

**"Phänotypische und funktionelle
Eigenschaften humaner neonataler
dendritischer Zellen"**

D i s s e r t a t i o n
zur Erlangung des Grades
"Doktor der Naturwissenschaften"

am Fachbereich Biologie
der Johannes Gutenberg-Universität Mainz

Doreen Krumbiegel

Mainz, 2007

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	1
1.1. Neonatale Immunität	1
1.2. Dendritische Zellen, Regulatoren der Immunantwort	1
1.2.1. Zell-Zellkontakt zwischen dendritischer Zelle und T-Zelle	2
1.2.2. Polarisierung CD4-positiver T-Zellen	3
1.2.3. Die Interleukin-12 Familie: IL-12, IL-23 und IL-27	4
1.2.4. Toll- <i>like</i> Rezeptoren	6
1.2.5. Signaltransduktion	9
1.2.6. Subpopulationen der dendritischen Zellen	10
1.3 Zielsetzung der Arbeit	12
2. MATERIAL UND METHODEN	13
2.1. Untersuchungsmaterial	13
2.2. Separation der peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut	13
2.2.1. Blut adulter Spender (AB)	14
2.2.2. Nabelschnurblut (NB bzw. CB, <i>cord blood</i>)	14
2.3. Zellzahlbestimmung	15
2.4. Langzeitlagerung peripherer mononukleärer Zellen	15
2.5. Auftauen tiefgefrorener peripherer mononukleärer Zellen	16
2.6. Vitalitätsprüfung	16
2.7. Magnetische Separation von Zell-Subpopulationen	18
2.7.1. Positive Separation	19
2.7.1.1. Markierung der Zellen	19
2.7.1.2. Anreicherung der gewünschten Zellpopulation	19
2.7.2 Separation der hämatopoetischen Stammzellen	20
2.7.2.1. Markierung der Zellen	20
2.7.2.2. Anreicherung der hämatopoetischen Stammzellen	21
2.8. Amplifikation der hämatopoetischen Stammzellen	21
2.9. Generierung unreifer dendritischer Zellen	22
2.9.1. Differenzierung amplifizierter hämatopoetischer Stammzellen bzw. isolierter Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen	22
2.9.2. Differenzierung plasmazytoider dendritischer Zellen	22
2.10. Stimulation unreifer dendritischer Zellen	22
2.11. Kombinierte Zellkulturen	24
2.11.1. Allogene DC-T-Zellkultur (<i>Mixed lymphocyte reaction</i> (MLR))	24
2.11.2. T-Zellkulturen mit Überständen aus dendritischen Zellkulturen, welche aus Monozyten generiert wurden	25

