M Na-Phosphat, pH 6,5	Paul-Ehrlich-Institut Medienküche
Coating Puffer 10 x	eBioscience
TMB kit	BD Biosciences
Citratpuffer, pH 3,95	Paul-Ehrlich-Institut Medienküche
H ₂ O ₂ 30 %	Carl Roth
Waschpuffer PBS mit 0,05 % Tween 10	Paul-Ehrlich-Institut Medienküche
EtOH 70 %	Paul-Ehrlich-Institut Medienküche
ELISA, Katalognummer	
IL-1β	Hersteller
Capture, 14-7012-85	eBioscience
Detektion, 13-7112-85	eBioscience
Rekombinanter, lyophilisierter IL-1β Standard	BD Biosciences
Streptavidin HRP	BD Biosciences
IL-2	
Capture, 503702	BioLegend
Detektion, 503804	BioLegend
Rekombinanter, lyophilisierter IL-2 Standard	BD Biosciences
Avidin-HRP (Enzymkonzentrat)	BD Biosciences
IL-5	
BD OptEIA ELISA Set, 555202	BD Biosciences

Rekombinanter, lyophilisierter IL-5 Standard	BD Biosciences
Streptavidin HRP	BD Biosciences
IL-6	
Capture, 14-7061-85	eBioscience
Detektion, 13-7062-85	eBioscience
Rekombinanter, lyophilisierter IL-6 Standard	BD Biosciences
Streptavidin HRP	BD Biosciences
IL-10	
Development Kit, #900-T53	Peptotech
Streptavidin HRP	BD Biosciences
IL-13	
Ready-SET-Go!, 88-7137-22	eBioscience
Rekombinanter, lyophilisierter IL-13 Standard	BD Biosciences
Avidin-HRP (Enzymkonzentrat)	eBioscience
IFN γ	
BD OptEIA ELISA Set, 555138	BD Biosciences
Rekombinanter, lyophilisierter IFN γ Standard	BD Biosciences
Streptavidin HRP	BD Biosciences
TNF- α	
Capture, 14-7325-85	eBioscience
Detektion, 13-7326-85	eBioscience
Rekombinanter, lyophilisierter TNF- α Standard	BD Biosciences
Streptavidin HRP	BD Biosciences
Western Blot	
Mini Trans-Blot Zelle	Bio-Rad
Spannungsgerät Biometra Power Pack P25	Biotron
SDS Laufpuffer	Pau-Ehrlich-Institut Fachgebiet 3/3
SDS 10 % unsteril	Pau-Ehrlich-Institut Fachgebiet 3/3
Tris / HCL	Pau-Ehrlich-Institut Fachgebiet 3/3
Gelcode Blue Safe Protein Stain, 3,5 l	Thermo Fisher Scientific
SeeBlue Plus2 vorgefärbter Proteinstandard	Thermo Fisher Scientific
Nährmedium	
Nährmedium 500 ml RPMI - 1640 ohne L-Glutamine	Gibco
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich
5 ml SP-Lösung + L-Glutamin	Paul-Ehrlich-Institut Medienküche
2 ml L-Glutamin (2 mM final conc.)	Sigma-Aldrich
1,75 μ l β -Mercaptoethanol	Paul-Ehrlich-Institut Medienküche
5 ml HEPES 1M, pH 7,9	Paul-Ehrlich-Institut Medienküche
5 ml Natriumpyruvatlösung	Sigma-Aldrich
Murines M-CSF 10 μ g/ml in PBS, 0,2% BSA	Peptotech
Penicillin	Paul-Ehrlich-Institut Medienküche

Streptomycin	Paul-Ehrlich-Institut Medienküche
Zellgewinnung aus Knochenmark	
RBC (Red Blood Cell Lysis Buffer) NH ₄ Cl, 0,86 %	Pau-Ehrlich-Institut Fachgebiet 3/3
Zellschaber M, steril, L = 30 cm	Techno Plastic Products AG
Zählkammer, Neubauer 0,100 mm Tiefe, 0,0025 mm ²	LO Labor Optik
Trypanblau 0,4 % in PBS	Pau-Ehrlich-Institut Fachgebiet 3/3
Zellkulturflasche 75 ml, 75 cm ²	Greiner Bio-One
Zellkulturplatte 24 Well, Standard F	Sarstedt
MACS	
MACS-Puffer, pH 7,2	Paul-Ehrlich-Institut Medienküche
CD4 T Zell Isolationskit	Miltenyi Biotec
LS Säulen MACS	Miltenyi Biotec
MACS Multiständer	Miltenyi Biotec
MACS Trennmagnet	Miltenyi Biotec
Chemikalien weitere	
Schwefelsäure 25 %, reinst	Carl Roth
Schwefelsäure 6 mol/l - 12 N, UN 2796	Bernd Kraft
Reinstwasser	Paul-Ehrlich-Institut Medienküche
Terralin protect, 2 l Flasche	Schülke & Mayr
Terralin liquid, 1 l Flasche	Schülke & Mayr
Inhibitoren	
Rapamycin	Invivogen
SP600125	Invivogen
SB-202190	Invivogen
U0126	Cell Signaling Technologies
ZVAD	Invivogen
Geräte	
Thermomixer compact	Eppendorf
Roller Mixer	Stuart
Schüttler Duomax 1030	Heidolph
Schüttler REAX 2000	Heidolph
Elisawascher, Auto Plate Washer ELx405	BioTek Instruments
Elisadruckmodul, Valve Module	BioTek Instruments
Elisawascher Pumpe	BioTek Instruments
Schüttler MS1 Minishaker	IKA
Micro Zentrifuge	Qualitron
Zentrifuge Multifuge 1 S-R tabletop	Heraeus
Zentrifuge Megafuge 1.0 R	Heraeus

Schüttelinkubator für Platten, ThermoStar Shaker Incubator	BMG Labtech
Scanner Canoscan 8400F	Canon
Microplate Reader SpectraMax Plus 384	Molecular Devices
Spectrophotometer ND-1000	Nanodrop
pH-Meter Seven Easy S20	Mettler Toledo
Laborabzug Exploris EcoPlus	Köttermann
Waage Explorer Pro	Ohaus
Waage LE2202S	Sartorius
horizontaler Tischaufoklav Systec DX-65	Systec
Mikroskop Zeiss Axioskop	Zeiss
Mikroskop Zeiss Telaval 31	Zeiss
Sicherheitswerkbank der Klasse 2 Sterilgard III Advance	The Baker Company
Wasserbad	Köttermann
Brutschrank BBD 6220	Kendro Laboratory Products
LSR II Durchflusszytometer	BD Biosciences

Assays

Glucose Assay Kit	Sigma-Aldrich
-------------------	---------------

Software

FlowJo Software, Version 7	BD Biosciences
Graphpad Prism, Version 7.04 - 9	Graphpad Software, Dotmatics
Excel	Microsoft
Endnote 20	Clarivate
Omnigraffe	The Omni Group

Durchflusszytometrische Messungen

CD14 APC	BioLegend
CD11b Pacific Blue	Invitrogen, Thermo Fisher Scientific
F4/80 PeCyanine5	eBioscience
CD40 FITC	BioLegend
TLR5 PE	BioLegend
Cell Staining Buffer	BioLegend
OneComp Kompensations-Beads	Invitrogen
LSR II flow cytometer	BD Biosciences

2.2 Stimulationsproteine

Die zur Stimulation verwendeten Proteine rBet v 1 (Siebeneicher et al., 2014), rFlaA (Schulke et al., 2010) und rFlaA:Betv1 (Schulke et al., 2018) entstammten der Arbeitsgruppe *Molekulare Allergologie* am Paul-Ehrlich-Institut und wurden vor Beginn dieser Arbeit als rekombinante Proteine in *E. coli*-Bakterien mithilfe des Plasmidvektors pET15b synthetisiert. Die Copy-DNA-Sequenz für Flagellin entstammt dem Bakterium *Listeria monocytogenes* (Schulke et al., 2018).

2.3 Inhibitoren

Um die zugrundeliegenden Mechanismen der Makrophagen-Aktivierung durch das Fusionsprotein zu beleuchten, wurden folgende Inhibitoren verwendet: Rapamycin, SB202190, U0126, Z-VAD-FMK.

Rapamycin (Invivogen, Toulouse, Frankreich, Inhibitor des mTOR-(„*mammalian target of rapamycin*“) Komplexes 1), SB202190 (Invivogen, Toulouse, Frankreich, Inhibitor der p38-MAP-Kinase), U0126 (Cell Signaling Technology, Leiden, Niederlande, Inhibitor der MEK1/2-MAP-Kinase), Z-VAD-FMK (Invivogen, Toulouse, Frankreich, Inhibitor der Caspase 1).

2.4 Software

Die Analyse der durchflusszytometrischen Messungen wurde mittels mitgelieferter Software FlowJo der Firma BD Biosciences durchgeführt. Die Sammlung der Daten erfolgte mittels Excel, Microsoft. Die statistische Auswertung sowie die Anfertigung der Diagramme erfolgte mittels Graphpad Prism, Dotmatics. Die Literatur wurde während der Arbeit mittels Endnote, Clarivate, verwaltet. Die Abbildungen wurden mit Omnigraffle, The Omni Group für Macintosh, angefertigt.

3 Methoden

3.1 Gewinnung Knochenmarks-abgeleiteter Makrophagen

3.1.1 Mäuse

Für die Experimente wurden die Mausstämme BALB/c und C57BL/6 verwendet. Die Haltung sowie die Tötung der Mäuse erfolgte am Paul-Ehrlich-Institut in Übereinstimmung mit den Vorgaben des deutschen Tierschutzgesetzes und mit Genehmigung des Regierungspräsidiums Darmstadt. Die Mäuse (gezüchtet von Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME, USA) wurden am Paul-Ehrlich-Institut für den Haltungszeitraum unter keimreduzierten Bedingungen von mindestens 4 Wochen gehalten bevor sie den Experimenten zugeführt wurden, um stressbedingte Einflussfaktoren in Folge des Transportes zu reduzieren.

3.1.2 Gewinnung der Knochenmarkszellen

In der Fachliteratur wird das folgende Verfahren als „*purification of bone marrow-derived macrophages*“ beschrieben und dient zur Generierung und Aufreinigung von Makrophagen aus Knochenmark. Hierfür werden die Knochenmarkszellen aus den Beinknochen, also Femur und Tibia, der Mäuse über einen bestimmten Zeitraum mit M-CSF („macrophage colony-stimulating factor“) stimuliert, sodass diese sich zu Makrophagen ausdifferenzieren (Weischenfeldt and Porse, 2008).

Im Folgenden wird dieses Verfahren im Detail beschrieben.

Die Mäuse wurden zwecks Gewinnung des Knochenmarks durch Genickbruch getötet. Im Anschluss wurden von jedem Bein Femur sowie Tibia mithilfe von Präparierschere und Pinzette freigelegt und die Knochenenden mit der Präparierschere abgetrennt. Das Knochenmark wurde mit 4 ml Nährmedium mithilfe der Kanüle und der 5 ml Spritze in eine 100 mm Petrischale herausgespült. Nach erneuter Durchmischung des Knochenmarks mittels 5 ml Pipette wurde das Knochenmark in das 50 ml Falcon-Gefäß überführt. Die Petrischale wurde dabei erneut mit 2 ml Nährmedium ausgewaschen, um die verbliebenen Zellen ebenfalls zu erfassen. Das Falcon-Gefäß wurde darauffolgend 5 Minuten bei 1100 RPM zentrifugiert und der Überstand abgegossen. Im Anschluss wurden die Zellen mit 3 ml RBC („*red blood cell lysis buffer*“) eine Minute bei Raumtemperatur inkubiert, um die Erythrozyten zu lysieren. Daraufhin wurden die Zellansätze zu 10 ml mit Nährmedium aufgefüllt, um die Reaktion zu stoppen, und erneut 5 Minuten bei 1100 RPM zentrifugiert. Es folgte erneut das Abgießen des Überstandes und das Resuspendieren in 5 ml Makrophagen-Medium.

Nun wurde die Zellzahl der gewonnenen Knochenmarkszellen mithilfe der Neubauer-Zählkammer bestimmt. Dazu wurden 20 µl entnommen und diese 1:8 mit Trypanblau 0,4 % in PBS verdünnt. Diese Färbung ermöglicht die Unterscheidung lebendiger von toten Zellen, da sich letztere stark dunkelblau anfärben.

Die Knochenmarkszellen wurden dann zu $2 \cdot 10^6$ Zellen / 100 mm Petrischale in je 10 ml Makrophagen-Medium ausgesät.

3.1.3 Ausdifferenzierung der Makrophagen

Zur Ausdifferenzierung wurden die Makrophagen im Brutschrank unter Bedingungen von 37 °C, 5 % CO₂ und 80 % rel. Luftfeuchte inkubiert. Dabei wurden sie nach folgendem Schema mit M-CSF stimuliert:

Beim Aussähen am Tag 1 wurde dem Medium M-CSF in der finalen Konzentration von 20 ng/ml beigefügt. Am Tag 3 wurden weitere 10 ml Medium mit 20 ng/ml M-CSF hinzugefügt. Am Tag 6 und 8 wurden jeweils 10 ml Medium vorsichtig abpipettiert, ohne die Zellen am Boden der Petrischale zu stören, und erneut 10 ml Medium mit 20 ng/ml M-CSF hinzugefügt. Am Tag 10 wurden 10 ml Medium abpipettiert und erneut 10 ml Medium mit 5 ng/ml M-CSF hinzugefügt. Durch dieses Verfahren wurde einerseits ein konstantes Angebot an M-CSF für die Zellen zur Verfügung gestellt, andererseits wurden Zellen, welche sich aufgrund mangelnder Ausdifferenzierung nicht an der Schale angehaftet hatten, aus den Petrischalen herausgenommen.

3.2 Stimulation und Prä-Inhibition der Makrophagen

Nach 10 Tagen der Ausdifferenzierung wurden die Makrophagen am Tag 11 geerntet und zur Stimulation in 24-Well-Platten überführt.

Um die ausdifferenzierten Makrophagen vom Boden der Petrischale zu lösen, wurde das Kulturmedium zunächst abgegossen und die Petrischale mit 8 ml PBS mit einer Temperatur von 6 °C gespült. Zusätzlich dazu wurden die Zellen im Anschluss mithilfe eines Zellschabers vom Boden der Schale abgelöst.

Die Makrophagen einer Maus wurden darauf, mit je 5 ml Nährmedium pro Petrischale, in einem 50 ml Zentrifugenröhrchen gesammelt, erneut bei 1100 RPM und 5 Minuten zentrifugiert und im Anschluss in 3 ml frischem Medium resuspendiert.

Die Zellzahlbestimmung erfolgte erneut mit einer Neubauer-Zählkammer und Trypanblau-Färbung.

Die verwendeten Stimulationsproteine wurden von der Arbeitsgruppe zur Verfügung gestellt (Kapitel 2.2)

3.2.1 SDS-PAGE der Stimulationsproteine

Zur erneuten Überprüfung der Stimulationsproteine im Rahmen der Doktorarbeit wurde eine SDS-PAGE durchgeführt.

Die SDS-PAGE („*sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis*“) ist ein Verfahren zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Das zugrundeliegende Prinzip besteht in der Reduktion und Denaturierung der Proteine, die durch die anschließende Inkubation im Gelpuffer in äquivalenten Ladung/Masse-Verhältnissen im elektrischen Feld durch das Gel migrieren. Aufgetrennt werden sie dementsprechend nach ihrer Größe, die darüber entscheidet, wie schnell sie sich durch die Poren des Gels bewegen (Laemmli, 1970).

Herstellung des Trenn- und Sammelgels:

Zur Auftrennung der Proteine wurde ein Trenngel bzw. Sammelgel nach Laemmli mit einer Konzentration von 15 bzw. 5 % Acrylamid verwendet (Tabelle 3). Zur Herstellung wurden dabei Methylenbisacrylamid, Trenngel- bzw. Sammelgel-Puffer (Tris [Tris(hydroxymethyl)aminomethan], pH 8,8 bzw 6,8), Wasser sowie SDS-Puffer in einem Erlenmeyerkolben gemischt. Die Polymerisationsreaktion wurde dann durch die Zugabe von TEMED (Tetramethylethyldiamin) und APS (Ammoniumperoxodisulfat) gestartet. Die verwendeten Materialien wurden entsprechend Tabelle 3 eingesetzt.

Tabelle 3

	Tris pH 6,8	Tris pH 8,8	Acrylamid (30%)	APS (20mg/l)	TEMED	Reinstwasser	Gesamt
Sammelgel	3 ml	-	2 ml	0,5 ml	24 ul	6,5 ml	12 ml
Trenngel	-	4,6 ml	9 ml	0,36 ml	24 ul	4,2 ml	18 ml

Nach dem Starten der Reaktion wurde das Trenngel zwischen die Trennwände der Elektrophoresekammer gegeben und für die Dauer der Polymerisation mit Isopropanol überschichtet, um den Meniskus blasenfrei zu halten. Nach 2 Stunden wurde dann das Trenngel aufgetragen und der zugehörige Probenkamm eingesetzt. Nach weiteren zwei

Stunden der Polymerisation wurde das Gel über Nacht in mit Reinstwasser getränkten Tüchern bei 4 °C gelagert.

Proteine:

Konkret wurden dazu die Proteine rBet v 1, rFlaA, rFlaA + rBet v 1, rFlaA:Betv1 in Probenpuffer gelöst und zwecks Denaturierung bei 95 °C inkubiert. Im Anschluss wurden die Proteine in β -Mercaptoethanol inkubiert, um Disulfidbrücken zu reduzieren und auf diese Art und Weise aufzubrechen.

Elektrophorese:

Am nächsten Tag erfolgte dann der Auftrag der Proben und des Molekulargewichtsmarkers in die Kammern. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 200 V durchgeführt, bis die erste Lauffront des Molekulargewichtsmarkers das untere Ende des Gels erreicht hatte.

Färbung:

Die Färbung der Gele erfolgte mithilfe des Farbstoffs *Gelcode Blue* auf dem Schüttler bei einer zweistündigen Inkubation. Anschließend wurde der Hintergrund des Gels durch Waschen mit Wasser entfärbt und das Gel eingescannt.

3.2.2 Stimulation

Um die Aktivierung der Knochenmarks-abgeleiteten Makrophagen mit dem Fusionsprotein aus rekombinatem Bet v 1 und FlaA in ein Verhältnis zu den notwendigen Kontrollen zu setzen, wurden die Zellen zusätzlich mit äquimolaren Mengen an rBet v 1, rFlaA, rFlaA + rBet v 1 sowie LPS als Positivkontrolle stimuliert.

Tabelle 4

Stimulationsprotein	Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$]		
LPS	10		
rBet v 1	10	1	0,1
rFlaA	17,4	1,74	0,174
rFlaA + rBet v 1	10 + 17,4	1 + 1,74	0,1 + 0,174
rFlaA:Betv1	27,4	2,74	0,274
Die Stimulation der BMDMs mit rBet v 1 und rFlaA erfolgte in der Mixtur mit gegenüber dem Fusionsprotein äquimolaren Konzentrationen			

In jede Kavität einer 24-Well-Platte wurden nun $6,4 \cdot 10^5$ Zellen/ml in einem Volumen von 500 μ l gegeben. Unter Berücksichtigung der Stimulantien, die darauffolgend hinzugegeben wurden, wurde so die Zellkonzentration bei einem Gesamtvolumen von 1 ml auf $3,2 \cdot 10^5$ Zellen/ml eingestellt.

Die Makrophagen wurden im Anschluss für einen Zeitraum von 3,5 Tagen im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO₂ und 80 % rel. Luftfeuchte inkubiert.

3.2.3 Inhibition

Für die prä-stimulatorische Inhibition der spezifischen Signaltransduktionswege, welche bei Aktivierung durch das Fusionsprotein untersucht wurden, wurden die Makrophagen 90 Minuten mit dem jeweiligen Inhibitor vorinkubiert.

Es wurden im Folgenden beschriebene Inhibitoren verwendet.

Rapamycin als wichtiger Inhibitor des mTOR-Signaltransduktionsweges, U0126 sowie SB202190 als wichtige Inhibitoren des MAP-Kinasesignaltransduktionsweges und ZVAD (Li et al., 2019) als Inflammasom-Inhibitor (Tabelle 4).

Tabelle 5

Inhibitor	Konzentration [nM]		
Rapamycin	0,1	1	10
U0126	0,1	1	10
SB202190	600	6000	60000
Z-VAD-FMK	0,01	0,1	1
Konzentrationen der verwendeten Inhibitoren			

3.3 Ko-Kultur Experimente

Um die Wechselwirkung Bet v 1-spezifischer Th2-T-Zellen und Makrophagen bei Stimulation mit dem Fusionsprotein zu untersuchen, wurden diese in Ko-Kultur gebracht.

3.3.1 Generierung Bet v 1-spezifischer, Th2-geprimter T-Zellen

Sämtliche Arbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen. Für die Generierung Bet v 1-spezifischer T-Zellen wurden 10 BALB/c-Mäuse im Alter von 12 Wochen über einen Zeitraum von 4 Wochen gegen rBet v 1 sensibilisiert. Dafür wurden zwei intraperitoneale Injektionen mit

je 10 µg rBet v 1 + 2 mg Aluminiumhydroxid in 200 µl PBS im Abstand von zwei Wochen appliziert. Dementsprechend wurde die Ko-Kultur 2 Wochen nach der zweiten Injektion angesetzt.

Dafür wurden die Mäuse durch Genickbruch getötet und die Milzen mithilfe des Präparationsbestecks steril aus der Maus präpariert. Die Kapsel der Milz wurde dabei ebenfalls abgelöst. Im nächsten Schritt wurden dann die Milzen mit dem Stempel einer 5 ml Spritze zermahlen.

Es folgte die magnetische Zellseparation (MACS, „*magnetic-activated cell sorting*“) zur Selektion der CD4⁺-T-Zellen nach dem Herstellerprotokoll von Miltenyi Biotec. Im Anschluss daran konnten diese Zellen gezählt werden (siehe 3.1.2).

3.3.2 Ansetzen der Ko-Kulturen

Zum Ansetzen der Ko-Kulturen wurden $6,3 \cdot 10^5$ CD4⁺-T-Zellen und $5 \cdot 10^5$ BALB/c-Makrophagen pro 500 µl Gesamtvolumen in 48-Well-Platten in Kultur gebracht. Die Stimulation erfolgte mit den gleichen Proteinen wie in der Makrophagenkultur, jedoch in abweichender Konstellation: Um den Effekt des Fusionsproteins auf die allergenspezifische Immunreaktion der Ko-Kultur zu untersuchen, wurden Zellen nur mit rBet v 1 (Positivkontrolle zur Restimulation der erzeugten Bet v 1-spezifischen T-Zellen), mit rFlaA:Betv1 (Wirkung des Fusionsprotein auf die T-Zellen) oder mit rBet v 1 + rFlaA + rBet v 1 und rBet v 1 + rFlaA:Betv1 (Untersuchung der Modulation rBet v 1-induzierter T-Zellantworten durch entweder das Fusionsprotein oder Flagellin) stimuliert. Die Mengen an rBet v 1 und rFlaA im Fusionsprotein und Proteinmixtureansatz waren dabei äquimolar zueinander (Tabelle 6).

Die Stimulation erfolgte unter denselben Bedingungen wie die Makrophagenstimulation. Abweichend davon wurde jedoch bereits nach 24 h vorsichtig 50 µl des Überstandes zwecks Untersuchung von IL-2 abgenommen.

Tabelle 6

Stimulationsprotein	Konzentrationen [$\mu\text{g/ml}$]		
LPS	10		
rBet v 1	2	10	20
rFlaA:Betv1	5,48	27,4	54,8
rBet v 1 + rFlaA + rBet v 1	2 + 2 + 3,48	10 + 10 + 17,4	20 + 20 + 34,8
rBet v 1 + rFlaA:Betv1	2 + 5,48	10 + 27,4	20 + 54,8
Die Stimulation der Ko-Kultur mit rBet v 1 und rFlaA erfolgte in der Mixtur mit gegenüber dem Fusionsprotein äquimolaren Konzentrationen			

3.4 Aliquotieren der Überstände

Zur Auswertung der Überstände wurden diese zu je 250 μl auf mehrere unbeschichtete 96-Well-Platten überführt. Hierbei wurden jeweils 1 ml Stimulationsansatz auf vier 96-Well-Platten zu 250 μl /Well übertragen, sodass zur besseren Steuerung jedes Experiment in Kopie auf 4 Platten vorhanden war, darunter die letzte der 4 Platten mit den am Wellboden befindlichen Zellen. Nachdem die Platten mit Folie abgedeckt wurden, wurden diese bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren. Die Messung des Warburg-Effektes fand dabei noch vor dem Einfrieren der Überstände statt.

3.4.1 FACS

Zur Beurteilung der Qualität der BMDMs wurden diese mithilfe der Fluoreszenz-aktivierten Zellsortierung (FACS) überprüft.

Dabei wurden sowohl die unstimulierten Makrophagen als auch die stimulierten Makrophagen nach der 3,5-tägigen Inkubation auf Toxizität untersucht. Die Überprüfung der Toxizität war hierbei insofern von zentraler Bedeutung, da für die darauffolgenden Experimente die quantitative Bestimmung von Stoffwechselaktivität und Zytokinsekretion im Zentrum stand. Starke Abweichungen bezüglich der Toxizität hätten die Messung der Aktivität der Zellen stark verfälschen können.

Nach der Inkubation wurden die Überstände inklusive der Zellen vollständig in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und bei 6 Minuten und 6000 RPM bei Raumtemperatur zentrifugiert. Anschließend wurden die hierbei entstehenden Überstände zurück in die 24-Well-Platten überführt, auf die 96-Well-Platten übertragen (s. o.) und eingefroren. Die in den Reaktionsgefäßen verbliebenen Zellen wurden dann für jeweils einen Stimulationsansatz in 0,05 ml PBS gepoolt und mit 1 μl Viability Dye („fixable viability dye eF780“) angefärbt. Hierfür

erfolgte eine Inkubation bei Dunkelheit und 4 °C für 30 Minuten. Der nächste Schritt bestand in der Zugabe von 1 ml FACS-Puffer und einer erneuten Zentrifugation bei 5 Minuten, 1200 RPM und Raumtemperatur. Nach dem Abkippen des Überstandes wurden nun 200 µl FACS-Puffer und 50 µl 4 % PFA (Fixierung, Paraformaldehyd) hinzugegeben, um die gefärbten Zellen für die FACS-Analyse zu stabilisieren, welche im Anschluss erfolgte.

Als Kontrolle dienten ungefärbte, nicht-inhibierte bzw. nicht stimulierte sowie getötete Zellen. Die Tötung der Zellen erfolgte durch Zugabe von 3 ml 70 % Ethanol für 5 Minuten.

Ein weiterer Aspekt bestand in der Untersuchung der Makrophagen auf spezifische Oberflächenantigene, um den Erfolg der durch die Stimulation mit M-CSF bewirkten Ausdifferenzierung zu beurteilen.

3.4.2 Bestimmung des Warburg-Effektes

Der nach Otto Warburg benannte Warburg-Effekt bezeichnet die farbliche Veränderung eines Zellkulturmediums als Ergebnis der von Krebszellen stark erhöhten anaeroben Glykolyse und der zugehörigen Milchsäuregärung (Warburg, 1956, Warburg et al., 1927).

Auch bei Makrophagen lässt sich der Warburg-Effekt beobachten. Insbesondere aktivierte proinflammatorische M1-Makrophagen nutzen die anaerobe Glykolyse als immunmetabolische Anpassung an ihren gesteigerten Energiebedarf unter oft hypoxischen Bedingungen im akut entzündeten Gewebe (Viola et al., 2019).

Zur Messung des Warburg-Effekts wurde für jedes Experiment die optische Dichte der in 96-Well-Platten überführten Überstände unmittelbar nach Überführung bei der Wellenlänge von 570 nm eingelesen. Bei einer starken Ausprägung des Warburg-Effekts resultierte so eine geringe optische Dichte für die im gelben Farbspektrum befindliche Wellenlänge von 570 nm. Die Absorptionswerte wurden dementsprechend invertiert und normiert auf die Werte der unstimulierten Proben dargestellt.

3.4.3 Bestimmung der Glucose-Spiegel im Zellkulturmedium

Um den Glucosstoffwechsel der Makrophagen zu untersuchen, wurde die im Zellkulturüberstand nach Stimulation verbliebene Glucosekonzentration gemessen. Dazu wurde ein Glucose-Assay-Kit der Firma Sigma-Aldrich (Tabelle 2) verwendet.

Die zugrundeliegende Reaktion besteht aus drei Schritten. Im ersten Schritt wird die Reaktion von D-Glucose + H₂O + O₂ zu D-Gluconsäure + H₂O₂ durch das Enzym Glucose-Oxidase

katalysiert. Dann reagiert H_2O_2 mit o-Dianisidin unter Einfluss einer Peroxidase. Dabei wird o-Dianisidin oxidiert und färbt sich braun. Im letzten Schritt kann dann diese Reaktion gestoppt werden, indem das oxidierte braune o-Dianisidin unter Zugabe von H_2SO_4 reagiert und sich dabei pink anfärbt (Bergmeyer, 1974). Das Ausmaß der Pinkfärbung kann dann durch Messung der optischen Dichte bei 540 nm bestimmt werden. Durch das Verwenden einer Glucose-Standardreihe lässt sich somit der genaue Glucosegehalt der Probe errechnen.

Die Proben wurden in einer Verdünnung von 1:30 in Reinstwasser zu 40 µl auf einer 96-Well-Platte aufgetragen. Zusätzlich wurde eine Standardreihe von jeweils 20, 40, 60, 80 100 und 120 µg/ml D-Glucose aufgetragen, für Leerfelder wurde destilliertes Wasser verwendet. Im Anschluss wurde zum Starten der Reaktion eine 1:50-Mischung aus o-Dianisidin-Reagenz und Glucose-Oxidase/Peroxidase zu 80 µl hinzugegeben. Nach 10 Minuten Inkubation im Schüttelinkubator wurde die Reaktion mit 80 µl 12 N Schwefelsäure gestoppt. Die Messung der optischen Dichte erfolgte daraufhin bei 540 nm, die Berechnung der Konzentrationen unter Verwendung der Standardkurve erfolgte mittels Softmax Pro 6 Software.

3.4.4 Sandwich-ELISA

Die Abkürzung ELISA steht für *enzyme-linked immunosorbent assay* und beschreibt ein Detektionsverfahren zum Nachweis von Proteinen. Der Sandwich-ELISA stellt dabei eine Sonderform dar. Im Gegensatz zum direkten ELISA wird bei dem Sandwich-ELISA ein Capture- bzw. Coat-Antikörper verwendet, um eine spezifische Bindung des zu detektierenden Antikörpers auf der Mikrotiterplatte zu ermöglichen.

Für das Verfahren wurde eine beschichtete, stark bindende Testplatte (*High Binding*, Sarstedt) verwendet, auf die in mehreren Schritten verschiedene Bindungspartner aufgetragen wurden.

Zwischen den einzelnen Schritten erfolgten Waschvorgänge mittels Waschpuffer PBS mit 0,05 % Tween 10, 4 x 300 µl, sodass nach jedem Schritt jeweils nur die gebundenen Proteine auf der Testplatte verblieben.

Coating:

In einem ersten Schritt wurden die Coat-Antikörper, (IL-1β 1:500, IL-2 1:500, IL-5 BD OptEIA ELISA Set, IL-6 1:1000, IL-10 Development-Kit, IL-13 Ready-Set-Go!-Kit, IFNγ BD OptEIA ELISA Set, TNF-α 1:500) siehe Materialteil (Tabelle 2), mit dem zugehörigen Puffer zu 50 µl/Well aufgetragen. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 4 °C.

Blocken:

Zum Blocken der verbleibenden Bindestellen der stark bindenden Platte wurde PBS + 10 % FCS zu 300 µl/Well verwendet. Die Inkubationszeit hierfür betrug eine Stunde.

Proben und Standard:

Die Proben wurden bei Bedarf mit PBS + 10 % FCS verdünnt, der Puffer, der zum Verdünnen der Standardreihe eingesetzt wurde, war ebenfalls PBS + 10 % FCS. Die Proben sowie der Standard wurden zu 50 µl/Well aufgetragen und über Nacht bei 4 °C inkubiert.

Detektion:

Der jeweilige Biotin-markierte Detektionsantikörper (IL-1 β 1:500, IL-2 1:500, IL-5 BD OptEIA ELISA Set, IL-6 1:1000, IL-10 Development-Kit, IL-13 Ready-Set-Go!-Kit, IFN γ BD OptEIA ELISA Set, TNF- α 1:250) (Tabelle 2) wurde in PBS + 10 % FCS verdünnt und ebenfalls zu 50 µl/Well aufgetragen. Die Inkubationszeit betrug eine Stunde. Im Anschluss daran erfolgte ein weiterer Detektionsschritt, indem mit Meerrettichperoxidase (HRP) konjugiertes Streptavidin zu 50 µl/Well aufgetragen wurde. Am Ende der Detektion waren nun zu der Menge an zu detektierendem Protein proportionale Mengen an Meerrettichperoxidase in den entsprechenden Wells gebunden.

Entwicklung:

Die Detektion des ELISAs konnte nun erfolgen, indem eine TMB-Färbelösung aus TMB (3,3',5,5'-Tetramethylbenzidin), H₂O₂ und Citratpuffer aufgetragen wurde. Die Meerrettichperoxidase katalysierte nun die Reduktion von H₂O₂ zu H₂O (Bergmeyer, 1974). Dabei wurde TMB oxidiert und färbte sich blau mit einer maximalen optischen Dichte bei 650 nm. Die Färbung wurde dann mit H₂SO₄ arretiert und TMB erfuhr einen erneuten Farbumschlag zu gelb mit einer maximalen optischen Dichte bei 450 nm. Bei dieser Wellenlänge wurde die Testplatte eingelesen.

3.5 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte mit GraphPad Prism der Firma Dotmatics. Es erfolgte eine zweifache Varianzanalyse. Dabei wurden die Konfidenzintervalle nach der Tukey-Methode für Mehrfachvergleich angepasst. Für statistisch signifikante Ergebnisse wurde die folgende Konvention verwendet: * p-Wert < 0,05, ** p-Wert < 0,01, *** p-Wert < 0,001.

4 Ergebnisse

4.1 Die Stimulation der Knochenmarkszellen mit M-CSF zeigte eine erfolgreiche Differenzierung hin zu hochreinen BMDMs

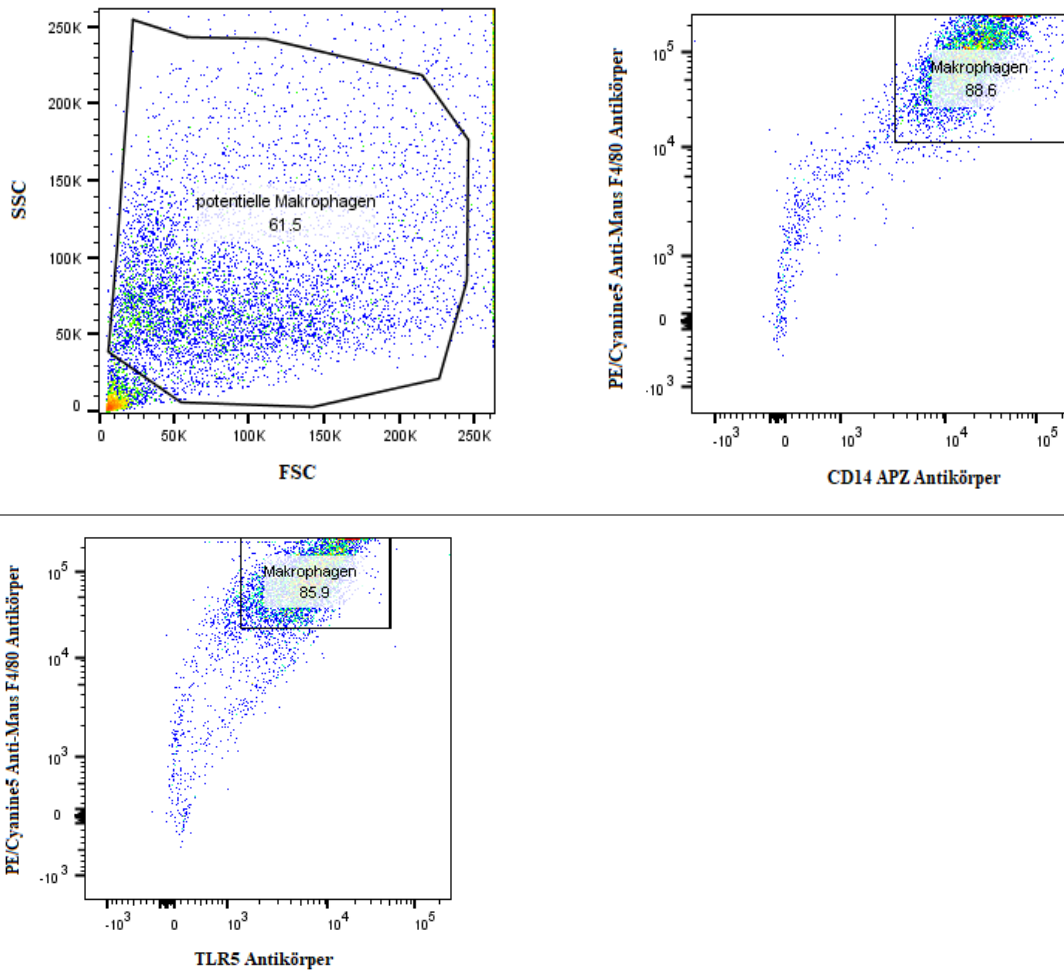
Für die geplanten Experimente sollten Knochenmarks-abgeleitete, in-vitro-differenzierte Makrophagen aus der Maus verwendet werden. Diese wurden nach dem in Material und Methoden beschriebenen Protokoll generiert (siehe Kapitel 3.1.3). Die Kontrolle der Reinheit der differenzierten BMDMs erfolgte exemplarisch anhand eines Experimentes nach erfolgter Stimulation anhand der Morphologie sowie der Expression unten genannter Oberflächenantigene (Abbildung 5) Insbesondere erfolgte die Analyse der Expressionslevel des TLR5.

Die Auftragung der Zellgröße mittels Vorwärtsstreuung, FSC („*forward scatter*“), sowie der Zellgranularität mittels Seitenstreuung, SSC („*side scatter*“), hatte zunächst eine breite Größenstreuung mit einem geschätzten Anteil von 61,5 % Makrophagen zum Ergebnis (Abbildung 5).

Für den zweiten Schritt erfolgte die Analyse der Oberflächenantigene der durch das Gating ausgewählten Zellen. Bei dem Vergleich mit ungefärbten BMDMs konnte die Fluoreszenz-Markierung für TLR5, CD11b sowie CD14 gezeigt werden. Für die Kontrolle mit ungefärbten Zellen zeigte sich jeweils ein deutlich (TLR5 und CD11b: > Faktor 10) bzw. stark (CD14: > Faktor 1000) abweichendes Signalintensitätsmaximum der gefärbten gegenüber den ungefärbten Zellen (Abbildung 6)

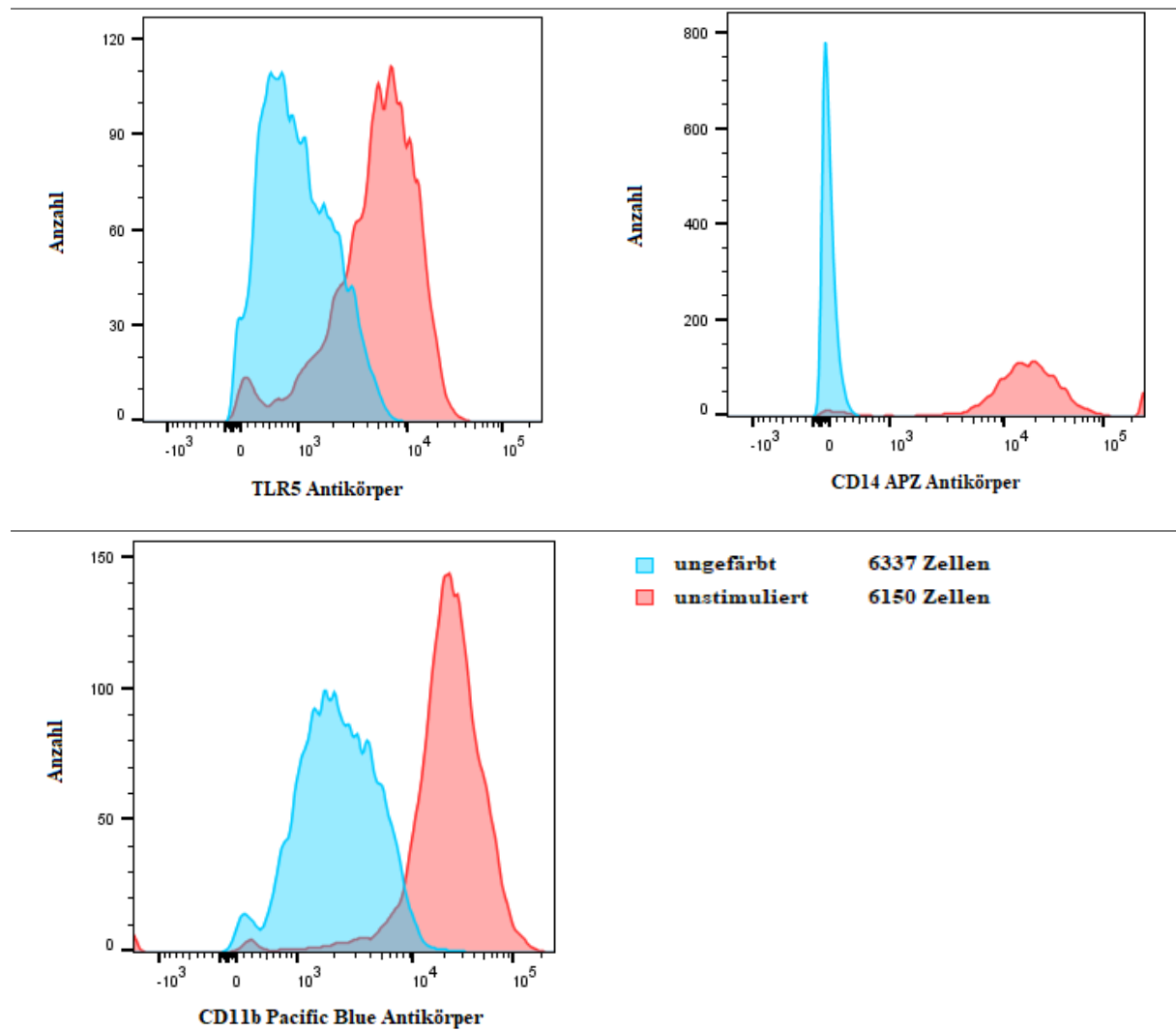
Diese Markierung bestätigte die erfolgreiche M-CSF-gesteuerte Ausdifferenzierung der Zellen zu Makrophagen mit erfolgreicher hoher Reinheit der Zellpopulation (CD14: 88,6 % und TLR5: 85,9 %) (Abbildung 5).

Abbildung 5



Die mit M-CSF ausdifferenzierten Zellen zeigen eine breite Größen- und Granularitätsverteilung. Erst die zusätzliche Analyse der Makrophagen-typischen Oberflächenmarker F4/80 und CD14 lässt eine weitgehende Eingrenzung der Makrophagen zu. Die Signale sind jeweils das Integral der Signalkurve (Area, A) der Einzelsignale. Die Daten sind das Ergebnis eines Experiments.

Abbildung 6



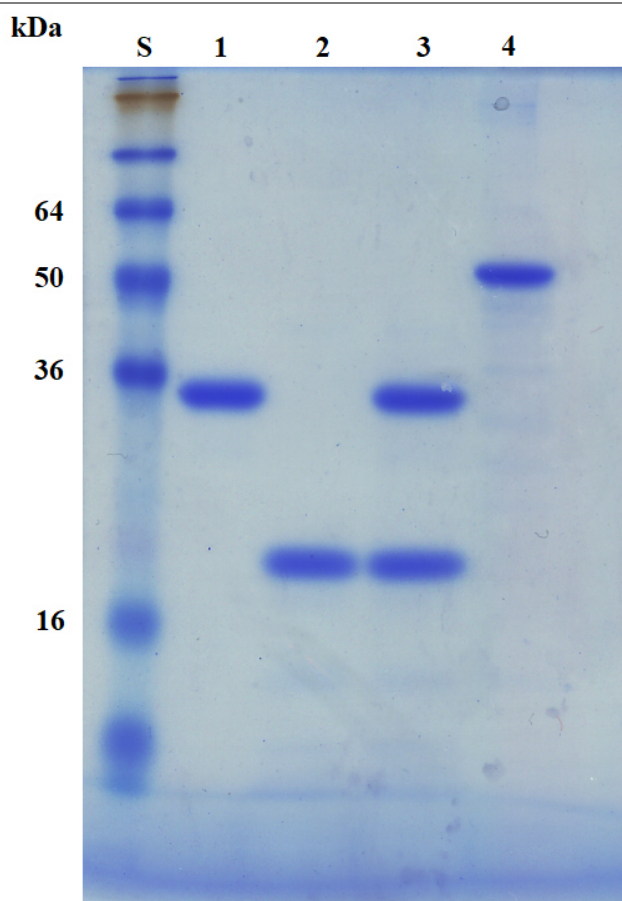
Die Kontrolle der Fluoreszenz-Marker mit ungefärbten Zellen zeigt eine Expression von TLR5, CD14 und CD11b auf den differenzierten BMDMs. Die Signale im FACS sind jeweils das Integral der Signalkurve (Area, A) der Einzelsignale. Die Daten sind das Ergebnis eines Experiments.

4.2 Die Stimulationsproteine rBet v 1, rFlaA, die Mixtur rBet v 1 + rFlaA und rFlaA:Betv1 zeigen eine hohe Reinheit

Vor der Stimulation der BMDMs erfolgte die Kontrolle der Qualität der aus der Arbeitsgruppe stammenden Stimulationsproteine rBet v 1, rFlaA, rBet v 1 + rFlaA und rFlaA:Betv1 mittels Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Abbildung 7).

Hierbei ließen sich die verwendeten Proteine als größtenteils scharf abgrenzbare, prominente Einzelbanden nachweisen (Abbildung 7). Für das Fusionsprotein ließen sich zusätzliche sehr feine/schwache Banden unter der Hauptbande sowie zusätzliche minimale Banden für rBet v 1 sowohl in der Mixtur als auch in der isolierten Betrachtung nachweisen. Damit konnte eine starke Verunreinigung oder relevante Einschränkung der Reinheit der verwendeten Stimulationsproteine ausgeschlossen werden.

Abbildung 7

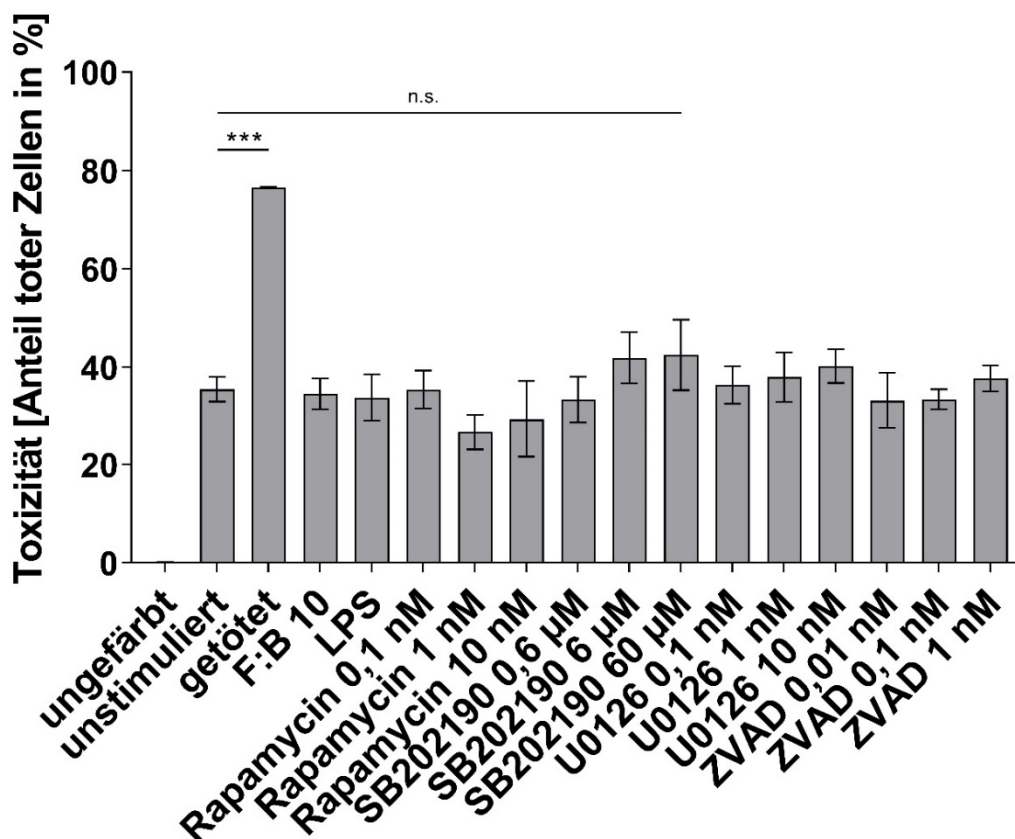


Die Stimulationsproteine rBet v 1, rFlaA, deren Mixtur und rFlaA:Betv1 zeigen eine hohe Reinheit und entsprechend gute Auftrennbarkeit. Es erfolgte der Auftrag von rFlaA (1), rBet v 1 (2), rFlaA + rBet v 1 (3) und rFlaA:Betv1 (4) sowie des SeeBlue Plus2 Proteinstandards (S) auf einem Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gel. Die Anfärbung erfolgte mittels GelCode Blue.

4.3 Eine Vorbehandlung der murinen Knochenmarksmakrophagen mit den verwendeten Inhibitoren zeigt nur eine geringe Toxizität

Die Behandlung der Makrophagen mit Rapamycin, SB202190, U0126 und Z-VAD-FMK führte nicht zu einer statistisch signifikanten Erhöhung der Frequenz toter Zellen mittels FACS-Analyse. Die Behandlung der Zellen mit Ethanol hingegen führte zu einer statistisch signifikanten Erhöhung des Anteils toter Zellen um den Faktor 2,2 verglichen mit den unstimulierten Zellen (Abbildung 8). Diese Ergebnisse legen nahe, dass die verwendeten Inhibitorkonzentrationen nur einen minimalen Einfluss auf die Viabilität der verwendeten Makrophagen haben und deswegen für die mechanistischen Untersuchungen verwendet werden können.