2.11.3. T-Zellkulturen mit autologen plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC)	25
2.12. Durchflusszytometrische Phänotypisierung	26
2.12.1. Prinzip	26
2.12.2. Verwendete Antikörper	27
2.13. Messung der Proliferation mit Hilfe der ³H-Thymidin Einbaurate	28
2.14. Nachweis von Zytokinen	29
2.14.1. Enzyme-linked immunosorbant Assay (ELISA)	29
2.14.1.1. Nachweis von Interleukin-12p40 (IL-12p40)	30
2.14.1.2. Nachweis von Interferon α (IFN α)	31
2.14.2. <i>Cytometric Bead Array</i> (CBA)	32
2.15. Durchflusszytometrische Analyse phosphorylierter intrazellulärer Signalmoleküle	33
2.16. Molekulargenetischer Nachweis der Toll-like Rezeptoren	34
2.16.1. Die Polymerasekettenreaktion	34
2.16.2. RNA-Isolierung aus Monozyten, unreifen und gereiften dendritischen Zellen sowie aus T-Zellen	36
2.16.3. Reverse Transkription	38
2.16.4. Wahl der Primer	38
2.16.5. Optimierung der Toll-like Rezeptor-PCR im LightCycler™	39
2.16.6. Agarosegelelektrophorese	40
2.16.7. Quantitative spezifische Toll-like Rezeptor-PCR	42
2.16.8. Herstellung der Standards für die quantitative PCR	43
2.17. Molekulargenetischer Nachweis von Interleukin-27 und seines Rezeptors	44
3. ERGEBNISSE	46
3.1. Generierung unreifer dendritischer Zellen aus verschiedenen Zellpopulationen	46
3.1.1. Generierung unreifer dendritischer Zellen aus CD34+ hämatopoetischen Stammzellen	46
3.1.2. Generierung unreifer dendritischer Zellen aus Monozyten	48
3.1.3. Generierung unreifer plasmazytoider dendritischer Zellen	49
3.2. Phänotypische Charakterisierung stimulierter dendritischer Zellen	50
3.2.1. Stimulation unreifer dendritischer Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen	50
3.2.1.1. Expression von CD80	51
3.2.1.2. Expression von CD83	52
3.2.1.3. Expression von CD86 <i>all</i>	53
3.2.1.4. Expression von CD86 <i>high</i>	54
3.2.1.5. Expression von HLA-DR	55
3.2.2. Stimulation unreifer dendritischer Zellen aus Monozyten	57
3.2.2.1. Expression von CD80	58
3.2.2.2. Expression von CD83	60
3.2.2.3. Expression von CD86 <i>all</i>	62
3.2.2.4. Expression von CD86 <i>high</i>	64
3.2.2.5. Expression von HLA-DR	65
3.2.2.6. Expression von CD209	67
3.2.3. Stimulation unreifer plasmazytoider dendritischer Zellen	70
3.3. Funktionelle Eigenschaften stimulierter dendritischer Zellen	71
3.3.1. Nachweis inflammatorischer Zytokine stimulierter dendritischer Zellen aus neonatalen hämatopoetischen Stammzellen	72
3.3.1.1. Interleukin-1 β (IL-1 β)	73
3.3.1.2. Interleukin-6 (IL-6)	74
3.3.1.3. Interleukin-8 (IL-8)	75
3.3.1.4. Interleukin-10 (IL-10)	76
3.3.1.5. Interleukin-12p40 (IL-12p40)	77

3.3.1.6. Interleukin-12p70 (IL-12p70)	78
3.3.1.7. Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α)	79
3.3.2. Nachweis inflammatorischer Zytokine stimulierter dendritischer Zellen aus Monozyten	81
3.3.2.1. Interleukin-1 beta (IL-1 β)	82
3.3.2.2. Interleukin-6 (IL-6)	84
3.3.2.3. Interleukin-8 (IL-8)	85
3.3.2.4. Interleukin-10 (IL-10)	87
3.3.2.5. Interleukin-12p40 (IL-12p40)	89
3.3.2.6. Interleukin-12p70 (IL-12p70)	91
3.3.2.7. Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α)	92
3.3.3. Zytokinproduktion stimulierter plasmazytoider dendritischer Zellen	95
3.3.3.1. Interferon alpha (IFN α)	95
3.3.3.2. Inflammatorische Zytokine in plasmazytoiden DC	96
3.3.4. Signaltransduktion in stimulierten dendritischer Zellen	97
3.3.4.1. Phosphorylierung der p38 MAP Kinase	98
3.3.4.2. Phosphorylierung von ERK1/2	99
3.3.4.3. Phosphorylierung von STAT1	100
3.3.5. Kombinierte Zellkultur	101
3.3.5.1. Allo gene dendritische Zell : T-Zellkultur	101
3.3.5.2. T-Zellkulturen mit Überständen von autologen stimulierten dendritischen Zellkulturen aus Monozyten	104
3.3.5.3. T-Zellkulturen mit autologen plasmazytoiden dendritischen Zellen	106
3.4. Molekularbiologischer Nachweis der Toll-<i>like</i> Rezeptoren	107
3.4.1. Nachweis der Toll- <i>like</i> Rezeptor mRNA in Monozyten und unreifen dendritischen Zellen	108
3.4.2. Nachweis der Toll- <i>like</i> Rezeptor mRNA in stimulierten dendritischen Zellen	110
3.5. Molekularbiologischer Nachweis des Interleukins 27 (IL-27)	112
3.5.1. Expression der Interleukin-27 mRNA in dendritischen Zellen	113
3.5.2. Expression der Interleukin-27 Rezeptor mRNA in dendritischen Zellen und T-Zellen	114
4. DISKUSSION	115
5. ZUSAMMENFASSUNG	133
6. LITERATUR	135
6.1. Journalveröffentlichungen	135
6.2. Monografien	144
6.3. Quellen aus dem Internet	144
7. ANHANG	I
7.1. Abkürzungen	I
7.2. Datenübersicht	III
7.3. Accession numbers	XLIV