Abbildung 8



Die Prä-Inhibition der Makrophagen mit den verwendeten Inhibitoren wirkt sich mäßig toxisch aus. Die BMDMs aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen wurden nach der Inhibition für 96 Stunden mit Rapamycin, SB202190, U0126 und Z-VAD-FMK mit fixable Viability Dye eF780 angefärbt. Der Anteil toter Zellen wurde in % angegeben. Die dargestellten Daten sind das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente plus/minus SD. Statistische Signifikanz wurde berechnet mit einfaktorieller Varianzanalyse, dargestellt als: n.s. p-Wert > 0,5, * p-Wert < 0,5, ** p-Wert < 0,01, *** p-Wert < 0,001.

4.4 Die Aktivierung der BMDMs durch rFlaA:Betv1 führt zur Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine sowie zur Aktivierung des Zellmetabolismus

Um den Effekt des Fusionsproteins rFlaA:Betv1 auf murine Makrophagen zu untersuchen, wurden diese aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen differenziert (BMDMs), mit äquimolaren Mengen rBet v 1, rFlaA, rFlaA + rBet v 1 sowie rFlaA:Betv1 für die Dauer von 96 Stunden stimuliert und auf die Ausschüttung der Zytokine IL-10, IL-6, TNF- α sowie IL-1 β hin untersucht (Abbildung 9). Ebenfalls erfolgte die Untersuchung des Metabolismus durch Bestimmung des Warburg-Effekts (gemessen anhand der optischen Dichte bei der Wellenlänge 570 nm) sowie die Messung der Glucose-Konzentration im Zellkulturmedium.

Sowohl die Stimulation mit der Mixtur beider Einzelproteine als auch mit dem Fusionsprotein führte zu einer starken Aktivierung des Zuckermetabolismus, welche sich in einem erhöhten Warburg-Effekt widerspiegelte. Bei der Messung des Warburg-Effektes tat sich die Aktivierung durch das Fusionsprotein zusätzlich als signifikant stärker hervor als durch die äquimolare Menge beider Einzelproteine oder deren Mischung (Abbildung 9).

Diese Aktivierung des Zuckerstoffwechsels in Fusionsprotein-stimulierten Makrophagen wurde begleitet durch eine starke Zytokinsekretion. Bei der Gegenüberstellung der Aktivierung der Makrophagen durch das Fusionsprotein bzw. die äquimolare Mixtur beider Einzelproteine zeigten sich starke Unterschiede im Besonderen bei der Sekretion sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine. So war sowohl die Sekretion von antiinflammatorischem IL-10 als auch die Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6 und TNF- α 96 h nach Stimulation durch das Fusionsprotein signifikant stärker als nach Stimulation mit der Mixtur von rFlaA + rBet v 1 (Abbildung 9 C). Interessanterweise war dieser Unterschied stark betont. So zeigte sich bei der Ausschüttung von IL-10 eine um den Faktor 6 höhere Konzentration im Überstand (rFlaA:Betv1: 299,0 pg/ml vs. rFlaA + rBet v 1: 48.8 pg/ml) bei der höchsten verwendeten Stimulationskonzentration, bei IL-6 um den Faktor 3,4 (rFlaA:Betv1: 9,47 ng/ml vs. rFlaA + rBet v 1: 2,75 ng/ml) und bei TNF- α um den Faktor 5,5 (rFlaA:Betv1: 40,6 pg/ml vs. rFlaA + rBet v 1: 7,34 pg/ml) (Abbildung 9 C).

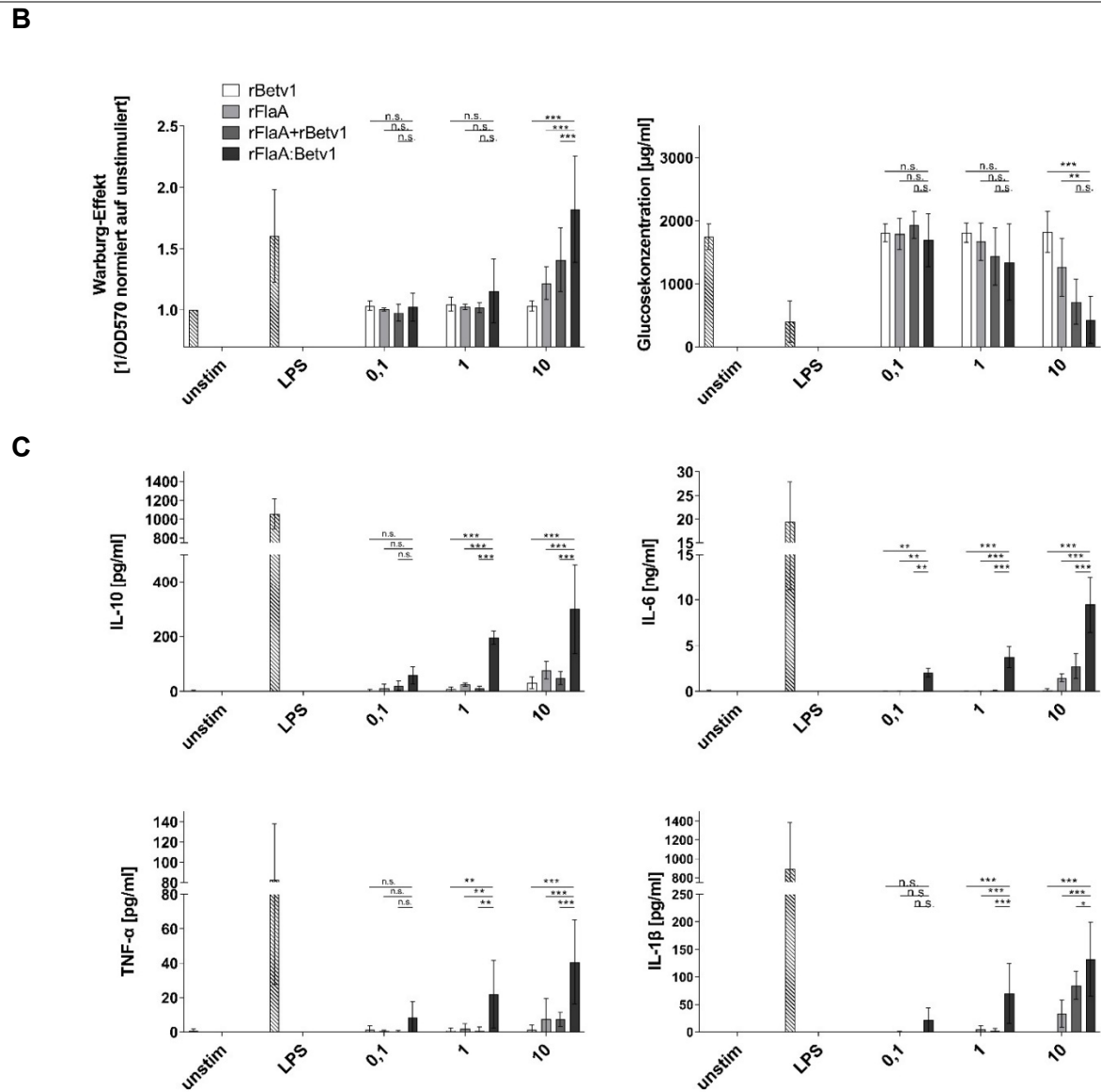
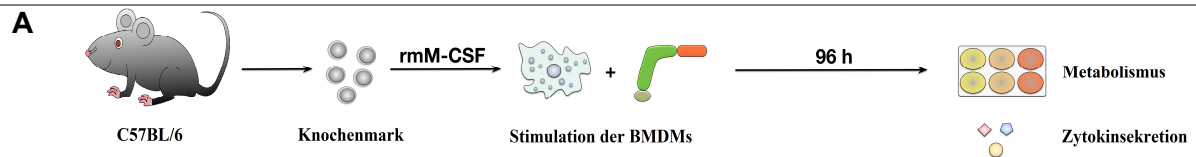
Das als Positivkontrolle verwendete LPS führte erwartungsgemäß zu einer deutlich nachweisbaren Sekretion aller untersuchten Zytokine (IL-10: 1057 pg/ml, IL-6: 19,5 ng/ml, TNF- α : 82,7 ng/ml, IL-1 β : 896 ng/ml bei einer Stimulation mit 10 μ g/ml LPS) sowie einer Aktivierung des Zuckerstoffwechsels in den untersuchten Makrophagen (Glucosekonsum: 1600 μ g/ml, Warburg-Effekt-Faktor: 1,60).

Vergleichbare Resultate konnten auch für BALB/c-Mäuse nachgewiesen werden (Abbildung 10) darunter insbesondere die stark erhöhte IL-10-Ausschüttung nach Stimulation mit dem

Fusionsprotein im Vergleich zur äquimolaren Mixtur beider Einzelproteine (rFlaA:Betv1: 182,5 pg/ml vs. rFlaA + rBet v 1: 19,0 pg/ml, Faktor 9,6).

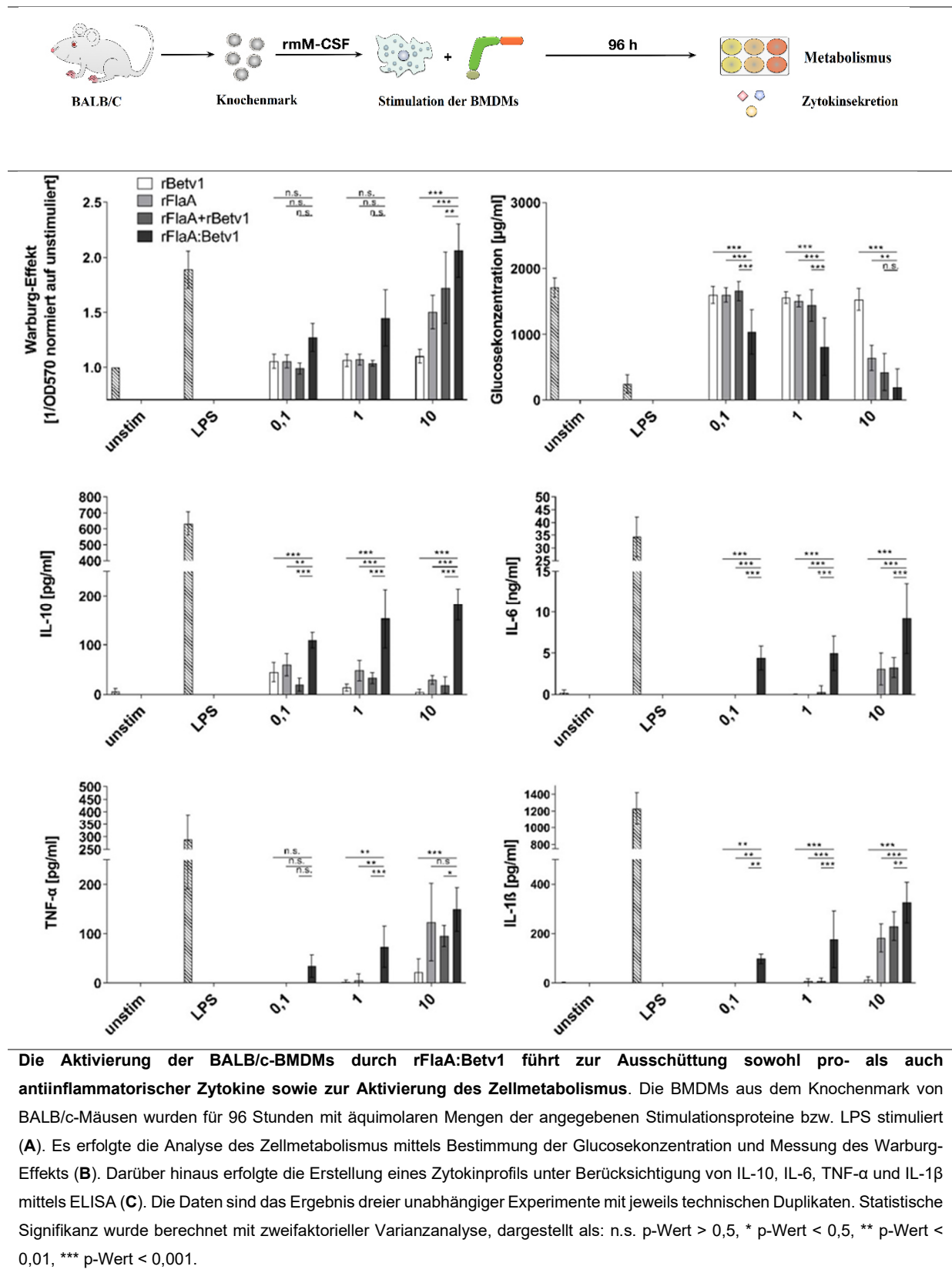
Zusammenfassend ließ sich also eine signifikant stärkere Aktivierung der BMDMs durch rFlaA:Betv1 gegenüber der äquimolaren Menge der Einzelproteine in der Mixtur herausstellen.

Abbildung 9



Die Aktivierung der C57BL/6-BMDMs durch rFlaA:Betv1 führt zur Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine sowie zur Aktivierung des Zellmetabolismus. Die BMDMs aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen wurden für 96 Stunden mit äquimolaren Mengen an Stimulationsproteinen bzw. LPS stimuliert (A). Es erfolgte die Analyse des Zellmetabolismus mittels Bestimmung der Glucosekonzentration und Messung des Warburg-Effekts (B). Darüber hinaus erfolgte die Erstellung eines Zytokinprofils unter Berücksichtigung von IL-10, IL-6, TNF- α und IL-1 β mittels ELISA (C). Die Daten sind das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente mit jeweils technischen Duplikaten. Statistische Signifikanz wurde berechnet mit zweifaktorieller Varianzanalyse, dargestellt als: n.s. p-Wert > 0,5, * p-Wert < 0,5, ** p-Wert < 0,01, *** p-Wert < 0,001.

Abbildung 10



Die Aktivierung der BALB/c-BMDMs durch rFlaA:Betv1 führt zur Ausschüttung sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine sowie zur Aktivierung des Zellmetabolismus. Die BMDMs aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen wurden für 96 Stunden mit äquimolaren Mengen der angegebenen Stimulationsproteine bzw. LPS stimuliert (A). Es erfolgte die Analyse des Zellmetabolismus mittels Bestimmung der Glucosekonzentration und Messung des Warburg-Effekts (B). Darüber hinaus erfolgte die Erstellung eines Zytokinprofils unter Berücksichtigung von IL-10, IL-6, TNF-α und IL-1β mittels ELISA (C). Die Daten sind das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente mit jeweils technischen Duplikaten. Statistische Signifikanz wurde berechnet mit zweifaktorieller Varianzanalyse, dargestellt als: n.s. p-Wert > 0,5, * p-Wert < 0,5, ** p-Wert < 0,01, *** p-Wert < 0,001.

4.5 Die Aktivierung des Metabolismus der BMDMs ist mTOR-abhängig, wohingegen die Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine nach 96 Stunden nicht stark mTOR-abhängig ist

Im nächsten Schritt sollten die der rFlaA:Betv1-vermittelten Makrophagen-Aktivierung zugrundeliegenden Mechanismen untersucht werden. Ein wichtiger Regulator von sowohl Zellstoffwechsel als auch der Einleitung von Immunantworten ist der mTOR-Komplex 1 (mTORC1), welcher über Rapamycin spezifisch inhibiert werden kann.

Hierfür wurden aus BALB/c- und C57BL/6-Mäusen differenzierte BMDMs vor der Stimulation mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 mit Rapamycin zur Inhibition des mTORC1 für die Dauer von 90 Minuten vorbehandelt. Die Analyse des Zellmetabolismus sowie der Zytokinsekretion erfolgte nach weiteren 96 Stunden.

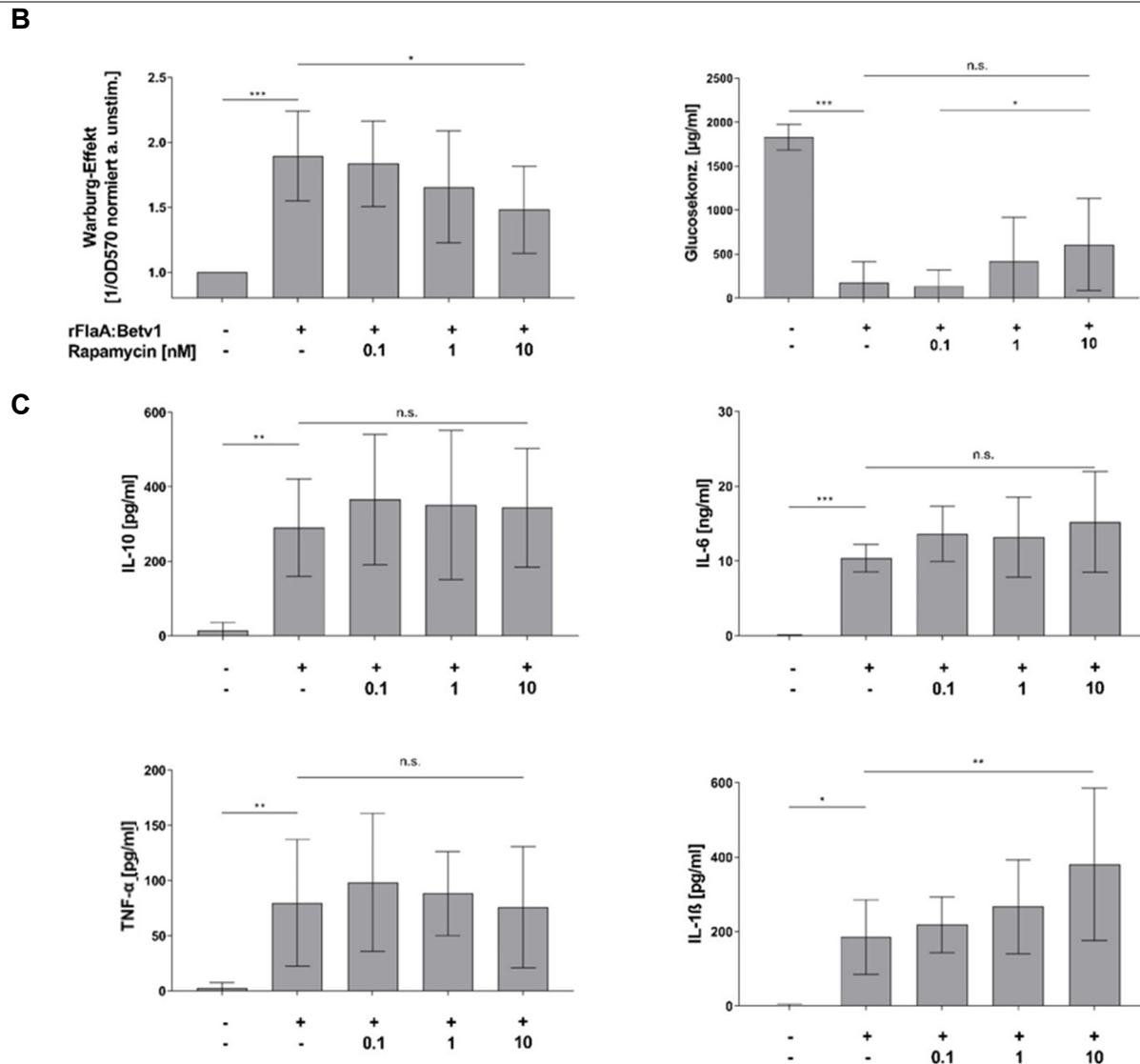
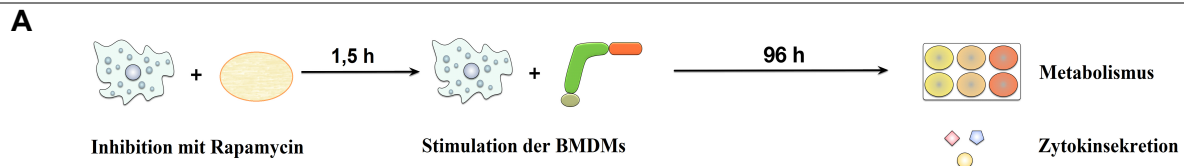
Bei der Analyse des Zellmetabolismus der C57BL/6-BMDMs zeigte sich eine mTOR-Abhängigkeit der Stimulation mit dem Fusionsprotein. Sowohl der rFlaA:Betv1-induzierte Warburg-Effekt als auch der erhöhte Glucose-Konsum der Zellen wurden durch eine prä-stimulatorische Inhibition mit Rapamycin zum Teil unterdrückt. In der Dosis von 10 nM Rapamycin wurde der Glucosekonsum um 25,4 % gegenüber der Inhibition mit 0,1 nM Rapamycin reduziert (Rapamycin 0,1 nM + rFlaA:Betv1: 1867 µg/ml vs. Rapamycin 10 nM + rFlaA:Betv1: 1392 µg/ml) (Abbildung 11 B).

Dies ließ sich ebenfalls für BALB/c-BMDMs nachweisen (rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition: 1839 µg/ml vs. Rapamycin 10 nM + rFlaA:Betv1: 1310 µg/ml; Reduktion um 28,8 %) (Abbildung A 1 B).

Auffällig war der geringfügige Einfluss von mTORC1 auf die rFlaA:Betv1-induzierte Zytokinsekretion der C57BL/6-BMDMs. Hier konnten nach 96 Stunden in den Zellüberständen keine generellen Effekte der Rapamycin-Vorinhibition im Vergleich zu nicht-inhibierten, rFlaA:Betv1-stimulierten Zellen gezeigt werden. Allerdings zeigte sich eine zwischen den BMDMs der beiden Mäusestämmen diskrepante Wirkung von Rapamycin auf die Sekretion von IL-1 β . Wider Erwarten wurde die rFlaA:Betv1-induzierte Sekretion von IL-1 β bei C57BL/6-BMDMs (Abbildung 11 C) durch eine Inhibition mit Rapamycin verstärkt (rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition: 185,0 pg/ml vs. Rapamycin 10 nM + rFlaA:Betv1: 380,5 pg/ml, Faktor 2,1), während sie bei BALB/c-BMDMs (Abbildung A 1 C) verringert wurde (rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition: 386,0 pg/ml vs. Rapamycin 10 nM + rFlaA:Betv1: 127 pg/ml, Faktor 0,3). Erwähnenswert ist in diesem Zusammenhang jedoch die generell stärkere Sekretion von IL-1 β durch BALB/c-BMDMs (rFlaA:Betv1: 324,9 pg/ml, Abbildung 10 C) im Vergleich zu C57BL/6-BMDMs (rFlaA:Betv1 132,2 pg/ml, Abbildung 9 C). Zusätzlich konnte eine Reduktion der rFlaA:Betv1-induzierten Sekretion von IL-10 (rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition: 194,5 pg/ml

vs. Rapamycin 10 nM + rFlaA:Betv1: 126,3 pg/ml, Faktor 0,65) und TNF- α (rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition: 216,1 pg/ml vs. Rapamycin 10 nM + rFlaA:Betv1: 60,5 pg/ml, Faktor 0,28) bei Vorinhibition mit Rapamycin für BALB/c-BMDMs nachgewiesen werden (Abbildung A 1 C).

Abbildung 11



In C57BL/6-BMDMs ist die Aktivierung des Zellmetabolismus mTOR-abhängig, die Zytokinsekretion jedoch größtenteils mTOR-unabhängig. BMDMs differenziert aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen wurden mit Rapamycin für 90 Minuten vorbehandelt und im Anschluss mit rFlaA:Betv1 für zusätzliche 96 h stimuliert. Die Analyse der Zellen erfolgte hinsichtlich der Aktivierung des Zellmetabolismus (Warburg-Effekt und Glucosemetabolismus) (B) sowie der Sekretion pro- (IL-6, TNF- α , IL-1 β) als auch antiinflammatorischer (IL-10) Zytokine. Die Daten sind das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente mit jeweils technischen Duplikaten – statistische Signifikanz berechnet mit zweifaktorieller Varianzanalyse, dargestellt als: n.s. p-Wert > 0,5, * p-Wert < 0,5, ** p-Wert < 0,01, *** p-Wert < 0,001.

4.6 Die rFlaA:Betv1-induzierte IL-10-Sekretion ist abhängig von der p38- und p42/44-MAP-Kinase, die Rolle dieser MAP-Kinasen für die Aktivierung des Metabolismus sowie die Sekretion proinflammatorischer Zytokine ist nicht eindeutig

Als Regulatoren einer Vielzahl zellulärer Signalkaskaden in Makrophagen (Miranda et al., 2002, Menon et al., 2011) wurde im nächsten Schritt die Rolle/der Beitrag sowohl der p38- als auch der p42/44-MAP-Kinase für die Fusionsprotein-vermittelte Aktivierung des Zellmetabolismus und der Zytokinsekretion untersucht.

Die BALB/c- und C57BL/6-abgeleiteten BMDMs wurden vor der Stimulation mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 für die Dauer von 90 Minuten mit entweder SB202190 oder U0126 zur Inhibition der p38-MAP-Kinase bzw. der p42/44-MAP-Kinase vorbehandelt. Die Analyse des Metabolismus sowie der Zytokinsekretion erfolgte wiederum nach 96 Stunden wie oben beschrieben.