1. Einleitung

1.1. Neonatale Immunität

Im ersten Lebensjahr sterben weltweit jährlich etwa 1,8 Millionen Kinder an Infektionserkrankungen ¹, die WHO schätzt die Zahl sogar auf 7,1 Millionen ². Man versucht, dieser hohen Mortalität mit Impfungen zu begegnen. Die Voraussetzung dafür ist ein detailliertes Verständnis des neonatalen Immunsystems und seiner Fähigkeit, adäquat auf die verschiedensten Pathogene zu reagieren. Nach derzeitigem Wissensstand ist das neonatale Immunsystem durch bevorzugte T-Helfer (Th) 2 Immunantworten und schwache zytotoxische T-Zellantworten gekennzeichnet, so dass Neugeborene eine erhöhte Empfänglichkeit für intrazelluläre Pathogene aufweisen. Viele Studien konzentrierten sich auf die beeinträchtigten neonatalen T-Zellfunktionen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass *in vitro* unter angemessenen stimulatorischen Bedingungen neonatale T-Zellen Antworten generieren können, die denen adulter T-Zellen entsprechen ³⁻⁶. Das führte zu der Hypothese, dass die neonatalen Defekte auf eine entwicklungsabhängige Unreife Antigen-präsentierender Zellen (*antigen presenting cells*; APC) zurückzuführen sind ⁷.

1.2. Dendritische Zellen, Regulatoren der Immunantwort

Dendritische Zellen (DC, siehe *Abbildung 1.1*) sind die effektivsten Antigen-präsentierenden Zellen, die naive T-Zellen stimulieren können ⁸. Darüber hinaus sind DC dafür bekannt, dass sie die Schnittstelle zwischen der frühen, angeborenen Pathogenerkennung und einer angemessenen erworbenen Reaktion des Immunsystems bilden ⁹.

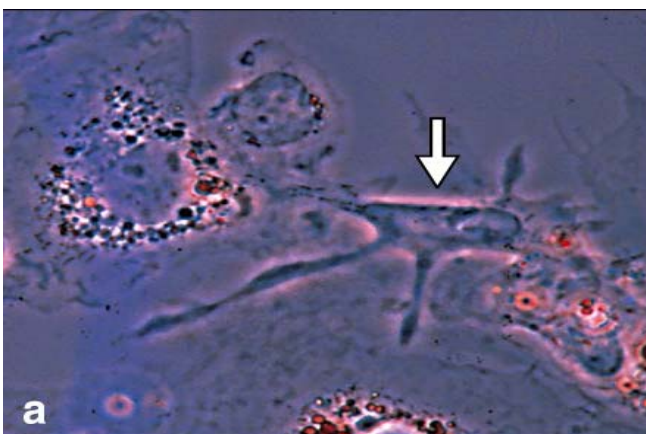


Abbildung 1.1: Dendritische Zelle. Fotografie aus Janeway et al. (2005).

1.2.1. Zell-Zellkontakt zwischen dendritischer Zelle und T-Zelle

Unreife dendritische Zellen (*immature DC*; imDC) kommen ubiquitär im Organismus vor und können Pathogene mittels Phagozytose oder Pinozytose aufnehmen. Während die DC auf dem Weg zu den Lymphknoten reifen, spalten sie die Pathogene intrazellulär in spezialisierten Kompartimenten proteolytisch in kleine Peptide (Antigene). Diese Antigene werden von Molekülen des MHC Komplexes (*major histocompatibility complex*; MHC) gebunden und an der Zelloberfläche präsentiert. Im Lymphknoten erkennen spezifische T-Lymphozyten mit Hilfe ihres T-Zellrezeptors das Peptid in den entsprechenden MHC Komplexen, werden aktiviert und differenzieren dabei zu unterschiedlichen T-Zellpopulationen. Die Qualität der T-Zelldifferenzierung ist abhängig von drei Signalen. Das erste Signal erhält die T-Zelle von der Antigen-spezifischen Erkennung durch den T-Zellrezeptor (*t-cell receptor*; TCR). Das zweite Signal wird durch die Antigen-unspezifische Expression der Kostimulatoren vermittelt. Dabei binden die Kostimulatoren der dendritischen Zelle wie zum Beispiel CD40 (*cluster of differentiation*; CD), CD80 und CD86 an CD40L respektive CD28 auf der T-Zelle. Das dritte Signal, die Zytokinausschüttung der DC, moduliert die physiologische Polarisierung der T-Zellen¹⁰ (Abb. 1.2).

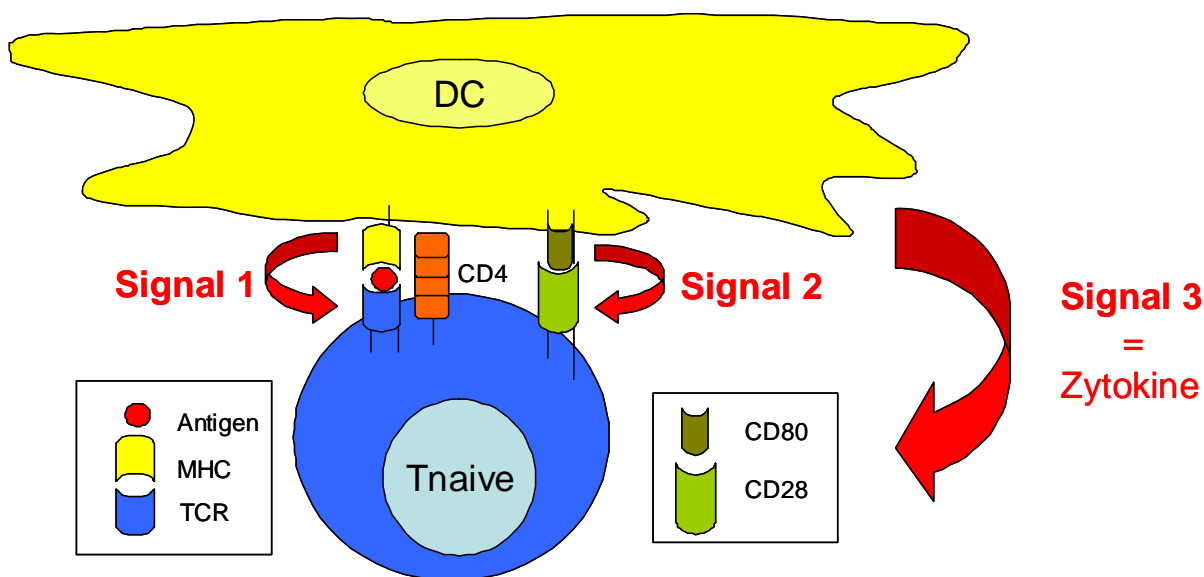


Abbildung 1.2: Antigenerkennung. Zell-Zell Kontakt zwischen dendritischer Zelle (DC) und naiver T-Zelle (Tnaive). MHC = *major histocompatibility complex*; TCR = *t cell receptor*.