Bei der Betrachtung der C57BL/6-Mäuse konnte für die Aktivierung des Zellmetabolismus (also für den Warburg-Effekt und den Glucosekonsum) weder eine Abhängigkeit von der p38-MAP-Kinase (Abbildung 12 B) noch von der p42/44-MAP-Kinase (Abbildung 13 B) nachgewiesen werden. Während diese MAPK-Unabhängigkeit der rFlaA:Betv1-vermittelten Aktivierung des Zellmetabolismus auch für die p38-MAP-Kinase in BALB/c-BMDMs gezeigt werden konnte (Abbildung A 2 B), zeigte sich in BALB/c-BMDMs eine Abhängigkeit der rFlaA:Betv1-induzierten Aktivierung des Zellmetabolismus von der p42/44-MAP-Kinase (Abbildung A 3 B). Der Glucosekonsum der Zellen war hier bei der Dosis von 10 nM U0126 um 38 % reduziert gegenüber der nicht-inhibierten Stimulation mit dem Fusionsprotein (U0126 10 nM + rFlaA:Betv1: 1233 µg/ml vs. rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition: 1987 µg/ml) und ein vergleichbarer Effekt zeigte sich bei der Minderung des Warburg-Effektes um 29 % (U0126 10 nM + rFlaA:Betv1: 1,69 vs. rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition: 1,89) (Abbildung A 3).

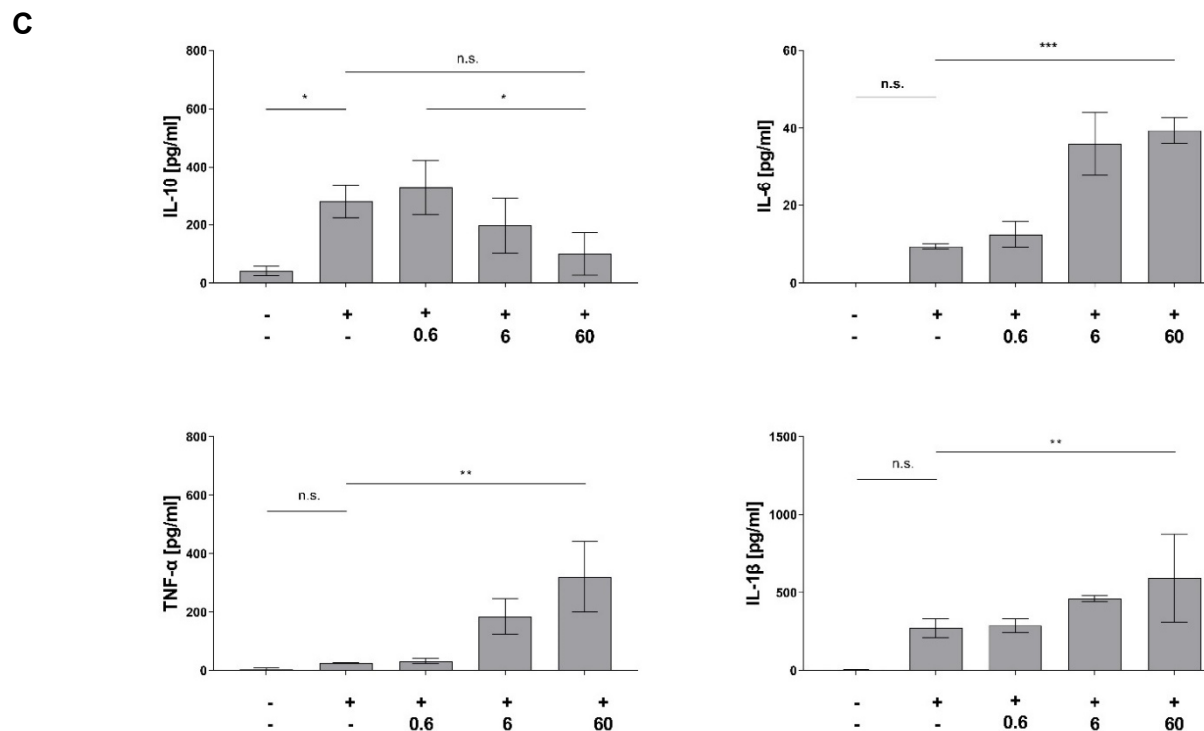
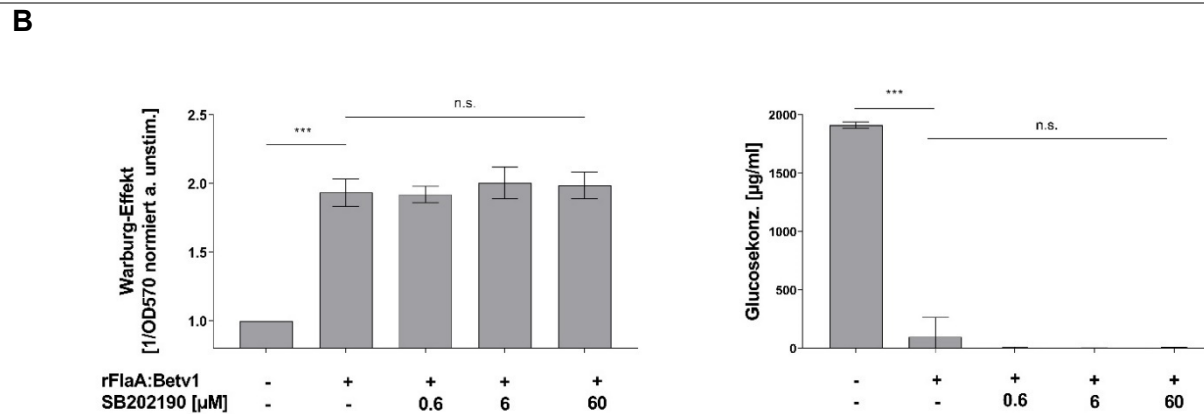
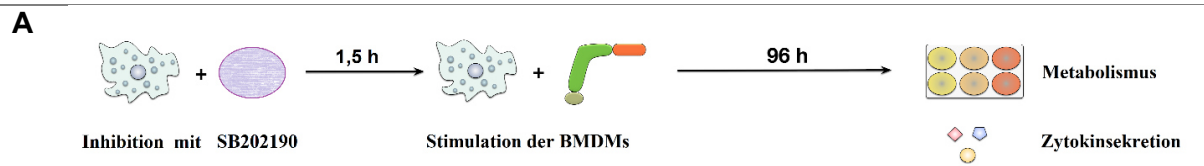
Bei der Messung der Zytokinsekretion war eine starke Abhängigkeit der durch rFlaA:Betv1-induzierten Sekretion von IL-10 von der p38-MAP-Kinase sowie der p42/44-MAP-Kinase sowohl in C57BL/6- als auch in BALB/c-BMDMs nachweisbar (Abbildung 12 C, Abbildung 13 C, Abbildung A 2 C, Abbildung A 3 C).

Die durch rFlaA:Betv1-induzierte IL-6-Sekretion wurde in C57BL/6-BMDMs bei der Inhibition beider untersuchten MAP-Kinasen dosisabhängig verstärkt: bei der Inhibition der p38-MAP-Kinase um den Faktor 4,2 (rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition: 9,4 ng/ml vs. SB202190 60 µM + rFlaA:Betv1: 39,4 ng/ml) (Abbildung 12 C) und bei der Inhibition der p42/44 um den Faktor 2,6 (rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition: 9,9 ng/ml vs. U0126 10 nM + rFlaA:Betv1: 25,7 ng/ml)

(Abbildung 13 C) Für BALB/c-BMDMs führte die Inhibition der beiden Kinasen nicht zu einer signifikanten Veränderung der rFlaA:Betv1-induzierten IL-6-Sekretion (Abbildung A 2 C, Abbildung A 3 C). Die Inhibition der p38 MAP-Kinase hatte in C57BL/6-BMDMs einen verstärkenden Effekt auf die durch rFlaA:Betv1-induzierte Sekretion der proinflammatorischen Zytokine TNF- α (rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition: 25,7 pg/ml vs. SB202190 60 μ M + rFlaA:Betv1: 320 pg/ml, Faktor 12,4) und IL-1 β (rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition: 272 pg/ml vs. SB202190 60 μ M + rFlaA:Betv1: 592 pg/ml, Faktor 2,2) (Abbildung 12 C). In den BALB/c-BMDMs hingegen zeigte sich lediglich für IL-1 β ein signifikanter Effekt, hier wurde in der höchsten verwendeten Inhibitorkonzentration (60 μ M) die rFlaA:Betv1-vermittelte IL-1 β -Sekretion um den Faktor 2,6 reduziert (rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition 386 pg/ml: vs. SB202190 60 μ M + rFlaA:Betv1: 147 pg/ml) (Abbildung A 2 C).

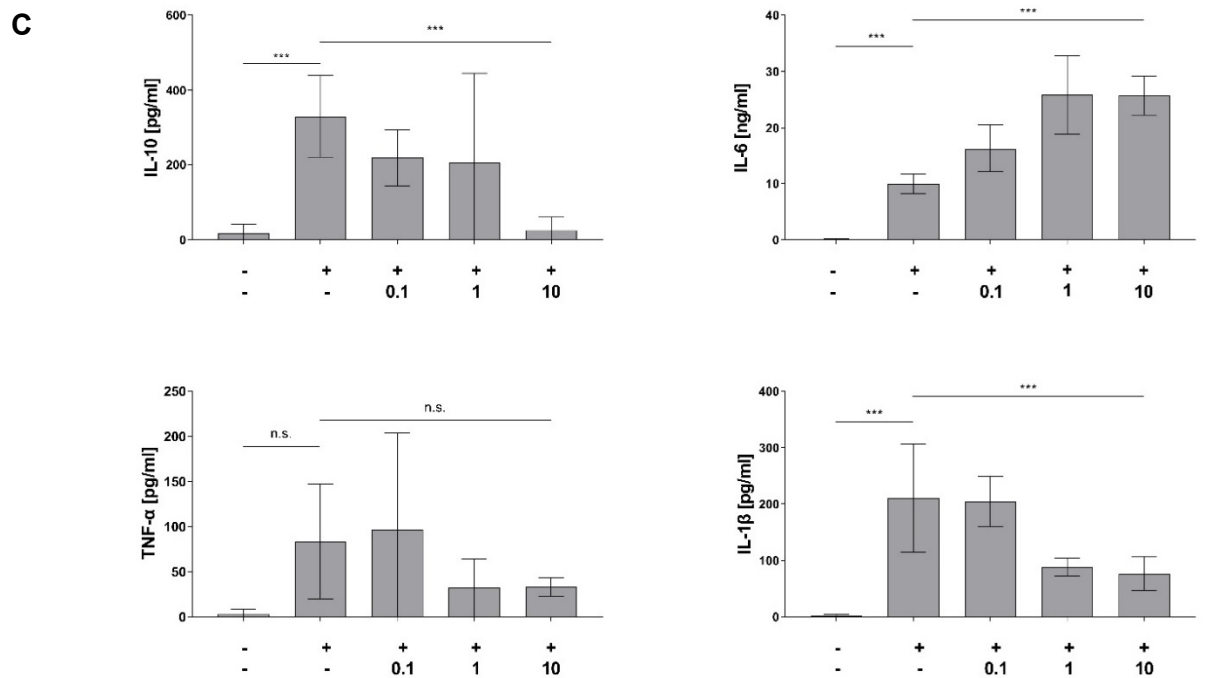
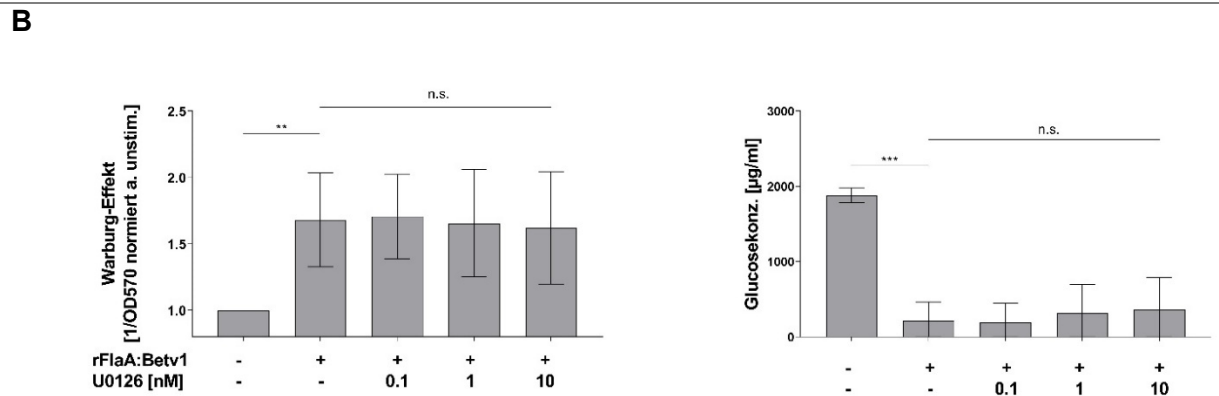
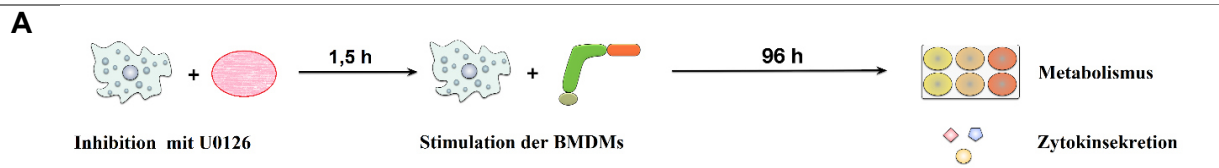
Das Ergebnis der prä-stimulatorischen Inhibition der p42/44-MAP-Kinase war eine reduzierte Sekretion von IL-1 β sowohl in den C57BL/6-BMDMs (rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition: 210 pg/ml vs. U0126 10 nM + rFlaA:Betv1: 76,5 pg/ml, Faktor 0,36) (Abbildung 13 C) als auch in den BALB/c-BMDMs (rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition: 291 pg/ml vs. U0126 10 nM + rFlaA:Betv1: 78,8 pg/ml, Faktor 0,27) (Abbildung A 3 C). Für die rFlaA:Betv1-vermittelte Sekretion von TNF- α fand sich in C57BL/6-BMDMs (Abbildung 13 C) kein signifikanter Beitrag der p42/44-MAP-Kinase, in BALB/c-BMDMs wurde hingegen dosisabhängig in der höchsten verwendeten Inhibitorkonzentration (10 nM) eine vollständige Suppression der rFlaA:Betv1-vermittelten TNF- α -Sekretion beobachtet (rFlaA:Betv1 ohne Vorinhibition: 170 pg/ml vs. U0126 10 nM + rFlaA:Betv1: unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA-Testsystems, Abbildung A 3 C).

Abbildung 12



Die Aktivierung der p38-MAPK trägt zur rFlaA:Betv1-induzierten Zytokinsekretion in BMDMs bei, hat aber keinen Einfluss auf die Aktivierung des Zuckermetabolismus. BMDMs, differenziert aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen, wurden mit SB202190 (p38-MAPK-Inhibitor) für 90 Minuten vorinkubiert und im Anschluss mit rFlaA:Betv1 für zusätzliche 96 h stimuliert. Die Analyse der Zellaktivierung erfolgte hinsichtlich des Zellmetabolismus (Warburg-Effekt und Glucosemetabolismus) (B) sowie der Sekretion proinflammatorischer (IL-6, TNF-α, IL-1β) sowie antiinflammatorischer Zytokine (IL-10) (C). Die gezeigten Daten sind das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente mit jeweils technischen Duplikaten – statistische Signifikanz berechnet mit zweifaktorieller Varianzanalyse, dargestellt als: n.s. p-Wert > 0,5, * p-Wert < 0,5, ** p-Wert < 0,01, *** p-Wert < 0,001.

Abbildung 13



Die p42/44-MAP-Kinase hat einen gemischten Einfluss auf die rFlaA:Betv1-vermittelte Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine, während die Inhibition der p42/44-MAPK den Zellmetabolismus nicht signifikant beeinflusst. BMDMs, differenziert aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen, wurden mit U0126 (p42/44-MAPK-Inhibitor) für 90 Minuten vorinkubiert und im Anschluss mit rFlaA:Betv1 für zusätzliche 96 h stimuliert. Die Analyse der Zellaktivierung erfolgte hinsichtlich des Zellmetabolismus (Warburg-Effekt und Glucosemetabolismus) (B) sowie der Sekretion proinflammatorischer (IL-6, TNF- α , IL-1 β) sowie antiinflammatorischer Zytokine (IL-10) (C). Die gezeigten Daten sind das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente mit jeweils technischen Duplikaten – statistische Signifikanz berechnet mit zweifaktorieller Varianzanalyse, dargestellt als: n.s. p-Wert > 0,5, * p-Wert < 0,5, ** p-Wert < 0,01, *** p-Wert < 0,001.

4.7 Die Inhibition der Caspasen mit Z-VAD-FMK führt zu keiner signifikanten Veränderung des Zellmetabolismus oder der Zytokinsekretion bei Fusionsprotein-stimulierten BMDMs

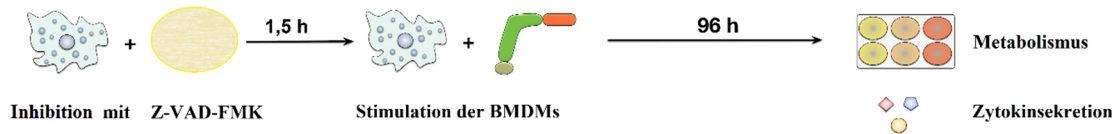
Z-VAD-FMK ist ein Pancaspase-Inhibitor (Lipinska et al., 2014). Für die Einleitung proinflammatorischer Prozesse wie beispielsweise die Sekretion stark proinflammatorischer Zytokine wie IL-1 β und IL-18 und die Pyroptose spielen Caspasen eine entscheidende Rolle (de Zoete et al., 2014, Van Opdenbosch and Lamkanfi, 2019).

C57BL/6-BMDMs wurden vor der Stimulation mit dem Fusionsprotein rFlaA:Betv1 für die Dauer von 90 Minuten Z-VAD-FMK zur Inhibition der Caspasen vorbehandelt. Die Analyse des Metabolismus sowie der Zytokinsekretion erfolgte wiederum nach 96 Stunden wie oben beschrieben.

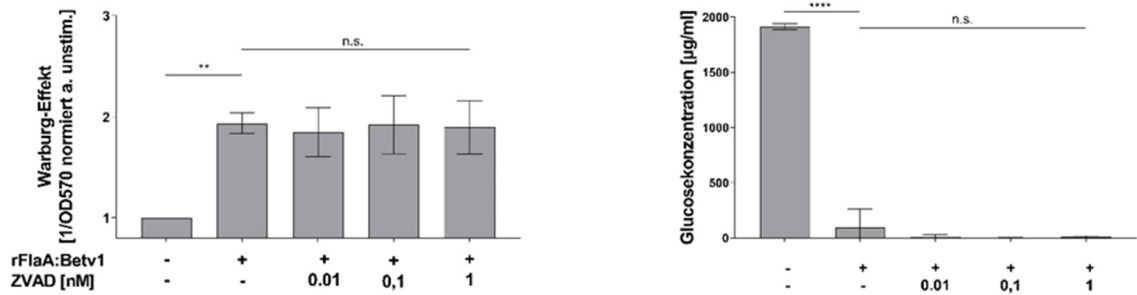
Bei der Betrachtung der C57BL/6-Mäuse konnte weder für die Aktivierung des Zellmetabolismus (Abbildung 14 B) (also für den Warburg-Effekt und den Glucosekonsum) noch für die Zytokinsekretion (Abbildung 14 C) eine Abhängigkeit von der Aktivität der Caspasen gezeigt werden.

Abbildung 14

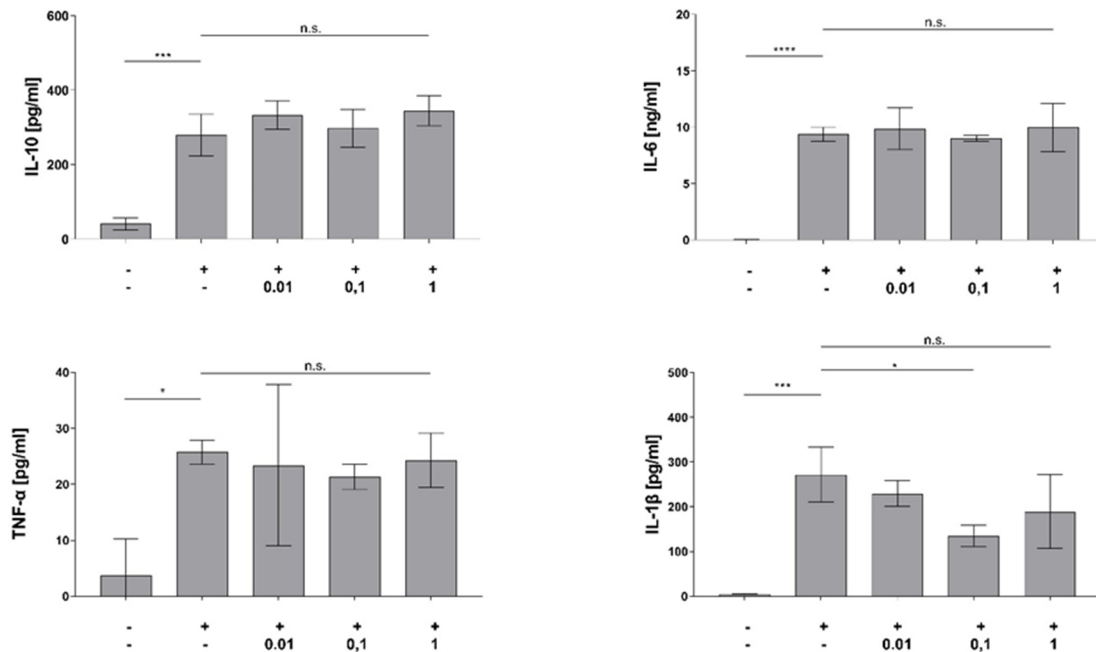
A



B



C



Die Caspase-Inhibition mittels Z-VAD-FMK führt zu keiner signifikanten Veränderung des Zellmetabolismus oder der Zytokinsekretion in Fusionsprotein-stimulierten BMDMs. BMDMs, differenziert aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen, wurden mit Z-VAD-FMK (Pancaspase-Inhibitor) für 90 Minuten vorinkubiert und im Anschluss mit rFlaA:Betv1 für zusätzliche 96 h stimuliert. Die Analyse der Zellaktivierung erfolgte hinsichtlich des Zellmetabolismus (Warburg-Effekt und Glucosemetabolismus) (B) sowie der Sekretion proinflammatorischer (IL-6, TNF- α , IL-1 β) sowie antiinflammatorischer Zytokine (IL-10) (C). Die gezeigten Daten sind das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente mit jeweils technischen Duplikaten – statistische Signifikanz berechnet mit zweifaktorieller Varianzanalyse, dargestellt als: n.s. p-Wert > 0,5, * p-Wert < 0,5, ** p-Wert < 0,01, *** p-Wert < 0,001.

4.8 rFlaA:Betv1 unterdrückt Bet v 1-spezifische Th2-Antworten in allergenspezifischen, ex-vivo-isolierten CD4⁺-T-Zellen

Zur Überprüfung des Einflusses der mit rFlaA:Betv1 stimulierten BMDMs auf Bet v 1-spezifische Th2-Antworten wurden BALB/c-BMDMs mit CD4⁺-T-Zellen aus Bet v 1-sensibilisierten Mäusen ko-kultiviert und auf die Modulation Bet v 1-induzierter Th1- und Th2-Antworten untersucht.

Die hierfür verwendeten CD4⁺-T-Zellen wurden über magnetische Zellseparierung aus den Milzen gegen rBet v 1 sensibilisierter BALB/c-Mäuse gewonnen und gemeinsam mit BALB/c-BMDMs mit einer der folgenden äquimolaren Stimulationsmixturen stimuliert (jeweils äquimolar zu 2 µg/ml bzw. 10 µg/ml bzw. 20 µg/ml rBet v 1):

- I) rBet v 1: Restimulation mit dem für die Sensibilisierung verwendeten Allergen zur Auslösung der allergenspezifischen Th1- und Th2-Antworten
- II) rFlaA:Betv1: Untersuchung der Effekte des Fusionsproteins auf allergenspezifische T-Zellen
- III) rBet v 1 + rFlaA + rBet v 1: Untersuchung der Effekte der Mixtur beider Einzelproteine auf Bet v 1-vermittelte Th1- und Th2-Antworten
- IV) rBet v 1 + rFlaA:Betv1: Untersuchung der Effekte des Fusionsproteins auf Bet v 1-vermittelte Th1- und Th2-Antworten (Abbildung 15).

Die Stimulation mit rFlaA:Betv1 sowie mit der Kombination aus rBet v 1 + rFlaA:Betv1 führte hierbei zu einem vergleichbar starken Warburg-Effekt in der niedrigsten (rFlaA:Betv1: 1,66 vs. rBet v 1 + rFlaA:Betv1: 1,63, normiert auf unstimulierte Kontrollen) und höchsten (rFlaA:Betv1: 1,74 und rBet v 1 + rFlaA:Betv1: 1,69, normiert auf unstimulierte Kontrollen) verwendeten Konzentration sowie einer vergleichbaren Steigerung des Glucosekonsums verglichen mit den unstimulierten Zellen bis in die höchste Konzentration (unstimuliert: 609 µg/ml, rFlaA:Betv1: 1886 µg/ml, Steigerung um 210 %, rBet v 1 + rFlaA:Betv1: 1934 µg/ml, Steigerung um 223 %) (Abbildung 15 B). Ebenfalls führte die Stimulation mit rBet v 1 + rFlaA + rBet v 1 zu einer gleichermaßen gerichteten Aktivierung des Zellstoffwechsels, allerdings erst in der jeweils nächsthöheren Konzentration (Abbildung 15 B). Bei der alleinigen Stimulation mit rBet v 1 blieb eine vergleichbare Aktivierung des Zuckermetabolismus aus (Abbildung 15 B).