1.2.2. Polarisierung CD4-positiver T-Zellen

Nach dem Antigenkontakt entwickelt sich die naive spezifische T-Zelle dem Signal 3 entsprechend in eine T-Helferzelle. Zwei verschiedene Zytokinexpressionsmuster CD4-positiver Effektorzellen wurden bereits 1986 vorgeschlagen¹¹. Th1 Zellen produzieren neben anderen Zytokinen und Chemokinen vor allem Interleukin (IL-) 2 und Interferon (IFN) γ und richten sich gegen intrazelluläre Pathogene wie Viren und Bakterien, wobei typischerweise phagozytierende Makrophagen und Neutrophile involviert sind. B-Zellen werden ebenfalls angeregt, wobei der Klassenwechsel von IgM zu opsonisierenden Antikörpern (IgG) induziert wird. Die Opsonisierung mit IgG Antikörpern veranlasst Makrophagen dazu, die opsonisierten Bakterien zu fressen. Th2 Zellen sekretieren vorrangig IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 und beeinflussen zweierlei: sie verstärken/die B-Zell-vermittelte humorale Immunität, indem sie den Klassenwechsel zu neutralisierenden Antikörpern (IgE, IgA) unterstützen und treiben die Verteidigung gegen große extrazelluläre Erreger wie Parasiten an¹². Die Th1 Zytokine IL-2 und IFN γ aktivieren Makrophagen, stimulieren die Produktion von Immunglobulin (Ig) G und unterstützen die Differenzierung und Aktivierung von CD8-positiven Zellen. Die Zytokine, die von Th2 Zellen produziert werden, haben unterschiedliche Aufgaben¹³. Interleukin-4 stimuliert die Proliferation von Th2 Zellen, während die Th1 Polarisation unterdrückt wird. Zusätzlich induziert IL-4 das Wechseln der Antikörper-Isotypen (*switching*) in B-Zellen hin zur IgE Sekretion. Interleukin-5 fördert die Produktion von Eosinophilen und deren Mobilisation aus dem Knochenmark und Interleukin-13 induziert die Synthese von Chemokinen und Adhäsionsmolekülen. Kürzlich wurden die Th17 Zellen als neue CD4-positive T-Zell Subpopulation charakterisiert¹⁴. Diese T-Zellen produzieren vornehmlich IL-17 mit potenten proinflammatorischen Eigenschaften. Die Th17 Zellen exprimieren den IL-23 Rezeptor, so dass IL-23 die Th17-vermittelten Immunantworten verstärkt und/oder stabilisiert. Interleukin-23 ist jedoch nicht unbedingt an der initialen Differenzierung der Th17 Zellen beteiligt. Dieser Prozess wird, zumindest im Mausmodell, durch IL-6 und *tumor growth factor* (TGF) β induziert¹⁵. Interleukin-17 führt zur Synthese inflammatorischer Chemokine (CXCL8 und CXCL1) und Zytokine (IL-1 und IL-6), fördert den schnellen Transfer von Neutrophilen zum Infektionsort und ist an der Pathogenese von Autoimmunerkrankungen beteiligt¹⁶.

Obwohl die verschiedenen Differenzierungsmechanismen und Interaktionen der T-Zell Subpopulationen besonders im humanen System längst nicht vollständig geklärt sind, mehren sich die Hinweise, dass die Th1-polarisierende Fähigkeit der dendritischen Zellen mit deren Fähigkeit einhergeht, IL-12 zu produzieren. Inwieweit welche Zytokine für die Differenzierung der naiven T-Zellen verantwortlich sind, ist – nach derzeitigem Kenntnisstand – in *Abbildung 1.3* zusammengefasst.