Die Stimulation mit rFlaA:Betv1 bzw. rBet v 1 + rFlaA:Betv1 führte jeweils bereits in der niedrigsten Konzentration zu einer gegenüber den unstimulierten Zellen signifikanten Erhöhung der IFN γ (unstimuliert: 48 pg/ml, rFlaA:Betv1: 1089 pg/ml, Faktor 23 und rBet v 1 + rFlaA:Betv1: 1091 pg/ml, Faktor 23) sowie der IL-6-Sekretion (unstimuliert: 0,0045 ng/ml, rFlaA:Betv1: 10,8 ng/ml, Faktor 241 und rBet v 1 + rFlaA:Betv1: 12,5 ng/ml, Faktor 279),

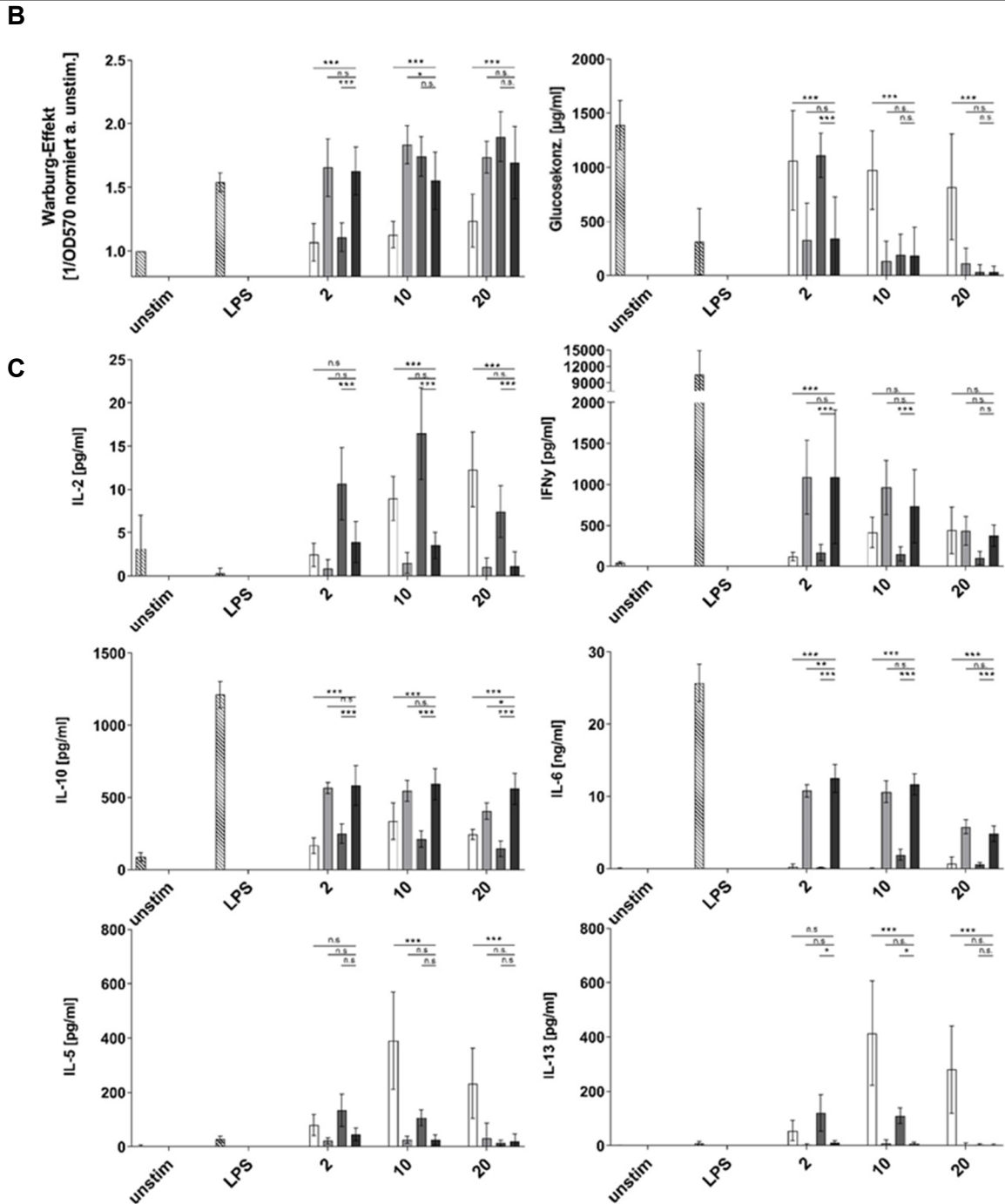
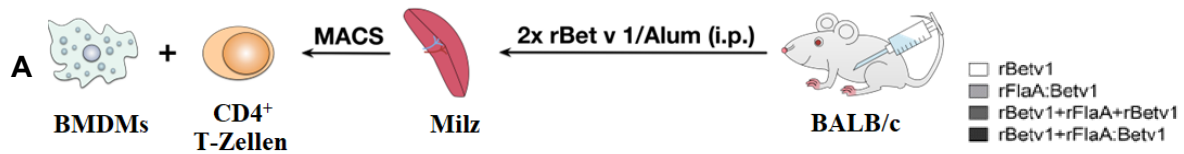
welche jeweils in der höchsten Stimulationskonzentration wieder abnahm (IFN γ : rFlaA:Betv1: 434 pg/ml, Faktor 9,2 und rBet v 1 + rFlaA:Betv1: 376 pg/ml, Faktor 8 sowie IL-6: rFlaA:Betv1: 5,78 ng/ml, Faktor 129 und rBet v 1 + rFlaA:Betv1: 4,81 ng/ml, Faktor 108) (Abbildung 15 C). Dieser Effekt blieb sowohl für die Stimulation mit rBet v 1 als auch mit der Mixtur rBet v 1 + rFlaA + rBet v 1 aus (Abbildung 15 C). Hiermit einher ging eine stark erhöhte IL-10-Sekretion (unstimuliert: 88,6 pg/ml vs. jeweils in der höchsten Konzentration: rBet v 1: 244 pg/ml vs. rFlaA:Betv1: 406 pg/ml vs. rBet v 1+ rFlaA + rBet v 1: 146 pg/ml vs. rBet v 1 + rFlaA:Betv1: 560 pg/ml), welche analog zu den Ergebnissen der alleinigen Stimulation der BMDMs (4.4, Abbildung 9 C, Abbildung 10 C) nur in Ko-Kulturen beobachtet wurde, die mit dem rFlaA:Betv1 oder rBet v 1 + rFlaA:Betv1 stimuliert wurden (Abbildung 15 C).

Die rBet v 1-induzierte Sekretion der Th2-Zytokine IL-5 und IL-13 konnte durch eine Kostimulation sowohl mit rFlaA:Betv1 als auch rFlaA + rBet v 1 inhibiert werden (IL-5-Sekretion in höchster Stimulationsdosis: rBet v 1: 233 pg/ml vs. rBet v 1 + rFlaA:Betv1: 19,1 pg/ml bzw. eine Reduktion um 91,8 % vs. rBet v 1 + rFlaA + rBet v 1: 14,3 pg/ml bzw. eine Reduktion um 93,9 %) (IL-13-Sekretion in höchster Stimulationsdosis: rBet v 1: 280 pg/ml vs. rBet v 1 + rFlaA:Betv1: 1,73 pg/ml bzw. eine Reduktion um 99,4 % vs. rBet v 1 + rFlaA + rBet v 1: 3,42 pg/ml bzw. eine Reduktion um 98,8 %). Erwähnenswert ist hier, dass in der mittleren Stimulationsdosis die Reduktion der Sekretion von IL-13 durch rFlaA:Betv1 signifikant stärker ausgeprägt war als durch die Mixtur rFlaA + rBet v 1 (rBet v 1: 414 pg/ml vs. rBet v 1 + rFlaA + rBet v 1: 110 pg/ml bzw. eine Reduktion um 73,5 % vs. rBet v 1 + rFlaA:Betv1: 7,1 pg/ml bzw. eine Reduktion um 98,3 %).

Die rBet v 1-induzierte IL-2-Sekretion konnte lediglich bei gleichzeitiger Stimulation mit dem Fusionsprotein inhibiert werden (IL-2-Sekretion in höchster Stimulationsdosis: rBet v 1: 12,3 pg/ml, rBet v 1 + rFlaA:Betv1: 1,16 pg/ml bzw. eine Reduktion um 90,5 %) (Abbildung 15 C).

Die Aktivierung des T-Zellmetabolismus der BMDMs durch rFlaA:Betv1 konnte in der Ko-Kultur also bestätigt werden. Gleichzeitig führte sowohl die Stimulation mit rFlaA:Betv1 als auch rFlaA + rBet v 1 zu einer reduzierten Sekretion der Th2-Zytokine IL-5 und IL-13. Wie oben beschreiben war dieser Effekt bei IL-13 bei gleichzeitiger Stimulation mit dem Fusionsprotein gegenüber der Mixtur dosisabhängig betont. Einhergehend mit der stärkeren Aktivierung des Zellmetabolismus durch rFlaA:Betv1 kam es durch das Fusionsprotein auch zu einer, verglichen mit der Mixtur, stärkeren Sekretion der proinflammatorischen Zytokine IFN γ und IL-6 sowie des antiinflammatorischen Zytokins IL-10.

Abbildung 15



In Ko-Kultur mit BMDMs unterdrückt rFlaA:Betv1 Th2-Antworten in Bet v 1-spezifisch sensibilisierten CD4⁺-T-Zellen ex vivo. CD4⁺-T-Zellen wurden aus rBet v 1 + Alum-sensibilisierten BALB/c-Mäusen entnommen und mit MACS isoliert. Diese Zellen wurden mit BALB/c-BMDMs in Ko-Kultur gebracht und mit äquimolaren Mengen der aufgeführten Proteine oder LPS für 96 h stimuliert (A). Die Überstände wurden hinsichtlich des Metabolismus analysiert (B). Zudem erfolgte die Messung der oben genannten Zytokine mittels ELISA (C). Die Daten sind das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente mit jeweils technischen Duplikaten – statistische Signifikanz berechnet mit zweifaktorieller Varianzanalyse, dargestellt als: n.s. p-Wert > 0,5, * p-Wert < 0,5, ** p-Wert < 0,01, *** p-Wert < 0,001.

5 Diskussion

5.1 Flagellin-Fusionsproteine

In dieser Arbeit wurde untersucht, welche Mechanismen der Aktivierung von BMDMs durch das Fusionsprotein rFlaA:Betv1 zugrunde liegen und welche immunmodulatorische Wirkung die beobachtete Zellaktivierung in einem Ex-vivo-Allergiemodell auf allergenspezifische, Th2-geprimte CD4⁺-T-Zellen entfaltet. Hierbei zeigte sich eine signifikante Aktivierung des Makrophagen-Metabolismus sowie eine damit einhergehende Sekretion pro- sowie antiinflammatorischer Zytokine (IL-10 bzw. IL-1 β , IL-6 und TNF- α).

Flagellin besitzt charakteristische immunaktivierende Eigenschaften; so kann Flagellin über die Bindung an den Mustererkennungsrezeptor des angeborenen Immunsystems TLR5 APZ aktivieren und somit als Adjuvans die Antwort von B- und T-Zellen gegen Allergene in vivo steigern (McSorley et al., 2002, Cuadros et al., 2004).

Frühe Ansätze Flagellin-basierter, molekularbiologischer Impfstoffe beinhalteten den Einbau von Antigen-abgeleiteten T-Zellepitopen in das Flagellin lebendiger Salmonellen (Stocker, 1990, Verma et al., 1995). Dabei konnte in einer Mausstudie gezeigt werden, dass eine wiederholte Verwendung von Flagellin als Carrier nicht zu einer Kompromittierung der entsprechenden (gegen Flagellin gerichteten) Immunantwort, etwa durch Anti-Flagellin-Antikörper, führte (Ben-Yedidia and Arnon, 1998). Eine solche Carrier-induzierte Immunsuppression kann bei Verwendung von Konjugatimpfstoffen auftreten, für Flagellin wurde sie nach meiner Recherche noch nicht gezeigt (Guerrero Manriquez and Tuero, 2021). Erhöhte Serum-Spiegel Flagellin-spezifischer Antikörper finden sich in der Bevölkerung interessanterweise bei entzündlichen Erkrankungen des Gastrointestinaltraktes mit Störung der Barrierefunktion (Wallis et al., 2013, Arno et al., 2021).

Diese frühen Ansätze Flagellin-basierter Impfstoffe besitzen jedoch die Nachteile, dass zum einen die entsprechenden Epitope, gegen die eine Immunantwort induziert werden soll, nur bei korrekter Faltung des Flagellins erfolgreich an der Oberfläche der Bakterien präsentiert werden können und zum anderen die Verwendung von Lebendimpfstoffen aufgrund potenzieller Risiken in bestimmten Patienten/Patientinnen bspw. bei einer Immunsuppression limitiert bleibt (Cuadros et al., 2004).

Cuadros et al. zeigten darauf erstmals mit einem Flagellin-EGFP-Fusionsprotein, dass rekombinant hergestellte Flagellin-Antigen-Fusionsproteine technisch realisierbar und zumindest in der Maus ohne größere Nebenwirkungen anwendbar sind (Cuadros et al., 2004). Seither konnte in mehreren Arbeiten der potenzielle Nutzen von Flagellin als Fusionspartner und Adjuvans in molekulargenetisch hergestellten Vakzinen unterstrichen werden, so

beispielsweise für die potenzielle Immunisierung gegen das West-Nil-Virus (McDonald et al., 2007), Influenza (Taylor et al., 2011), Pseudomonas (Weimer et al., 2009) und nicht zuletzt in allergischen Erkrankungen (Schulke et al., 2010, Schulke et al., 2018, Kitzmüller et al., 2018). Alle diese Konstrukte zeigten hierbei eine effiziente Induktion protektiver Immunantworten gegen die fusionierten Antigene. Interessanterweise konnte hierbei für simple Mischungen aus Flagellin und Antigen keine vergleichbar starke Immunaktivierung nachgewiesen werden (Schulke et al., 2018).

Die Trunkierung von Flagellin aus *Salmonella Typhimurium* mittels Deletion der hypervariablen Region, welche das Hauptantikörperepitop des Proteins darstellt, minimiert die potenzielle Neutralisierung der Flagellinmoleküle durch Flagellin-spezifische Antikörper (McDonald et al., 2007, Nempont et al., 2008). In einer Arbeit von Kitzmüller zeigte NtCFlg, ein trunkiertes *Salmonella-Typhimurium*-Flagellin, fusioniert mit dem Haupt-Birkenpollenallergen Bet v 1 eine gegenüber Bet v 1 verringerte Affinität zu IgE-Antikörpern allergischer Patienten/Patientinnen auf und führte in Mäusen zur Bildung Bet v 1-spezifischer, potenziell neutralisierender IgG1- und IgG2a-Antikörper (Kitzmüller et al., 2018). In Experimenten von Schulke et al. zeigte sich darüber hinaus, dass auch das in dieser Arbeit verwendete Fusionsprotein rFlaA:Betv1, fusioniert aus dem Flagellin A von *Listeria monocytogenes* und Bet v 1, zusätzlich die Fähigkeit besaß, in einem Ko-Kultur-Experiment mit murinen mDC und Th2-geprimeten Bet v 1-spezifischen CD4⁺-T-Zellen die Sekretion von Th1- und Th2-Zytokinen zu unterdrücken (Schulke et al., 2018). Diese suppressive Wirkung des Fusionsproteins war vor allem auf die Sekretion von IL-10 durch die aktivierten mDC zurückgeführt worden (Schulke et al., 2018). Interessanterweise war der Mechanismus der starken Aktivierung, also der Aktivierung des Metabolismus mit damit einhergehendem sekretierten Zytokinprofil, unabhängig von der Aktivierung des TLR5 (Schulke et al., 2018). Stattdessen wurde spekuliert, dass die starke Aggregation des Fusionsproteins hierfür eine besondere Bedeutung hatte. Diese Aggregation beeinflusst die Aufnahme und konsekutiv die Verarbeitung des Fusionsproteins durch antigenpräsentierende Zellen (Schulke et al., 2018). Die aus Aufnahme und Prozessierung resultierende MyD88-abhängige mTOR-Aktivierung führt schließlich zur Sekretion von IL-10, um die starke proinflammatorische Aktivierung der Zelle zu limitieren (Schulke et al., 2018).

5.2 Die Aktivierung des Glucosemetabolismus der BMDMs durch rFlaA:Betv1 wird begleitet von der Ausschüttung sowohl pro- als auch antiinflammatorischer Zytokine

Bereits in Experimenten mit murinen mDC konnte eine gleichzeitige Aktivierung des Zuckermetabolismus und der Zytokinsekretion nach Stimulation der Zellen mit rFlaA:Betv1 gezeigt werden (Schulke et al., 2018).

Makrophagen können sowohl pro- als auch antiinflammatorische Funktionen übernehmen. In Mäusen wurde bereits gezeigt, dass sie über die Ausschüttung von IL-10 allergisch inflammatorische Prozesse in der Lunge verringern können (Draijer and Peters-Golden, 2017).

Als Folge der Stimulation durch das Fusionsprotein zeigte sich in dieser Arbeit auch in den BMDMs eine starke Aktivierung des Glucosestoffwechsels. Die Mischung der beiden Einzelproteine rBet v 1 + rFlaA konnte dabei eine vergleichbare, aber schwächer ausgeprägte Aktivierung des Glucosemetabolismus auslösen. Der erhöhte Glucosekonsum sowie der Warburg-Effekt sind hierbei Zeichen einer Verstärkung der anaeroben Glykolyse, wie sie von Otto Warburg erstmalig in Krebszellen festgestellt wurde (Warburg, 1956). Bei Makrophagen sind sie Anzeichen einer Differenzierung der Zellen in Richtung M1-Makrophagen (Shapouri-Moghaddam et al., 2018). Das Paradigma der M1- und M2-Makrophagen ist ein nützliches, wenn auch nicht vollständiges, Modell für die Einordnung von Makrophagen in pro- und antiinflammatorische Ausrichtung (Shapouri-Moghaddam et al., 2018, Martinez and Gordon, 2014, Viola et al., 2019). Die Differenzierung in Richtung M1-Makrophagen kann, neben der Aktivierung durch proinflammatorische Zytokine, wie IFN γ bzw. TNF- α , typischerweise das Ergebnis einer Stimulation mit LPS sein, jedoch spielen ebenfalls TLRs eine wichtige Rolle (Viola et al., 2019, Martinez and Gordon, 2014). Eine M1-Ausrichtung der Makrophagen geht dabei mit einer Sekretion proinflammatorischer Zytokine, wie TNF- α , IL-1 β , IL-6 und einer charakteristischen metabolischen Reprogrammierung in Richtung einer verstärkten Glykolyse einher (Viola et al., 2019). In dieser Studie war die Aktivierung des Glucosemetabolismus durch das Fusionsprotein auf einem vergleichbaren Niveau wie die Aktivierung durch das stark proinflammatorisch wirksame LPS. Bei den proinflammatorischen Zytokinen IL-1 β , IL-6 und TNF- α zeigte sich eine starke Sekretion als Folge der Stimulation durch das Fusionsprotein, die durch die Stimulation mit LPS jedoch noch übertroffen wurde. Interessanterweise verursachten sowohl die Stimulation mit LPS als auch mit dem Fusionsprotein eine starke Ausschüttung von IL-10. Eine überschießende proinflammatorische Reaktion zu zügeln, ist eine bekannte Aufgabe der Makrophagen (Iyer et al., 2010). Zudem ist erwähnenswert, dass durch LPS stimulierte M1-Makrophagen typischerweise IL-10 in, verglichen mit M2-Makrophagen, niedrigerer Dosis sezernieren (Martinez and Gordon, 2014). Dies wiederum kann M2-Makrophagen zu verstärkter Sekretion von IL-10 anregen (Martinez and Gordon,

2014). Wenn also eine sich auf diese Weise perpetuierende Sekretion von IL-10 in der Zellkultur bei der Stimulation mit LPS denkbar ist, so auch für die Stimulation mit rFlaA:Betv1. Spannend ist hier auch, dass Flagellin allein zwar ebenfalls eine starke Sekretion proinflammatorischer Zytokine sowie eine starke metabolische Aktivierung auslöste, eine vergleichbare Ausschüttung von IL-10 jedoch ausblieb. Eventuell reicht hier die intrinsische proinflammatorische Kapazität von Flagellin als TLR5-Agonist und die Flagellin-vermittelte proinflammatorische Aktivierung der Makrophagen nicht aus, um eine entsprechende Gegensteuerung über IL-10 zu bewirken. Zumal sich, wie oben erwähnt, das Fusionsprotein in der Bildung hochmolekularer Aggregate stark von Flagellin unterscheidet.

5.3 Die Aktivierung des Metabolismus der BMDMs ist mTOR-abhängig, die Sekretion pro- und antiinflammatorischer Zytokine ist nach 96 Stunden nicht stark mTOR-abhängig

Rapamycin ist ein spezifischer Inhibitor des *Mammalian Target of Rapamycin* (mTOR), einer hochkonservierten Serin/Threonin-Kinase, welche die katalytische Untereinheit zweier Proteinkomplexe, mTORC1 und mTORC2, ist (Saxton and Sabatini, 2017). Wie bereits in der Einleitung aufgezeigt, kommt mTORC1 eine entscheidende Rolle bei der Regulierung der Polarisation von Makrophagen in den M1- bzw. M2-Typ zu (Byles et al., 2013).

In Vorarbeiten zu dieser Doktorarbeit mit murinen mDC wurde festgestellt, dass die durch rFlaA:Betv1 verursachte Steigerung des Glucosemetabolismus, gemessen in Form des Warburg-Effektes und der Glucoseverstoffwechslung, sowie die IL-10-Sekretion sich jeweils durch eine Rapamycin-vermittelte mTORC1-Inhibition unterdrücken lassen (Schulke et al., 2018, Moeller et al., 2019). In dieser Arbeit konnte die Aktivierung des BMDM-Metabolismus ebenfalls durch Rapamycin inhibiert werden. Die rFlaA:Betv1-induzierte IL-10-Ausschüttung aus BMDMs wurde durch Vorinkubation der Zellen mit Rapamycin dosisabhängig, jedoch nicht signifikant, reduziert, zumindest nicht für C57BL/6-Mäuse. Dies kann darauf hindeuten, dass die Aktivierung der Makrophagen durch das Fusionsprotein im Gegensatz zu den mDC nicht stark genug ist, um über eine überschießende Aktivierung des mTORC1 eine entsprechende Gegenregulation über IL-10 hervorzurufen. Die erhaltenen Ergebnisse deuten darauf hin, dass in Makrophagen ein alternativer, zelltypspezifischer Mechanismus der IL-10-Sekretion zugrunde liegt. Die Inhibition der MAP-Kinasen jedenfalls konnte eine IL-10-Sekretion signifikant unterbinden (Abschnitt 5.4 s. u.), was eine Beteiligung des hochkonservierten MAPK-Signalwegs an der beobachteten IL-10-Sekretion nahelegt.

In Übereinstimmung mit der Aktivierung von mDC konnte auch in dieser Arbeit keine starke Bedeutung des mTORC1-Komplexes für die Sekretion von proinflammatorischen Zytokinen (IL-1 β , IL-6 und TNF- α) als Reaktion auf die Stimulation mit dem Fusionsprotein nachgewiesen werden (Moeller et al., 2019).

5.4 Die MAP-Kinase-Inhibitoren SB202190 und U0126 haben keinen Effekt auf die rFlaA:Betv1-induzierte Aktivierung des Zellmetabolismus, inhibieren jedoch die Ausschüttung von IL-10 und verstärken die Sekretion von IL-6

Die durchgeführten Inhibitorexperimente zeigen, dass die MAP-Kinasen p42/44 und p38 bei der, durch das Fusionsprotein getriggerten, Aktivierung des Glucosemetabolismus keine signifikante Rolle spielen. Eindeutig nachgewiesen werden konnte jedoch ihre Notwendigkeit für die Ausschüttung des antiinflammatorischen Zytokins IL-10. Dieses Ergebnis ist in Übereinstimmung mit dem bereits beschriebenen Mechanismus der IL-10-Sekretion in mDC (Moeller et al., 2019).

Bei der rFlaA:Betv1-induzierten Sekretion von IL-6 führte die prä-stimulatorische Inhibition der BMDMs mit sowohl SB202190 als auch U0126 zu einer signifikanten Steigerung der Sekretion von IL-6. Mögliche Ursache ist hierfür eine durch die p42/44- und p38-MAPK-Inhibition bereits reduzierte Sekretion von IL-10 (siehe oben), sodass hier ein potenzieller negativer, IL-10-vermittelter Rückkopplungsmechanismus entfällt.

Bei der Stimulation der mDC durch Moeller et al. waren ebenfalls Inhibitionsversuche mit SP600125, einem Anthrapyrazolon und Inhibitor der stress aktivierten Proteinkinase/c-Jun N-terminalen Kinase (SAP/JNK) (Bennett et al., 2001) durchgeführt worden: Hier zeigte sich bei der Untersuchung von mDC über die Inhibition der Zytokinsekretion hinaus auch eine Inhibition des Warburg-Effekts und des Glucosemetabolismus (Moeller et al., 2019). Der gleiche Effekt konnte unmittelbar im Anschluss an die hier präsentierte Arbeit durch weiterführende Experimente von Y.-J. Lin in BMDMs festgestellt werden (Lin et al., 2021). Interessanterweise ist SAP/JNK auch für die LPS-vermittelte Aktivierung von Makrophagen (Zytokinsekretion) von Bedeutung (Procyk et al., 2000). Ebenso gilt dies für die Aktivierung der mDC durch MPLA (Zimmermann et al., 2022), wo eine Inhibition durch SP600125 analog zu der Inhibition der Makrophagen bei der Stimulation mit rFlaA:Betv1 (Lin et al., 2021) neben der Reduktion des Metabolismus (Glucosekonsum und Warburg-Effekt) ebenfalls zu einer Verringerung der Sekretion von TNF- α und IL-10 führte. Der MAPK-Signalweg kann den mTOR-Signalweg über verschiedene Mechanismen aktivieren, unter anderem über (I) eine Phosphorylierung von

TSC1/2, welche zur Aufhebung der TSC1/2-vermittelten mTOR-Inhibition führt (Shorning et al., 2020, Roux et al., 2004), (II) über eine Aktivierung von PI3K (Shorning et al., 2020, Roux et al., 2004) und (III) über die Phosphorylierung von RPTOR (Shorning et al., 2020, Carriere et al., 2011). Dass das Fusionsprotein den MAPK-Signalweg stark aktiviert, hat Y.-J. Lin im Anschluss an meine Arbeit in einer gemeinsamen Publikation nachweisen können (Lin et al., 2021). Eine Inhibition dieses MAPK-Signalweges durch eine Inhibition einzelner MAP-Kinasen kann eine verringerte Phosphorylierung des TSC1/2-Komplexes zur Folge haben, die wiederum zu einer verstärkten Inhibition von mTORC1 führt. Damit vereinbar wären die beobachtete Inhibition der IL-10-Sekretion durch Vorbehandlung der BMDMs mit entweder U0126, SB202190 oder Rapamycin (in mDC), die letztlich vor allem auf die Aktivierung von mTORC1 zurückzuführen ist.

5.5 Eine Inhibition des Inflammasoms hat keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung der BMDMs durch das Fusionsprotein

Z-VAD-FMK ist ein Pancaspase-Inhibitor, der in der Lage ist, verschiedene Caspasen, darunter Caspase 1, zu inhibieren (Lipinska et al., 2014, Li et al., 2019). Die Aktivierung von Caspasen wird durch Inflammasom-Komplexe reguliert. Wie in der Einleitung dargestellt, spielen Inflammasome als Regulatoren von Zellantworten auf bestimmte Stressstimuli eine entscheidende Rolle. Sie bewirken über die Aktivierung von Caspasen die Sekretion von stark proinflammatorischen Zytokinen bis hin zur Pyroptose (Man and Kanneganti, 2015, de Zoete et al., 2014).

Insbesondere die Sekretion der reifen Form von IL-1 β wird durch Caspase 1 ausgelöst (Lipinska et al., 2014). Die Blockade von Caspase 1 als Schlüsselenzym für diesen letzten Schritt der IL-1 β -Reifung (Sollberger et al., 2014) zeigte in dieser Arbeit keinen Einfluss auf die rFlaA:Betv1-vermittelte Aktivierung des Glucosemetabolismus oder des Warburg-Effekts.

Die rFlaA:Betv1-vermittelte Aktivierung der BMDMs ließ sich nur insofern unterbinden, dass die IL-1 β -Sekretion nach Inhibition durch Z-VAD-FMK in der zweithöchsten Dosierung in C57BL/6-BMDMs signifikant verringert wurde. In der höchsten Dosierung war der Effekt jedoch nicht mehr signifikant. Eine Inhibition von IL-10, IL-6, TNF- α blieb hierbei aus. Dagegen stellten Schülke et al. eine Beteiligung der Inflammasom-Aktivierung für die durch das Fusionsprotein rFlaA-Ova-induzierte IL-6-Sekretion aus murinen mDC fest (Schülke et al., 2014). Die Caspase-1-abhängige IL-1 β -Sekretion aus rFlaA:Betv1-stimulierten BMDMs ist der Aktivierung über andere Signalkaskaden somit sehr wahrscheinlich nachgeschaltet. Interessanterweise geht die zweistufige Aktivierung des NLRP3-Inflammasoms im ersten Schritt mit der Aktivierung von MyD88 über den entsprechenden TLR einher. Notwendig hierfür

ist die Aktivierung von NF- κ B (Bauernfeind et al., 2009). Zusammengenommen deuten die erhaltenen Ergebnisse auf eine MAP-Kinase-abhängige Aktivierung des Inflammasoms durch das Fusionsprotein hin – insbesondere vor dem Hintergrund, dass die Inhibition der p38-MAP-Kinase durch U0126 zur Inhibition der Sekretion von IL-1 β führte (Abbildung 13)

5.6 Das Fusionsprotein unterdrückt Bet v 1-spezifische Th2-Antworten in vitro

CD4⁺-Th-Zellen gehören zur Gruppe der T-Lymphozyten und sind von zentraler Bedeutung für das adaptive Immunsystem. Sie lassen sich weiter in verschiedene Subtypen unterteilen. Darunter fällt insbesondere die Unterscheidung von Th1- und Th2-Subtypen (Del Prete, 1992, Wambre et al., 2012, Kumar et al., 2018). Während CD4⁺-Th1-Zellen vor allem für die Bekämpfung bakterieller Infektionen von Bedeutung sind, wird CD4⁺-Th2-Zellen eine zentrale Bedeutung bei der Bekämpfung von Parasiten und der Entstehung von Allergien zugeschrieben. IL-2 ist ein essenzieller Faktor für die Aktivierung und das Überleben von Th2-Zellen, deren wichtigste Effektor-Zytokine wiederum IL-4, IL-5 und IL-13 sind (Del Prete, 1992, Luckheeram et al., 2012, Punnonen et al., 1997). IL-4 und IL-13 sind dabei zentrale Zytokine für den Isotypwechsel von IgG- zu IgE-Antikörpern (Punnonen et al., 1997). IFN γ und IL-12 hingegen sind wichtige Zytokine in der Differenzierung von Th1-Zellen, wobei IFN γ gleichzeitig auch das wichtigste Effektor-Zytokin der Th1-Zellen ist (Luckheeram et al., 2012).

Schülke et al. konnten zeigen, dass murine mDC in einer Ko-Kultur mit Th2-geprägten Bet v 1-spezifischen CD4⁺-Zellen die Th2-typische Sekretion von IL-5 und IL-13 infolge einer Stimulation dieser Ko-Kulturen mit dem Allergen unterdrückten, wenn rBet v 1 mit dem Fusionsprotein aus rFlaA:Betv1 zusammen ko-appliziert wurde (Schulke et al., 2018).

In dieser Arbeit konnte nun gezeigt werden, dass BMDMs bei Stimulation mit dem Fusionsprotein in der Ko-Kultur einen vergleichbaren Einfluss auf die allergenspezifische Zytokinantwort der CD4⁺-Th-Zellen ausüben.

Im Einzelnen zeigte sich eine erhöhte metabolische Rate und eine Aktivierung des Warburg-Effekts in der Ko-Kultur als Ergebnis der Stimulation mit dem Fusionsprotein – in höheren Dosen darüber hinaus ebenfalls mit rFlaA, nicht aber durch Stimulation mit dem Allergen allein (Abbildung 15). Da die Stimulation der sensibilisierten CD4⁺-Zellen mit ihrem spezifischen Allergen also in der Ko-Kultur zu einer signifikant schwächeren Aktivierung des Gesamtmetabolismus (gemessen über den Warburg-Effekt und den Glucoseverbrauch in den Ko-Kulturen) geführt hatte als die Stimulation der Ko-Kultur mit dem Fusionsprotein, ist es wahrscheinlich, dass die beobachtete Veränderung des Metabolismus Richtung Warburg-

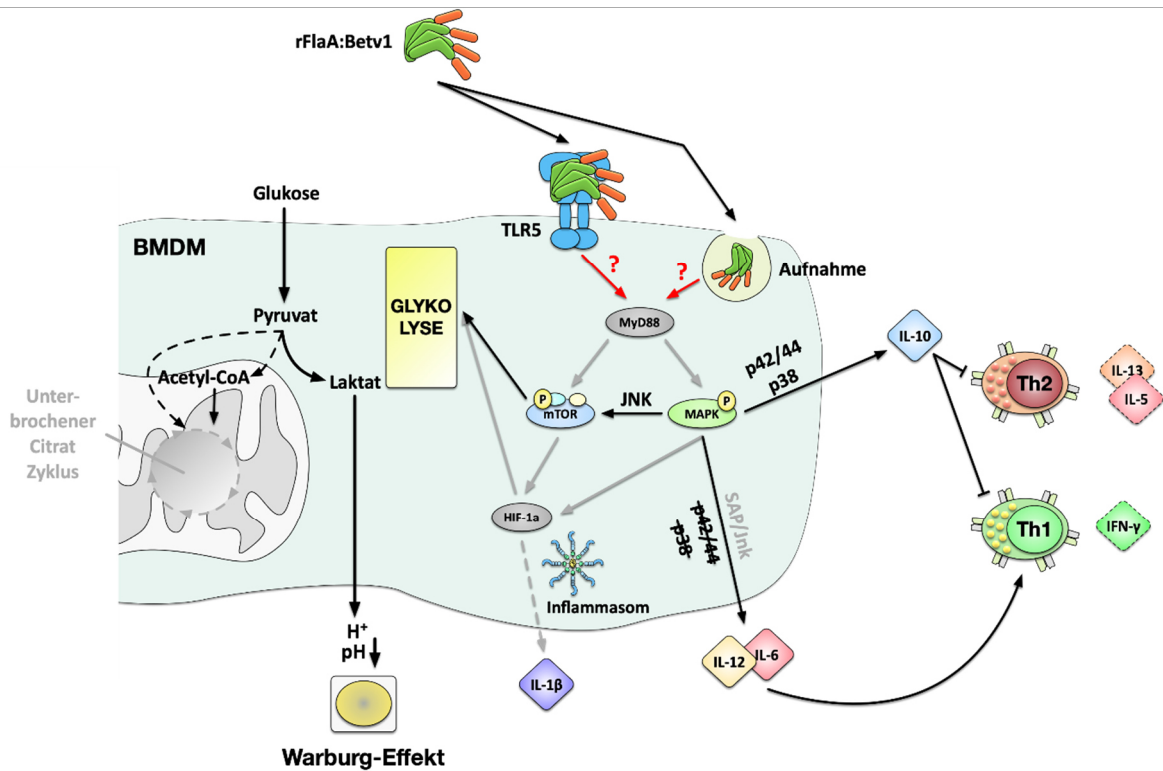
Metabolismus in den Ko-Kulturen auf die Fusionsprotein-vermittelte Aktivierung der Makrophagen zurückzuführen sein muss. Als weiterer Marker für die Aktivierung der BMDMs lässt sich IL-6 hinzuziehen. Auch dieses zeigte ein ähnliches Sekretionsmuster wie in den Experimenten mit den isolierten BMDMs, also eine durch das Fusionsprotein signifikant stärker ausgelöste IL-6-Sekretion (verglichen mit der äquimolaren Menge beider Proteine entweder einzeln oder als Mischung) (Abbildung 9).

Die Sekretion von IL-10 zeigte auch bei Stimulation nur mit rBet v 1 eine deutliche Steigerung gegenüber der unstimulierten Kontrolle. Durch die Sensibilisierung der Mäuse mit Bet v 1 und Aluminiumhydroxid wird letztlich ein breites Spektrum an allergenspezifischen CD4⁺-T-Zellen induziert, welches neben Th1-, Th2- und Th17-Zellen ebenfalls allergenspezifische Tregs (regulatorische T-Zellen) umfasst (Luckheeram et al., 2012). Bei Präsentation des Allergens durch die BMDMs in der Ko-Kultur und entsprechend starker Aktivierung der T-Zellen wird IL-10 durch die verschiedenen CD4⁺-Th-Zellsubtypen in unterschiedlichen Mengen sezerniert (Wambre et al., 2012). Bemerkenswert war hierbei allerdings die signifikant stärkere Sekretion von IL-10 in den Ko-Kulturen als Reaktion auf eine Stimulation mit dem Fusionsprotein. Diese signifikant stärkere Sekretion lässt sich eindeutig auf die Kostimulation mit dem Fusionsprotein zurückführen (Abbildung 15) und geht somit sehr wahrscheinlich auf die Aktivierung der Makrophagen zurück. Bei Betrachtung der T-Zell-Zytokine lässt sich eine deutliche Tendenz hin zur Verschiebung der allergenspezifischen Th2- zu Th1-Zytokinantworten erkennen; sowohl durch die Kostimulation mit rFlaA:Betv1 als auch mit rFlaA ließ sich eine Reduktion der IL-5- und IL-13- sowie eine Steigerung der IFN γ -Sekretion nachweisen (Abbildung 15). Die Sekretion von IL-13 und IFN γ war bei Kostimulation mit dem Fusionsprotein signifikant stärker reduziert bzw. gesteigert bei Vergleich mit der Mischung beider Einzelkomponenten. Diese Fähigkeit zur Modulation der allergenspezifischen CD4⁺-Th-Antwort ist besonders entscheidend in der alleinigen bei Kostimulation mit rFlaA:Betv1 signifikant reduzierten IL-2-Sekretion. Die Kostimulation mit der Mischung hatte im untersuchten experimentellen Setup sogar eine weitere Verstärkung der Bet v 1-induzierten IL-2-Sekretion zur Folge (Abbildung 15).

Zusammenfassend ist in Abbildung 15 der Mechanismus der rFlaA:Betv1-induzierten Makrophagen-Aktivierung, mit der daraus in der Ko-Kultur resultierenden Verschiebung der allergenspezifischen CD4⁺-Th-Antwort, dargestellt. In der Darstellung sind zusätzlich die erst im Anschluss an meine Arbeit erhaltenen (und mit mir zusammen publizierten) Ergebnisse von Yen-Ju Lin eingeschlossen (Lin et al., 2021). HIF-1-alpha („*hypoxia-inducible factor 1-alpha*“) dessen Aktivierung in rFlaA:Betv1-stimulierten BMDMs im Rahmen der Doktorarbeit von Yen-Ju Lin mittels RNA-Sequenzierung und Western Blot nachgewiesen werden konnte (Lin et al., 2021), ist ein Treiber der Polarisation von Makrophagen in den M1-Phänotyp, welche wiederum Th1-Antworten begünstigen (Wang et al., 2017). Darüber hinaus war eine MyD88-abhängige Aktivierung von mTOR nachgewiesen sowie die bedeutende Rolle der SAP/JNK-

MAP-Kinase in der rFlaA:Betv1-vermittelten Aktivierung der BMDMs herausgestellt worden (Lin et al., 2021).

Abbildung 16



Veranschaulichung der Mechanismen, welche der Aktivierung der BMDMs durch rFlaA:Betv1 gemäß den Erkenntnissen dieser Arbeit sowie ergänzend der Doktorarbeit von Yen-Ju Lin (in grau) zugrunde liegen. rFlaA:Betv1 wird TLR5-abhängig sowie -unabhängig aufgenommen. MyD88-abhängig erfolgt dann die Aktivierung der MAP-Kinasen (welche die pro- und antiinflammatorische Zytokinsekretion vermitteln) sowie die Aktivierung von mTOR (welches die Verschiebung des BMDM-Stoffwechsels Richtung Warburg-Metabolismus verursacht). Für die in den Ko-Kultur-Experimenten beobachtete Unterdrückung der Th2-Zytokinsekretion entscheidend ist die MAPK-abhängige IL-10-Sekretion nach Stimulation mit rFlaA:Betv1.

6 Fazit

Die Entwicklung effektiver, allergenspezifischer Immuntherapien wird auf absehbare Zeit eine große Herausforderung der modernen Medizin darstellen. Dies insbesondere vor dem Hintergrund der Zunahme allergischer Erkrankungen bei den gleichzeitig bestehenden klinischen Herausforderungen, darunter insbesondere der, für bestimmte Allergene, Langwierigkeit, der Ineffizienz und nicht zuletzt der Risiken bisher verfügbarer Therapien (Moote et al., 2018, Wiedermann et al., 1999, van der Valk et al., 2015, Akdis et al., 2006).

Die immunmodulatorischen Effekte von Flagellin-enthaltenden Fusionsproteinen konnten bereits wiederholt in Publikationen nachgewiesen werden (McDonald et al., 2007, Taylor et al., 2011, Turley et al., 2011, Weimer et al., 2009). Dass diese antigenspezifische, immunmodulatorische Kapazität ein entsprechend hohes Potential für die Nutzung als potenzielle Allergentherapeutika für die allergenspezifische Immuntherapie hat, konnte bereits in mehreren Publikationen gezeigt werden (Schulke et al., 2018, Schulke et al., 2010, Kitzmüller et al., 2018). Im speziellen waren darüber hinaus die Aktivierung von mDC und die von diesen antigenpräsentierenden Zellen eingeleiteten Immunantworten (Moeller et al., 2019) untersucht worden.

In dieser Arbeit wurde mit der Analyse dieser Prozesse in murinen BMDMs der nächste Schritt zur weiterführenden Analyse dieser vielversprechenden Vakzinkandidaten getan. Es konnte gezeigt werden, dass rFlaA:Betv1 den Glucosemetabolismus, die Ausschüttung pro- (IL-1 β , IL-6 und TNF- α) sowie antiinflammatorischer (IL-10) Zytokine signifikant stärker induziert als die äquimolare Mischung der beiden Proteine. Dies belegt weiter die deutlich stärkere Immunogenität des Fusionsproteins, stimmt mit den für die mDC erhaltenen Ergebnissen überein (Moeller et al., 2019) und verstärkt unser Verständnis der Immunaktivierung durch Flagellin-enthaltende Fusionsproteine sowie den zugrundeliegenden zellulären Mechanismen.

Für die Aktivierung des Glucosemetabolismus der Makrophagen durch rFlaA:Betv1 konnte in dieser Arbeit, in Übereinstimmung mit den Ergebnissen für mDC, eine Abhängigkeit von mTORC1 durch Inhibition mit Rapamycin nachgewiesen werden. Jedoch erwies sich die Sekretion von IL-10 in murinen, durch rFlaA:Betv1 aktivierten, BMDMs im Unterschied zu mDC als nicht Rapamycin-abhängig (Moeller et al., 2019). Als entsprechend wichtiger stellte sich die Aktivierung der p42/44- und p38-MAPK für die Sekretion von IL-10 heraus. Eine zentrale Rolle des Inflammasoms für die Aktivierung der BMDMs ließ sich in den Experimenten weder für den gesteigerten Glucosemetabolismus noch für die Sekretion pro- bzw. antiinflammatorischer Zytokine bestätigen.

Schließlich konnten in Ex-vivo-Ko-Kultur-Experimenten der untersuchten BMDMs mit allergenspezifischen CD4⁺-Th-Zellen die immunmodulatorischen Eigenschaften mit

Verschiebung der allergenspezifischen Th2- hin zu einer Th1-Zytokinantwort weiter untersucht werden.

Abschließend belegen die vorliegenden Erkenntnisse ein eindeutiges Entwicklungspotenzial der untersuchten Flagellin-Allergen-Fusionsproteine in der allergenspezifischen Immuntherapie. Die in dieser Arbeit weiter entschlüsselten immunmodulierenden Eigenschaften von (rFlaA-enthaltenden) Fusionsproteinen sind dabei eine wichtige Voraussetzung für die effiziente und sichere Anwendung solcher Therapeutika.

IV Literaturverzeichnis

ABBAS, M., MOUSSA, M. & AKEL, H. 2021. Type I Hypersensitivity Reaction. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing

Copyright © 2021, StatPearls Publishing LLC.

AKDIS, C. A., BLASER, K. & AKDIS, M. 2006. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Chem Immunol Allergy*, 91, 195-203.

AKDIS, M. & AKDIS, C. A. 2014. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy: multiple suppressor factors at work in immune tolerance to allergens. *J Allergy Clin Immunol*, 133, 621-31.

ARNO, R. B., SERGIO, A.-S., THOMAS, V., SHIXIAN, H., ARNAU VICH, V., RANKO, G., SIGAL, L., ALEXANDER, K., SHELLEY, K., IRIS, N. K., HENDRIK, M. V. D., ADINA, W., MARIJN, C. V., ELEONORA, A. M. F., KLAAS NICO, F., CISCA, W., GERARD, D., ERAN, S., JINGYUAN, F., ALEXANDRA, Z. & RINSE, K. W. 2021. In-depth characterization of the serum antibody epitope repertoire in inflammatory bowel disease using phage-displayed immunoprecipitation sequencing. *bioRxiv*, 2021.12.07.471581.

BACHMANN, M. F., MOHSEN, M. O., KRAMER, M. F. & HEATH, M. D. 2020. Vaccination against Allergy: A Paradigm Shift? *Trends in Molecular Medicine*, 26, 357-368.

BATES, J. T., UEMATSU, S., AKIRA, S. & MIZEL, S. B. 2009. Direct stimulation of tlr5+/+ CD11c+ cells is necessary for the adjuvant activity of flagellin. *J Immunol*, 182, 7539-47.

BAUER, L., BOHLE, B., JAHN-SCHMID, B., WIEDERMANN, U., DASER, A., RENZ, H., KRAFT, D. & EBNER, C. 1997. Modulation of the allergic immune response in BALB/c mice by subcutaneous injection of high doses of the dominant T cell epitope from the major birch pollen allergen Bet v 1. *Clin Exp Immunol*, 107, 536-41.

BAUERNFEIND, F. G., HORVATH, G., STUTZ, A., ALNEMRI, E. S., MACDONALD, K., SPEERT, D., FERNANDES-ALNEMRI, T., WU, J., MONKS, B. G., FITZGERALD, K. A., HORNUNG, V. & LATZ, E. 2009. Cutting edge: NF-kappaB activating pattern recognition and cytokine receptors license NLRP3 inflammasome activation by regulating NLRP3 expression. *J Immunol*, 183, 787-91.

BEN-YEDIDIA, T. & ARNON, R. 1998. Effect of pre-existing carrier immunity on the efficacy of synthetic influenza vaccine. *Immunol Lett*, 64, 9-15.

BENNETT, B. L., SASAKI, D. T., MURRAY, B. W., O'LEARY, E. C., SAKATA, S. T., XU, W., LEISTEN, J. C., MOTIWALA, A., PIERCE, S., SATOH, Y., BHAGWAT, S. S., MANNING, A. M. & ANDERSON, D. W. 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13681-6.

BERGMAYER, H. U. A. B., E (1974). *Methods of Enzymatic Analysis*, H.U. Bergmeyer, Ed., New York, Academic Press, 2nd Edition.

BIEBER, T. 2020. Interleukin-13: Targeting an underestimated cytokine in atopic dermatitis. *Allergy*, 75, 54-62.

BIEDERMANN, T., WINTHER, L., TILL, S. J., PANZNER, P., KNULST, A. & VALOVIRTA, E. 2019. Birch pollen allergy in Europe. *Allergy*, 74, 1237-1248.

BLANCO, F., PAPP, G., GORETZKI, A., MÖLLER, T., ANZAGHE, M. & SCHÜLKE, S. 2019. Adjuvant Allergen Fusion Proteins as Novel Tools for the Treatment of Type I Allergies. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 67.