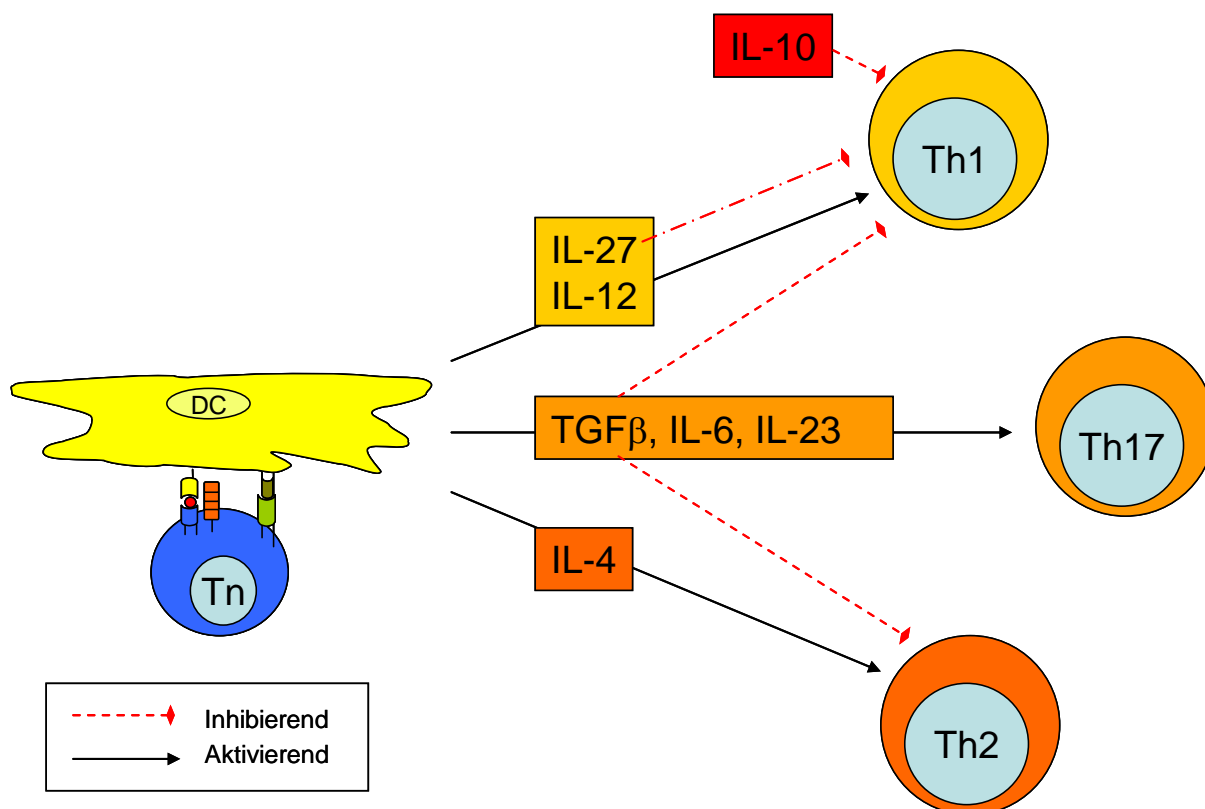


Abbildung 1.3: T-Zelldifferenzierung stark vereinfacht. Dargestellt sind aktivierend und inhibierend wirkende Zytokine, die nach T-Zellkontakt (naive T-Zelle; Tn) von der DC sekretiert werden.