- BROZEK, G., LAWSON, J., SZUMILAS, D. & ZEJDA, J. 2015. Increasing prevalence of asthma, respiratory symptoms, and allergic diseases: Four repeated surveys from 1993-2014. *Respir Med*, 109, 982-90.
- BYLES, V., COVARRUBIAS, A. J., BEN-SAHRA, I., LAMMING, D. W., SABATINI, D. M., MANNING, B. D. & HORNG, T. 2013. The TSC-mTOR pathway regulates macrophage polarization. *Nature communications*, 4, 2834-2834.
- CABRERA, A., LEPAGE, J. E., SULLIVAN, K. M. & SEED, S. M. 2017. Vaxchora: A Single-Dose Oral Cholera Vaccine. *Ann Pharmacother*, 51, 584-589.
- CARGNELLO, M. & ROUX, P. P. 2011. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR*, 75, 50-83.
- CARRIERE, A., ROMEO, Y., ACOSTA-JAQUEZ, H. A., MOREAU, J., BONNEIL, E., THIBAUT, P., FINGAR, D. C. & ROUX, P. P. 2011. ERK1/2 phosphorylate Raptor to promote Ras-dependent activation of mTOR complex 1 (mTORC1). *J Biol Chem*, 286, 567-77.
- ČERNÝ, J. & STŘÍŽ, I. 2019. Adaptive innate immunity or innate adaptive immunity? *Clin Sci (Lond)*, 133, 1549-1565.
- CLASEN, S. J., BELL, M. E. W., BORBÓN, A., LEE, D. H., HENSELER, Z. M., DE LA CUESTA-ZULUAGA, J., PARYS, K., ZOU, J., WANG, Y., ALTMANNOVA, V., YOUNGBLUT, N. D., WEIR, J. R., GEWIRTZ, A. T., BELKHADIR, Y. & LEY, R. E. 2023. Silent recognition of flagellins from human gut commensal bacteria by Toll-like receptor 5. *Sci Immunol*, 8, eabq7001.
- COFFMAN, R. L., SHER, A. & SEDER, R. A. 2010. Vaccine adjuvants: putting innate immunity to work. *Immunity*, 33, 492-503.
- CONRAD, M. L., YILDIRIM, A. O., SONAR, S. S., KILIÇ, A., SUDOWE, S., LUNOW, M., TEICH, R., RENZ, H. & GARN, H. 2009. Comparison of adjuvant and adjuvant-free murine experimental asthma models. *Clin Exp Allergy*, 39, 1246-54.
- CUADROS, C., LOPEZ-HERNANDEZ, F. J., DOMINGUEZ, A. L., MCCLELLAND, M. & LUSTGARTEN, J. 2004. Flagellin fusion proteins as adjuvants or vaccines induce specific immune responses. *Infection and immunity*, 72, 2810-2816.
- DE ZOETE, M. R., PALM, N. W., ZHU, S. & FLAVELL, R. A. 2014. Inflammasomes. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 6, a016287-a016287.
- DEARMAN, R. J. & KIMBER, I. 2007. A mouse model for food allergy using intraperitoneal sensitization. *Methods*, 41, 91-8.
- DEL PRETE, G. 1992. Human Th1 and Th2 lymphocytes: their role in the pathophysiology of atopy. *Allergy*, 47, 450-5.
- DEROSIER, D. J. 1998. The turn of the screw: the bacterial flagellar motor. *Cell*, 93, 17-20.
- DESCOTES, J. & CHOQUET-KASTYLEVSKY, G. 2001. Gell and Coombs's classification: is it still valid? *Toxicology*, 158, 43-9.
- DRACHENBERG, K. J., WHEELER, A. W., STUEBNER, P. & HORAK, F. 2001. A well-tolerated grass pollen-specific allergy vaccine containing a novel adjuvant, monophosphoryl lipid A, reduces allergic symptoms after only four preseasonal injections. *Allergy*, 56, 498-505.
- DRAIJER, C. & PETERS-GOLDEN, M. 2017. Alveolar Macrophages in Allergic Asthma: the Forgotten Cell Awakes. *Curr Allergy Asthma Rep*, 17, 12.
- FAVATA, M. F., HORIUCHI, K. Y., MANOS, E. J., DAULERIO, A. J., STRADLEY, D. A., FEESER, W. S., VAN DYK, D. E., PITTS, W. J., EARL, R. A., HOBBS, F., COPELAND, R. A., MAGOLDA, R. L., SCHERLE, P. A. &

- TRZASKOS, J. M. 1998. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. *J Biol Chem*, 273, 18623-32.
- FUJITA, H., SOYKA, M. B., AKDIS, M. & AKDIS, C. A. 2012. Mechanisms of allergen-specific immunotherapy. *Clin Transl Allergy*, 2, 2.
- GAWCHIK, S. M. & SACCAR, C. L. 2009. Pollinex Quattro Tree: allergy vaccine. *Expert Opin Biol Ther*, 9, 377-82.
- GELL, P. G. H. C., R. R. A. 1963. Clinical Aspects of Immunology.
- GERMIC, N., FRANGEZ, Z., YOUSEFI, S. & SIMON, H.-U. 2019. Regulation of the innate immune system by autophagy: monocytes, macrophages, dendritic cells and antigen presentation. *Cell death and differentiation*, 26, 715-727.
- GOR, D. O., ROSE, N. R. & GREENSPAN, N. S. 2003. TH1-TH2: a procrustean paradigm. *Nat Immunol*, 4, 503-5.
- GOTO, N., KATO, H., MAEYAMA, J., SHIBANO, M., SAITO, T., YAMAGUCHI, J. & YOSHIHARA, S. 1997. Local tissue irritating effects and adjuvant activities of calcium phosphate and aluminium hydroxide with different physical properties. *Vaccine*, 15, 1364-71.
- GUERRERO MANRIQUEZ, G. G. & TUERO, I. 2021. Adjuvants: friends in vaccine formulations against infectious diseases. *Hum Vaccin Immunother*, 17, 3539-3550.
- GUERRIERO, J. L. 2019. Macrophages: Their Untold Story in T Cell Activation and Function. *Int Rev Cell Mol Biol*, 342, 73-93.
- HAJAM, I. A., DAR, P. A., CHANDRASEKAR, S., NANDA, R. K., KISHORE, S., BHANUPRAKASH, V. & GANESH, K. 2013. Co-administration of flagellin augments immune responses to inactivated foot-and-mouth disease virus (FMDV) antigen. *Res Vet Sci*, 95, 936-41.
- HAJAM, I. A., DAR, P. A., SHAHNAWAZ, I., JAUME, J. C. & LEE, J. H. 2017. Bacterial flagellin-a potent immunomodulatory agent. *Experimental & molecular medicine*, 49, e373-e373.
- HOFFMAN, W., LAKKIS, F. G. & CHALASANI, G. 2016. B Cells, Antibodies, and More. *Clin J Am Soc Nephrol*, 11, 137-54.
- HOGENESCH, H. 2012. Mechanism of immunopotentiality and safety of aluminum adjuvants. *Front Immunol*, 3, 406.
- HOTAMISLIGIL, G. S. 2017. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders. *Nature*, 542, 177-185.
- HUANG, J. & MANNING, B. D. 2009. A complex interplay between Akt, TSC2 and the two mTOR complexes. *Biochem Soc Trans*, 37, 217-22.
- HULEATT, J. W., JACOBS, A. R., TANG, J., DESAI, P., KOPP, E. B., HUANG, Y., SONG, L., NAKAAR, V. & POWELL, T. J. 2007. Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine*, 25, 763-775.
- ICKOVIC, M. R., RELYVELD, E. H., HÉNOCCQ, E., DAVID, B. & MARIE, F. N. 1983. Calcium-phosphate-adjuvanted allergens: total and specific IgE levels before and after immunotherapy with house dust and Dermatophagoides pteronyssinus extracts. *Ann Immunol (Paris)*, 134d, 385-98.
- IWASAKI, A. & MEDZHITOV, R. 2015. Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol*, 16, 343-53.

- IYER, S. S., GHAFARI, A. A. & CHENG, G. 2010. Lipopolysaccharide-Mediated IL-10 Transcriptional Regulation Requires Sequential Induction of Type I IFNs and IL-27 in Macrophages. *The Journal of Immunology*, 185, 6599-6607.
- JENSEN-JAROLIM, E. 2015. Aluminium in Allergies and Allergen immunotherapy. *World Allergy Organ J*, 8, 7.
- JUNG, C. H., RO, S. H., CAO, J., OTTO, N. M. & KIM, D. H. 2010. mTOR regulation of autophagy. *FEBS Lett*, 584, 1287-95.
- KANY, S., VOLLRATH, J. T. & RELJA, B. 2019. Cytokines in Inflammatory Disease. *Int J Mol Sci*, 20.
- KAZEMI-SHIRAZI, L., PAULI, G., PUROHIT, A., SPITZAUER, S., FRÖSCHL, R., HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K., BREITENEDER, H., SCHEINER, O., KRAFT, D. & VALENTA, R. 2000. Quantitative IgE inhibition experiments with purified recombinant allergens indicate pollen-derived allergens as the sensitizing agents responsible for many forms of plant food allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 105, 116-25.
- KHAN, S., BIJKER, M. S., WETERINGS, J. J., TANKE, H. J., ADEMA, G. J., VAN HALL, T., DRIJFHOUT, J. W., MELIEF, C. J., OVERKLEEF, H. S., VAN DER MAREL, G. A., FILIPPOV, D. V., VAN DER BURG, S. H. & OSSENDORP, F. 2007. Distinct uptake mechanisms but similar intracellular processing of two different toll-like receptor ligand-peptide conjugates in dendritic cells. *J Biol Chem*, 282, 21145-59.
- KIM, L. C., COOK, R. S. & CHEN, J. 2017. mTORC1 and mTORC2 in cancer and the tumor microenvironment. *Oncogene*, 36, 2191-2201.
- KITZMÜLLER, C., KALSER, J., MUTSCHLECHNER, S., HAUSER, M., ZLABINGER, G. J., FERREIRA, F. & BOHLE, B. 2018. Fusion proteins of flagellin and the major birch pollen allergen Bet v 1 show enhanced immunogenicity, reduced allergenicity, and intrinsic adjuvanticity. *J Allergy Clin Immunol*, 141, 293-299.e6.
- KITZMÜLLER, C., WALLNER, M., DEIFL, S., MUTSCHLECHNER, S., WALTERSKIRCHEN, C., ZLABINGER, G. J., FERREIRA, F. & BOHLE, B. 2012. A hypoallergenic variant of the major birch pollen allergen shows distinct characteristics in antigen processing and T-cell activation. *Allergy*, 67, 1375-82.
- KRISHNA, M. T. & HUISSOON, A. P. 2011. Clinical immunology review series: an approach to desensitization. *Clinical and experimental immunology*, 163, 131-146.
- KUMAR, B. V., CONNORS, T. J. & FARBER, D. L. 2018. Human T Cell Development, Localization, and Function throughout Life. *Immunity*, 48, 202-213.
- KWISSA, M., KASTURI, S. P. & PULENDRAN, B. 2007. The science of adjuvants. *Expert Rev Vaccines*, 6, 673-84.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LEUTHARD, D. S., DUDA, A., FREIBERGER, S. N., WEISS, S., DOMMANN, I., FENINI, G., CONTASSOT, E., KRAMER, M. F., SKINNER, M. A., KÜNDIG, T. M., HEATH, M. D. & JOHANSEN, P. 2018. Microcrystalline Tyrosine and Aluminum as Adjuvants in Allergen-Specific Immunotherapy Protect from IgE-Mediated Reactivity in Mouse Models and Act Independently of Inflammasome and TLR Signaling. *J Immunol*, 200, 3151-3159.
- LI, D. & WU, M. 2021. Pattern recognition receptors in health and diseases. *Signal Transduct Target Ther*, 6, 291.
- LI, J., KIM, S. G. & BLENIS, J. 2014. Rapamycin: one drug, many effects. *Cell metabolism*, 19, 373-379.

- LI, X., YAO, X., ZHU, Y., ZHANG, H., WANG, H., MA, Q., YAN, F., YANG, Y., ZHANG, J., SHI, H., NING, Z., DAI, J., LI, Z., LI, C., SU, F., XUE, Y., MENG, X., DONG, G. & XIONG, H. 2019. The Caspase Inhibitor Z-VAD-FMK Alleviates Endotoxic Shock via Inducing Macrophages Necroptosis and Promoting MDSCs-Mediated Inhibition of Macrophages Activation. *Frontiers in immunology*, 10, 1824-1824.
- LIN, Y. J., PAPP, G., MISKEY, C., FIEDLER, A., GORETZKI, A., WOLFHEIMER, S., ZIMMERMANN, J., CRAUWELS, P., IVICS, Z., VAN ZANDBERGEN, G., VIETHS, S., SCHEURER, S. & SCHÜLKE, S. 2021. The Flagellin:Allergen Fusion Protein rFlaA:Betv1 Induces a MyD88- and MAPK-Dependent Activation of Glucose Metabolism in Macrophages. *Cells*, 10.
- LINKE, M., FRITSCH, S. D., SUKHBAATAR, N., HENGSTSCHLÄGER, M. & WEICHHART, T. 2017. mTORC1 and mTORC2 as regulators of cell metabolism in immunity. *FEBS letters*, 591, 3089-3103.
- LIPINSKA, K., MALONE, K. E., MOERLAND, M. & KLUFT, C. 2014. Applying caspase-1 inhibitors for inflammasome assays in human whole blood. *J Immunol Methods*, 411, 66-9.
- LIU, T., ZHANG, L., JOO, D. & SUN, S.-C. 2017. NF- κ B signaling in inflammation. *Signal Transduction and Targeted Therapy*, 2, 17023.
- LUCKHEERAM, R. V., ZHOU, R., VERMA, A. D. & XIA, B. 2012. CD4⁺T cells: differentiation and functions. *Clinical & developmental immunology*, 2012, 925135-925135.
- MAI, J., VIRTUE, A., SHEN, J., WANG, H. & YANG, X.-F. 2013. An evolving new paradigm: endothelial cells – conditional innate immune cells. *Journal of Hematology & Oncology*, 6, 61.
- MAKOWSKI, L., CHAIB, M. & RATHMELL, J. C. 2020. Immunometabolism: From basic mechanisms to translation. *Immunol Rev*, 295, 5-14.
- MAN, S. M. & KANNEGANTI, T.-D. 2015. Regulation of inflammasome activation. *Immunological reviews*, 265, 6-21.
- MANTEGAZZA, A. R., MAGALHAES, J. G., AMIGORENA, S. & MARKS, M. S. 2013. Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II. *Traffic*, 14, 135-52.
- MARTINEZ-GONZALEZ, I., STEER, C. A. & TAKEI, F. 2015. Lung ILC2s link innate and adaptive responses in allergic inflammation. *Trends Immunol*, 36, 189-95.
- MARTINEZ, F. O. & GORDON, S. 2014. The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime reports*, 6, 13-13.
- MCCUBREY, J. A., STEELMAN, L. S., CHAPPELL, W. H., ABRAMS, S. L., WONG, E. W. T., CHANG, F., LEHMANN, B., TERRIAN, D. M., MILELLA, M., TAFURI, A., STIVALA, F., LIBRA, M., BASECKE, J., EVANGELISTI, C., MARTELLI, A. M. & FRANKLIN, R. A. 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochimica et biophysica acta*, 1773, 1263-1284.
- MCDONALD, W. F., HULEATT, J. W., FOELLMER, H. G., HEWITT, D., TANG, J., DESAI, P., PRICE, A., JACOBS, A., TAKAHASHI, V. N., HUANG, Y., NAKAAR, V., ALEXOPOULOU, L., FIKRIG, E. & POWELL, T. J. 2007. A West Nile virus recombinant protein vaccine that coactivates innate and adaptive immunity. *J Infect Dis*, 195, 1607-17.
- MCSORLEY, S. J., EHST, B. D., YU, Y. & GEWIRTZ, A. T. 2002. Bacterial flagellin is an effective adjuvant for CD4⁺ T cells in vivo. *J Immunol*, 169, 3914-9.
- MELLMAN, I. 2013. Dendritic cells: master regulators of the immune response. *Cancer Immunol Res*, 1, 145-9.
- MENON, M. B., KOTLYAROV, A. & GAESTEL, M. 2011. SB202190-induced cell type-specific vacuole formation and defective autophagy do not depend on p38 MAP kinase inhibition. *PLoS One*, 6, e23054.

- MICHAELOUDES, C., BHAVSAR, P. K., MUMBY, S., XU, B., HUI, C. K. M., CHUNG, K. F. & ADCOCK, I. M. 2020. Role of Metabolic Reprogramming in Pulmonary Innate Immunity and Its Impact on Lung Diseases. *J Innate Immun*, 12, 31-46.
- MINOR, P. D. 2015. Live attenuated vaccines: Historical successes and current challenges. *Virology*, 479-480, 379-392.
- MIRANDA, M. B., MCGUIRE, T. F. & JOHNSON, D. E. 2002. Importance of MEK-1/-2 signaling in monocytic and granulocytic differentiation of myeloid cell lines. *Leukemia*, 16, 683-692.
- MOELLER, T., WOLFHEIMER, S., GORETZKI, A., SCHEURER, S. & SCHÜLKE, S. 2019. NFκB- and MAP-Kinase Signaling Contribute to the Activation of Murine Myeloid Dendritic Cells by a Flagellin A:Allergen Fusion Protein. *Cells*, 8.
- MOINGEON, P. 2012. Adjuvants for allergy vaccines. *Hum Vaccin Immunother*, 8, 1492-8.
- MOOTE, W., KIM, H. & ELLIS, A. K. 2018. Allergen-specific immunotherapy. Allergy, asthma, and clinical immunology : official journal of the Canadian Society of Allergy and Clinical Immunology, 14, 53-53.
- MORRISON, D. K. 2012. MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 4, a011254.
- MOSMANN, T. R., CHERWINSKI, H., BOND, M. W., GIEDLIN, M. A. & COFFMAN, R. L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136, 2348-57.
- NAKAMURA, S. & MINAMINO, T. 2019. Flagella-Driven Motility of Bacteria. *Biomolecules*, 9, 279.
- NARANJO, P. 1992. Epidemic hecatomb in the New World. *Allergy Proc*, 13, 237-41.
- NEMPONT, C., CAYET, D., RUMBO, M., BOMPARD, C., VILLERET, V. & SIRARD, J.-C. 2008. Deletion of Flagellin's Hypervariable Region Abrogates Antibody-Mediated Neutralization and Systemic Activation of TLR5-Dependent Immunity. *The Journal of Immunology*, 181, 2036-2043.
- NOON, L. 1911. PROPHYLACTIC INOCULATION AGAINST HAY FEVER. *The Lancet*, 177, 1572-1573.
- NOVAL RIVAS, M., BURTON, O. T., OETTGEN, H. C. & CHATILA, T. 2016. IL-4 production by group 2 innate lymphoid cells promotes food allergy by blocking regulatory T-cell function. *J Allergy Clin Immunol*, 138, 801-811.e9.
- PARDI, N., HOGAN, M. J., PORTER, F. W. & WEISSMAN, D. 2018. mRNA vaccines - a new era in vaccinology. *Nature reviews. Drug discovery*, 17, 261-279.
- PATTERSON, K. B. & RUNGE, T. 2002. Smallpox and the Native American. *Am J Med Sci*, 323, 216-22.
- POLIVKA, J., JR. & JANKU, F. 2014. Molecular targets for cancer therapy in the PI3K/AKT/mTOR pathway. *Pharmacol Ther*, 142, 164-75.
- POLTORAK, A., HE, X., SMIRNOVA, I., LIU, M. Y., VAN HUFFEL, C., DU, X., BIRDWELL, D., ALEJOS, E., SILVA, M., GALANOS, C., FREUDENBERG, M., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., LAYTON, B. & BEUTLER, B. 1998. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene. *Science*, 282, 2085-8.
- PROCYK, K. J., RIPPO, M. R., TESTI, R., HOFMANN, F., PARKER, P. J. & BACCARINI, M. 2000. Lipopolysaccharide induces Jun N-terminal kinase activation in macrophages by a novel Cdc42/Rac-independent pathway involving sequential activation of protein kinase C ζ and phosphatidylcholine-dependent phospholipase C. *Blood*, 96, 2592-2598.
- PUNNONEN, J., YSSEL, H. & DE VRIES, J. E. 1997. The relative contribution of IL-4 and IL-13 to human IgE synthesis induced by activated CD4+ or CD8+ T cells. *J Allergy Clin Immunol*, 100, 792-801.

- QU, Y., MISAGHI, S., NEWTON, K., MALTZMAN, A., IZRAEL-TOMASEVIC, A., ARNOTT, D. & DIXIT, V. M. 2016. NLRP3 recruitment by NLRC4 during Salmonella infection. *J Exp Med*, 213, 877-85.
- QURESHI, N., TAKAYAMA, K. & RIBI, E. 1982. Purification and structural determination of nontoxic lipid A obtained from the lipopolysaccharide of Salmonella typhimurium. *J Biol Chem*, 257, 11808-15.
- RADAUER, C., LACKNER, P. & BREITENEDER, H. 2008. The Bet v 1 fold: an ancient, versatile scaffold for binding of large, hydrophobic ligands. *BMC evolutionary biology*, 8, 286-286.
- REED, S. G., ORR, M. T. & FOX, C. B. 2013. Key roles of adjuvants in modern vaccines. *Nature Medicine*, 19, 1597-1608.
- RIEDEL, S. 2005. Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination. *Proceedings (Baylor University. Medical Center)*, 18, 21-25.
- RONCAROLO, M. G., GREGORI, S., BACCHETTA, R., BATTAGLIA, M. & GAGLIANI, N. 2018. The Biology of T Regulatory Type 1 Cells and Their Therapeutic Application in Immune-Mediated Diseases. *Immunity*, 49, 1004-1019.
- ROSEWICH, M., LEE, D. & ZIELEN, S. 2013. Pollinex Quattro: an innovative four injections immunotherapy in allergic rhinitis. *Hum Vaccin Immunother*, 9, 1523-31.
- ROUX, P. P., BALLIF, B. A., ANJUM, R., GYGI, S. P. & BLENIS, J. 2004. Tumor-promoting phorbol esters and activated Ras inactivate the tuberous sclerosis tumor suppressor complex via p90 ribosomal S6 kinase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101, 13489-13494.
- SALTIEL, A. R. & OLEFSKY, J. M. 2017. Inflammatory mechanisms linking obesity and metabolic disease. *The Journal of clinical investigation*, 127, 1-4.
- SAXTON, R. A. & SABATINI, D. M. 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168, 960-976.
- SCHULKE, S., FIEDLER, A. H., JUNKER, A. C., FLACZYK, A., WOLFHEIMER, S., WANGORSCH, A., HEINZ, A., BECKERT, H., NAGL, B., BOHLE, B., VIETHS, S., TODA, M. & SCHEURER, S. 2018. Critical role of mammalian target of rapamycin for IL-10 dendritic cell induction by a flagellin A conjugate in preventing allergic sensitization. *J Allergy Clin Immunol*, 141, 1786-1798.e11.
- SCHÜLKE, S., VOGEL, L., JUNKER, A.-C., HANSCHMANN, K.-M., FLACZYK, A., VIETHS, S. & SCHEURER, S. 2016. A Fusion Protein Consisting of the Vaccine Adjuvant Monophosphoryl Lipid A and the Allergen Ovalbumin Boosts Allergen-Specific Th1, Th2, and Th17 Responses In Vitro. *Journal of immunology research*, 2016, 4156456-4156456.
- SCHULKE, S., WAIBLER, Z., MENDE, M. S., ZOCCATELLI, G., VIETHS, S., TODA, M. & SCHEURER, S. 2010. Fusion protein of TLR5-ligand and allergen potentiates activation and IL-10 secretion in murine myeloid DC. *Mol Immunol*, 48, 341-50.
- SCHÜLKE, S., WOLFHEIMER, S., GADERMAIER, G., WANGORSCH, A., SIEBENEICHER, S., BRIZA, P., SPREITZER, I., SCHILLER, D., LOESCHNER, B., UEMATSU, S., RYFFEL, B., AKIRA, S., WAIBLER, Z., VIETHS, S., TODA, M. & SCHEURER, S. 2014. Prevention of intestinal allergy in mice by rflaA:Ova is associated with enforced antigen processing and TLR5-dependent IL-10 secretion by mDC. *PLoS one*, 9, e87822-e87822.
- SCHULZE-OSTHOFF, K., FERRARI, D., RIEHEMANN, K. & WESSELBORG, S. 1997. Regulation of NF- κ B Activation by MAP Kinase Cascades. *Immunobiology*, 198, 35-49.
- SHAPOURI-MOGHADDAM, A., MOHAMMADIAN, S., VAZINI, H., TAGHADOSI, M., ESMAEILI, S. A., MARDANI, F., SEIFI, B., MOHAMMADI, A., AFSHARI, J. T. & SAHEBKAR, A. 2018. Macrophage plasticity, polarization, and function in health and disease. *J Cell Physiol*, 233, 6425-6440.

- SHEVACH, E. M. & THORNTON, A. M. 2014. tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev*, 259, 88-102.
- SHORNING, B. Y., DASS, M. S., SMALLEY, M. J. & PEARSON, H. B. 2020. The PI3K-AKT-mTOR Pathway and Prostate Cancer: At the Crossroads of AR, MAPK, and WNT Signaling. *International journal of molecular sciences*, 21, 4507.
- SIEBENEICHER, S., REUTER, S., KRAUSE, M., WANGORSCH, A., MAXEINER, J., WOLFHEIMER, S., SCHULKE, S., NAITO, S., HEINZ, A., TAUBE, C., VIETHS, S., SCHEURER, S. & TODA, M. 2014. Epicutaneous immune modulation with Bet v 1 plus R848 suppresses allergic asthma in a murine model. *Allergy*, 69, 328-37.
- SKOUNTZOU, I., MARTIN, M. D. P., WANG, B., YE, L., KOUTSONANOS, D., WELDON, W., JACOB, J. & COMPANS, R. W. 2010. Salmonella flagellins are potent adjuvants for intranasally administered whole inactivated influenza vaccine. *Vaccine*, 28, 4103-4112.
- SMITH-GARVIN, J. E., KORETZKY, G. A. & JORDAN, M. S. 2009. T cell activation. *Annual review of immunology*, 27, 591-619.
- SMOLE, U., RADAUER, C., LENGGER, N., SVOBODA, M., RIGBY, N., BUBLIN, M., GAIER, S., HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K., JENSEN-JAROLIM, E., MECHTCHERIAKOVA, D. & BREITENEDER, H. 2015. The major birch pollen allergen Bet v 1 induces different responses in dendritic cells of birch pollen allergic and healthy individuals. *PLoS one*, 10, e0117904-e0117904.
- SMOLE, U., WAGNER, S., BALAZS, N., RADAUER, C., BUBLIN, M., ALLMAIER, G., HOFFMANN-SOMMERGRUBER, K. & BREITENEDER, H. 2010. Bet v 1 and its homologous food allergen Api g 1 stimulate dendritic cells from birch pollen-allergic individuals to induce different Th-cell polarization. *Allergy*, 65, 1388-96.
- SOLLBERGER, G., STRITTMATTER, G. E., GARSTKIEWICZ, M., SAND, J. & BEER, H. D. 2014. Caspase-1: the inflammasome and beyond. *Innate Immun*, 20, 115-25.
- SONG, H. K. & HWANG, D. Y. 2017. Use of C57BL/6N mice on the variety of immunological researches. *Lab Anim Res*, 33, 119-123.
- STOCKER, B. A. 1990. Aromatic-dependent Salmonella as live vaccine presenters of foreign epitopes as inserts in flagellin. *Res Microbiol*, 141, 787-96.
- TAYLOR, D. N., TREANOR, J. J., STROUT, C., JOHNSON, C., FITZGERALD, T., KAVITA, U., OZER, K., TUSSEY, L. & SHAW, A. 2011. Induction of a potent immune response in the elderly using the TLR-5 agonist, flagellin, with a recombinant hemagglutinin influenza-flagellin fusion vaccine (VAX125, STF2.HA1 SI). *Vaccine*, 29, 4897-902.
- TEE, A. R., ANJUM, R. & BLENIS, J. 2003. Inactivation of the tuberous sclerosis complex-1 and -2 gene products occurs by phosphoinositide 3-kinase/Akt-dependent and -independent phosphorylation of tuberin. *J Biol Chem*, 278, 37288-96.
- TURLEY, C. B., RUPP, R. E., JOHNSON, C., TAYLOR, D. N., WOLFSON, J., TUSSEY, L., KAVITA, U., STANBERRY, L. & SHAW, A. 2011. Safety and immunogenicity of a recombinant M2e-flagellin influenza vaccine (STF2.4xM2e) in healthy adults. *Vaccine*, 29, 5145-52.
- VAN DER VALK, J. P., DE JONG, N. W. & GERTH VAN WIJK, R. 2015. Review on immunotherapy in airway allergen sensitised patients. *Neth J Med*, 73, 263-9.
- VAN OPDENBOSCH, N. & LAMKANFI, M. 2019. Caspases in Cell Death, Inflammation, and Disease. *Immunity*, 50, 1352-1364.
- VAN REE, R., HUMMELSHØJ, L., PLANTINGA, M., POULSEN, L. K. & SWINDLE, E. 2014. Allergic sensitization: host-immune factors. *Clinical and translational allergy*, 4, 12-12.

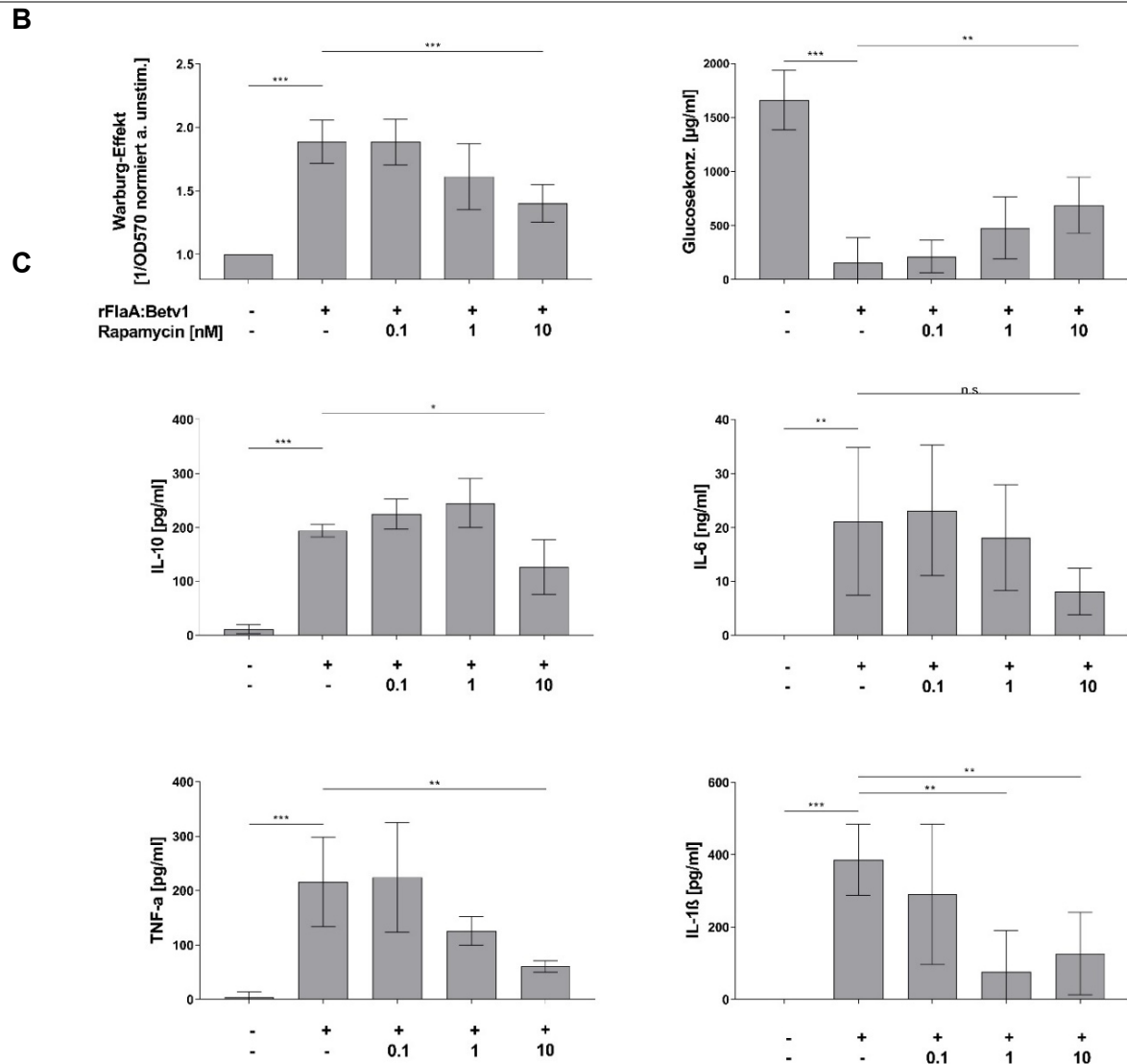
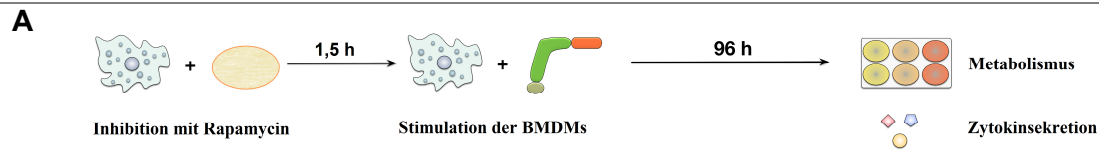
- VASOU, A., SULTANOGLU, N., GOODBOURN, S., RANDALL, R. E. & KOSTRIKIS, L. G. 2017. Targeting Pattern Recognition Receptors (PRR) for Vaccine Adjuvantation: From Synthetic PRR Agonists to the Potential of Defective Interfering Particles of Viruses. *Viruses*, 9.
- VATS, D., MUKUNDAN, L., ODEGAARD, J. I., ZHANG, L., SMITH, K. L., MOREL, C. R., WAGNER, R. A., GREAVES, D. R., MURRAY, P. J. & CHAWLA, A. 2006. Oxidative metabolism and PGC-1beta attenuate macrophage-mediated inflammation. *Cell metabolism*, 4, 13-24.
- VERMA, N. K., ZIEGLER, H. K., STOCKER, B. A. & SCHOOLNIK, G. K. 1995. Induction of a cellular immune response to a defined T-cell epitope as an insert in the flagellin of a live vaccine strain of Salmonella. *Vaccine*, 13, 235-44.
- VIGNALI, D. A., COLLISON, L. W. & WORKMAN, C. J. 2008. How regulatory T cells work. *Nat Rev Immunol*, 8, 523-32.
- VIOLA, A., MUNARI, F., SÁNCHEZ-RODRÍGUEZ, R., SCOLARO, T. & CASTEGNA, A. 2019. The Metabolic Signature of Macrophage Responses. *Frontiers in immunology*, 10, 1462-1462.
- WALLIS, D., ASADUZZAMAN, A., WEISMAN, M., HAROON, N., ANTON, A., MCGOVERN, D., TARGAN, S. & INMAN, R. 2013. Elevated serum anti-flagellin antibodies implicate subclinical bowel inflammation in ankylosing spondylitis: an observational study. *Arthritis Res Ther*, 15, R166.
- WAMBRE, E., JAMES, E. A. & KWOK, W. W. 2012. Characterization of CD4+ T cell subsets in allergy. *Current opinion in immunology*, 24, 700-706.
- WANG, T., LIU, H., LIAN, G., ZHANG, S. Y., WANG, X. & JIANG, C. 2017. HIF1 α -Induced Glycolysis Metabolism Is Essential to the Activation of Inflammatory Macrophages. *Mediators Inflamm*, 2017, 9029327.
- WARBURG, O. 1956. On the Origin of Cancer Cells. *Science*, 123, 309-314.
- WARBURG, O., WIND, F. & NEGELEIN, E. 1927. THE METABOLISM OF TUMORS IN THE BODY. *J Gen Physiol*, 8, 519-30.
- WEIMER, E. T., ERVIN, S. E., WOZNIAK, D. J. & MIZEL, S. B. 2009. Immunization of young African green monkeys with OprF epitope 8-OprI-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of protective antibodies against nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine*, 27, 6762-9.
- WEISCHENFELDT, J. & PORSE, B. 2008. Bone Marrow-Derived Macrophages (BMM): Isolation and Applications. *CSH Protoc*, 2008, pdb.prot5080.
- WIEDERMANN, U., JAHN-SCHMID, B., BOHLE, B., REPA, A., RENZ, H., KRAFT, D. & EBNER, C. 1999. Suppression of antigen-specific T- and B-cell responses by intranasal or oral administration of recombinant bet v 1, the major birch pollen allergen, in a murine model of type I allergy. *J Allergy Clin Immunol*, 103, 1202-10.
- WORM, M., JAPPE, U., KLEINE-TEBBE, J., SCHÄFER, C., REESE, I., SALOGA, J., TREUDLER, R., ZUBERBIER, T., WAßMANN, A., FUCHS, T., DÖLLE, S., RAITHEL, M., BALLMER-WEBER, B., NIGGEMANN, B. & WERFEL, T. 2014. Food allergies resulting from immunological cross-reactivity with inhalant allergens: Guidelines from the German Society for Allergology and Clinical Immunology (DGAKI), the German Dermatology Society (DDG), the Association of German Allergologists (AeDA) and the Society for Pediatric Allergology and Environmental Medicine (GPA). *Allergo J Int*, 23, 1-16.
- YOO, B., PARK, Y., PARK, K. & KIM, H. 2015. A 9-year Trend in the Prevalence of Allergic Disease Based on National Health Insurance Data. *J Prev Med Public Health*, 48, 301-9.
- ZELINSKY, G., BALKOW, S., SCHIMMER, S., SCHEPERS, K., SIMON, M. M. & DITTMER, U. 2004. Independent roles of perforin, granzymes, and Fas in the control of Friend retrovirus infection. *Virology*, 330, 365-74.

- ZHANG, H., KONG, H., ZENG, X., GUO, L., SUN, X. & HE, S. 2014. Subsets of regulatory T cells and their roles in allergy. *J Transl Med*, 12, 125.
- ZHANG, J. M. & AN, J. 2007. Cytokines, inflammation, and pain. *Int Anesthesiol Clin*, 45, 27-37.
- ZHANG, N. & BEVAN, M. J. 2011. CD8(+) T cells: foot soldiers of the immune system. *Immunity*, 35, 161-8.
- ZHANG, Y., ZENG, G., PAN, H., LI, C., HU, Y., CHU, K., HAN, W., CHEN, Z., TANG, R., YIN, W., CHEN, X., HU, Y., LIU, X., JIANG, C., LI, J., YANG, M., SONG, Y., WANG, X., GAO, Q. & ZHU, F. 2021. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18-59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. *Lancet Infect Dis*, 21, 181-192.
- ZHAO, Y., YANG, J., SHI, J., GONG, Y. N., LU, Q., XU, H., LIU, L. & SHAO, F. 2011. The NLRC4 inflammasome receptors for bacterial flagellin and type III secretion apparatus. *Nature*, 477, 596-600.
- ZIEGLMAYER, P., FOCKE-TEJKL, M., SCHMUTZ, R., LEMELL, P., ZIEGLMAYER, R., WEBER, M., KISS, R., BLATT, K., VALENT, P., STOLZ, F., HUBER, H., NEUBAUER, A., KNOLL, A., HORAK, F., HENNING, R. & VALENTA, R. 2016. Mechanisms, safety and efficacy of a B cell epitope-based vaccine for immunotherapy of grass pollen allergy. *EBioMedicine*, 11, 43-57.
- ZIMMERMANN, J., GORETZKI, A., MEIER, C., WOLFHEIMER, S., LIN, Y. J., RAINER, H., KRAUSE, M., WEDEL, S., SPIES, G., FÜHRER, F., VIETHS, S., SCHEURER, S. & SCHÜLKE, S. 2022. Modulation of dendritic cell metabolism by an MPLA-adjuvanted allergen product for specific immunotherapy. *Front Immunol*, 13, 916491.

V Anhangsverzeichnis

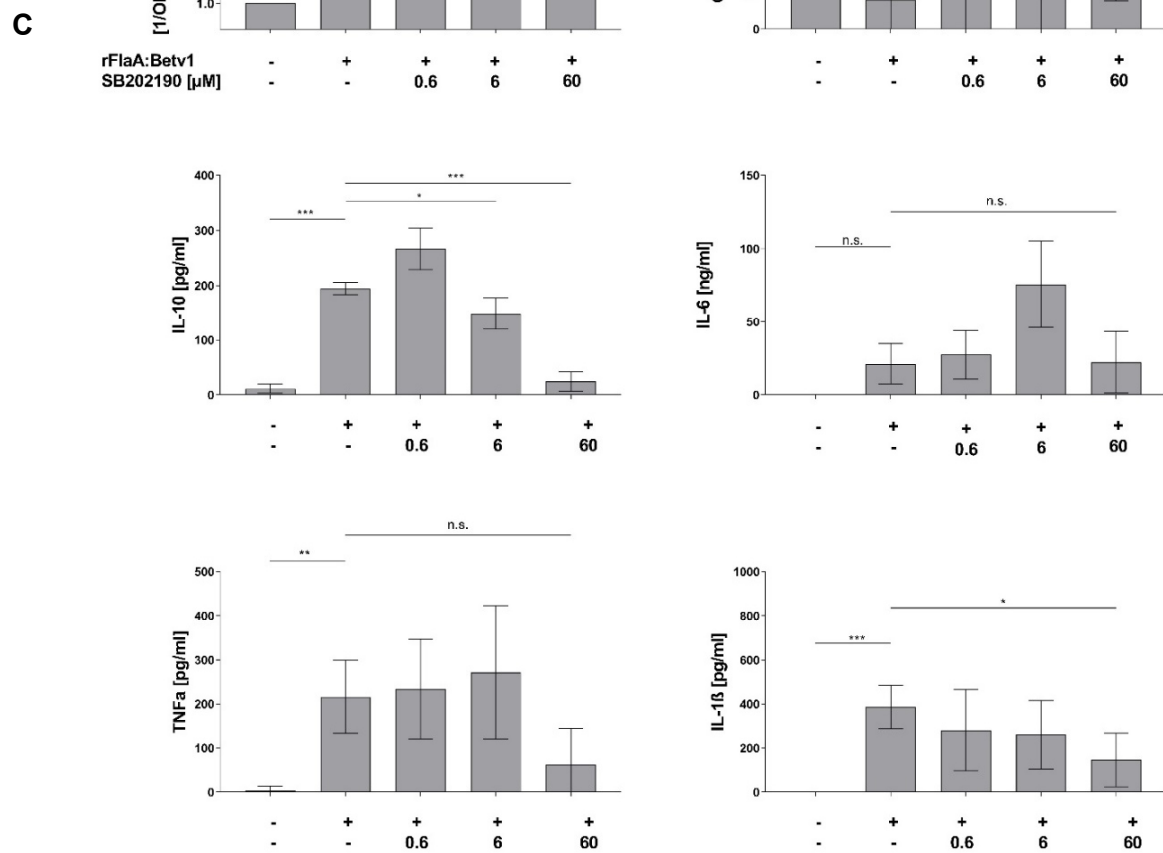
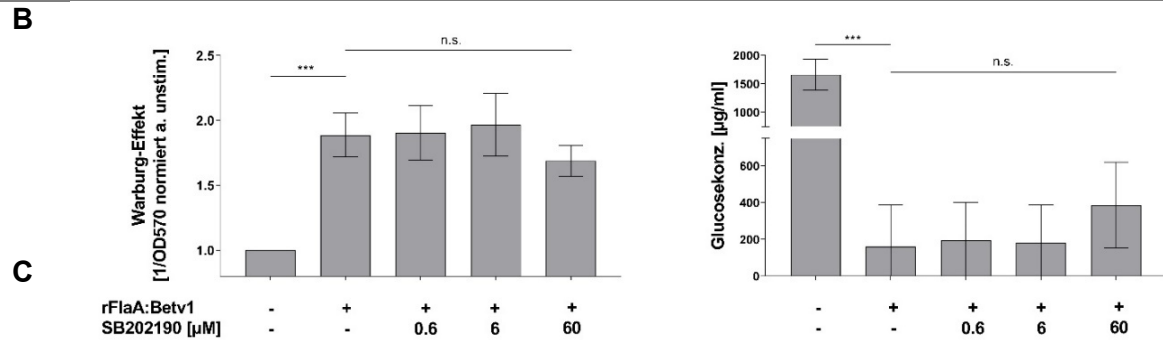
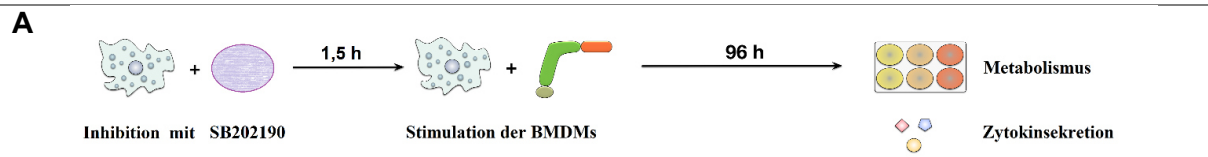
Abbildung A 1.....	88
Abbildung A 2.....	89
Abbildung A 3.....	90

Abbildung A 1



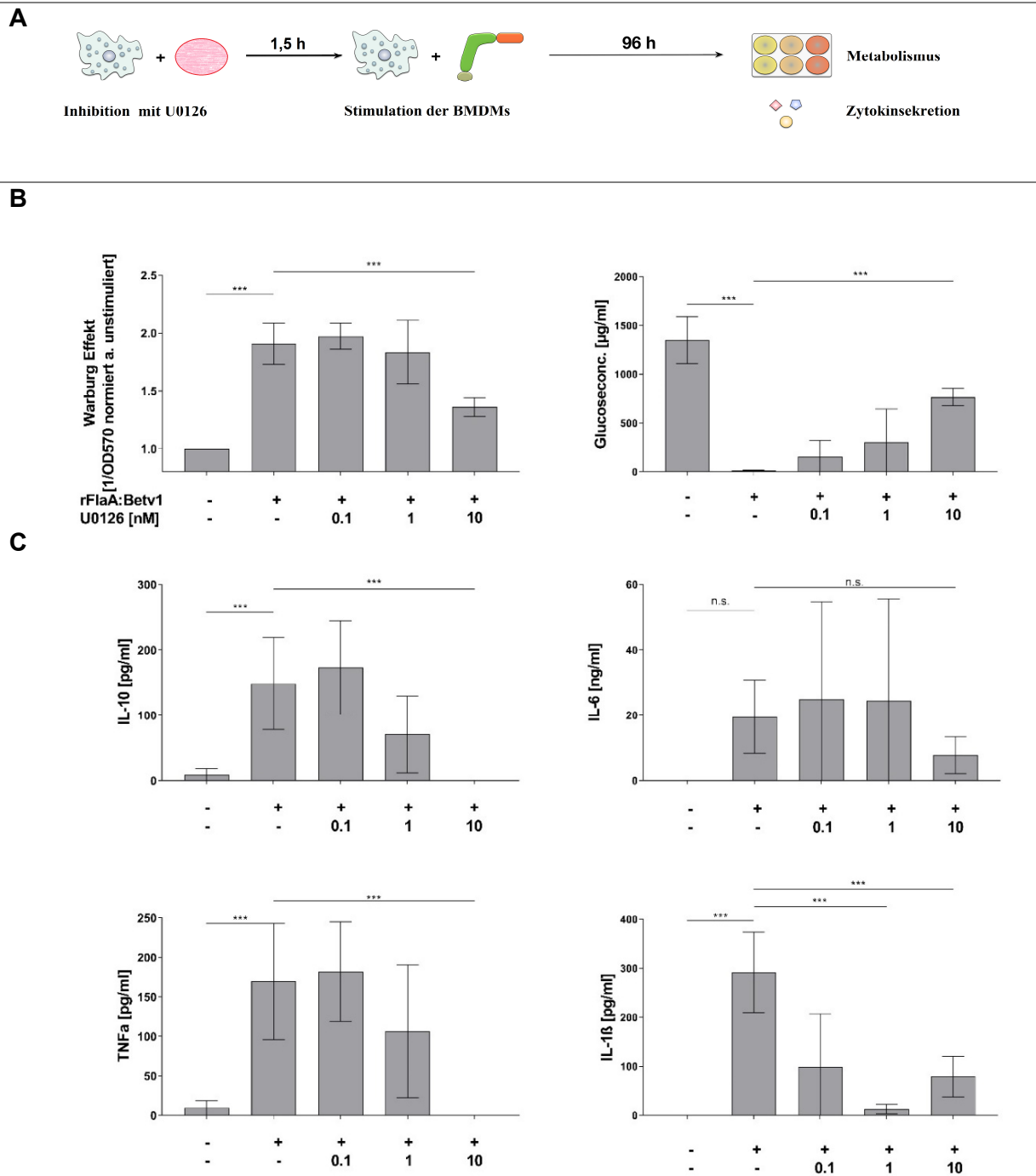
Die rFlaA:Betv1-vermittelte Aktivierung des Zellmetabolismus sowie die Zytokinsekretion in BALB/c-BMDMs ist mTOR-abhängig. BMDMs, differenziert aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen, wurden mit Rapamycin für 90 Minuten vorbehandelt und im Anschluss mit rFlaA:Betv1 für zusätzliche 96 h stimuliert. Die Analyse der Zellen erfolgte hinsichtlich der Aktivierung des Zellmetabolismus (Warburg-Effekt und Glucosemetabolismus) (**B**) sowie der Sekretion pro- (IL-6, TNF- α , IL-1 β) als auch anti-nflammatorischer (IL-10) Zytokine. Die Daten sind das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente mit jeweils technischen Duplikaten – statistische Signifikanz berechnet mit zweifaktorieller Varianzanalyse, dargestellt als: n.s. p-Wert > 0,5, * p-Wert < 0,5, ** p-Wert < 0,01, *** p-Wert < 0,001.

Abbildung A 2



Sowohl die rFlaA:Betv1-vermittelte Aktivierung des Zellmetabolismus und die IL-10-Sekretion in BALB/c-BMDMs sind p38-MAP-Kinase-unabhängig, während die Sekretion proinflammatorischer Zytokine teilweise von der p38-MAP-Kinase abhängen. BMDMs, differenziert aus dem Knochenmark von BALB/c-Mäusen, wurden mit SB202190 (p38-MAPK-Inhibitor) für 90 Minuten vorinkubiert und im Anschluss mit rFlaA:Betv1 für zusätzliche 96 h stimuliert. Die Analyse der Zellaktivierung erfolgte hinsichtlich des Zellmetabolismus (Warburg-Effekt und Glucosemetabolismus) (B) sowie der Sekretion proinflammatorischer (IL-6, TNF- α , IL-1 β) sowie antiinflammatorischer Zytokine (IL-10) (C). Die gezeigten Daten sind das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente mit jeweils technischen Duplikaten – statistische Signifikanz berechnet mit zweifaktorieller Varianzanalyse, dargestellt als: n.s. p-Wert > 0,5, * p-Wert < 0,5, ** p-Wert < 0,01, *** p-Wert < 0,001.

Abbildung A 3



Die Aktivierung des Zellmetabolismus sowie die Ausschüttung pro- und antiinflammatorischer Zytokine in BALB/c-BMDMs ist abhängig von der p42/44-MAP-Kinase. BMDMs, differenziert aus dem Knochenmark von C57BL/6-Mäusen, wurden mit U0126 (p42/44-MAPK-Inhibitor) für 90 Minuten vorinkubiert und im Anschluss mit rFlaA:Betv1 für zusätzliche 96 h stimuliert. Die Analyse der Zellaktivierung erfolgte hinsichtlich des Zellmetabolismus (Warburg-Effekt und Glucosemetabolismus) (B) sowie der Sekretion proinflammatorischer (IL-6, TNF- α , IL-1 β) sowie antiinflammatorischer Zytokine (IL-10) (C). Die gezeigten Daten sind das Ergebnis dreier unabhängiger Experimente mit jeweils technischen Duplikaten – statistische Signifikanz berechnet mit zweifaktorieller Varianzanalyse, dargestellt als: n.s. p-Wert > 0,5, * p-Wert < 0,5, ** p-Wert < 0,01, *** p-Wert < 0,001.