1.2.3. Die Interleukin-12 Familie: IL-12, IL-23 und IL-27

Adulte unreife DC sekretieren IL-12 nach Stimulation durch verschiedene Pathogene (z.B. Bakterien, Viren, Pilze) oder deren Bestandteile (z.B. Lipopolysaccharide, DNA, ssRNA, dsRNA), wobei die IL-12 Konzentration abhängig vom Pathogentyp stark variieren kann¹⁷⁻¹⁹. Das von den DC produzierte IL-12 stimuliert die IFN γ Produktion in naiven T-Zellen, so dass es vorrangig die Induktion von Th1 Immunantworten unterstützt. Einige intrazelluläre Pathogene führen während der DC-Reifung zu einer starken IL-12 Produktion, so dass die Th1 Antwort andauert²⁰. Interleukin-12 bildet einen bioaktiven Heterodimer (p70) aus einer 35 kDA leichten Kette (p35) und aus einer 40kDA schweren Kette (p40)²¹. Der IL-12 Rezeptor (IL-12R) ist vor allem auf der Oberfläche Natürlicher Killerzellen (NK Zellen) und aktivierter T-Zellen vorhanden und besteht aus zwei Ketten, der IL-12R β 1 Kette und der signalgebenden IL-12R β 2 Kette, welche homolog zu gp130 des IL-6 Rezeptors ist²². IL-12p40 erkennt die IL-12R β 1 Kette, während IL-12p70 bzw. p35 die IL-12R β 2 Kette bindet. Die Bindung des IL-12R induziert die Phosphorylierung verschiedener Kinasen, die Dimerisierung und nukleare Translokation von Transkriptionsfaktoren und führt zu der Aktivierung IL-12-abhängiger Gene²³.

Kürzlich wurden zwei weitere Mitglieder der IL-12 Familie identifiziert: Interleukin-23 und Interleukin-27^{24,25}. Ähnlich IL-12 werden diese beiden Zytokine hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen und DC produziert. Interleukin-23 bildet aus der IL-12p40 Einheit und einer p19 Kette einen Heterodimer. Entsprechend besteht der IL-23 Rezeptor aus der IL-12R β 1 Kette, welche p40 bindet und einer gp130 ähnlichen Kette, dem IL-23R, der IL-23p19 erkennt²⁴. Interleukin-27 formiert sich aus einer IL-12p40 homologen Kette p28 und dem *Epstein-Barr virus-induced gene 3* (EBI3). Die funktionsfähige IL-27 Rezeptoreinheit besteht aus dem IL-27 Rezeptor WSX-1 (auch *t cell cytokine receptor*; TCCR genannt) und gp130 und wird auf einer Vielzahl von Immunzellen exprimiert, zu denen Mastzellen, Monozyten und dendritische Zellen gehören. Somit beeinflusst IL-27 nicht nur die adaptive Immunantwort sondern kann auch direkt auf die Zellen des angeborenen Immunsystems wirken^{25,26}. Der IL-27 Rezeptor ist mit dem IL-12R β 1 verwandt, beide Gene sind auf Chromosom 19 lokalisiert. Während gp130 von mehreren Zytokinen als Rezeptoruntereinheit genutzt wird (u.a. IL-6 und IL-11), ist bis *dato* für WSX-1 kein anderer Ligand identifiziert worden. Obwohl die Regulation der IL-27 Produktion bislang noch nicht detailliert untersucht wurde, scheint es, dass der Hauptimpuls für die Produktion von IL-27 von der Aktivierung der Toll-like Rezeptoren (TLR) ausgeht²⁷. Nach Stimulation der APC werden IL-27p28 und EBI3 schneller produziert als die IL-12p35 und IL-12p40 Untereinheiten. Hieraus wurde die Hypothese abgeleitet, dass IL-27 so lang sekretiert wird, bis genügend IL-12 vorliegt²⁵. Aufgrund der Ähnlichkeit zu dem Th1-induzierenden IL-12 und der Tatsache, dass T-Zellen ohne IL-27R kein IFN γ produzieren können, wurde vermutet, dass IL-27 ebenfalls die Th1 Differenzierung unterstützt²⁸. Darüber hinaus führt die Bindung von IL-27 an den IL-27 Rezeptor über die Aktivierung des *signal transducer and activator of transcription* (STAT) 1 zur Expression des zentralen Th1 Transkriptionsfaktors T-bet und des IL-12R β 2 auf der Oberfläche neu aktivierter T-Zellen, so dass diese für IL-12 sensibilisiert werden^{29,30}. Des Weiteren unterdrückt IL-27 die Expression des Haupttranskriptionsfaktors für Th2 Antworten GATA-3. Studien mit Mäusen weisen darauf hin, dass obwohl IL-27 *in vitro* die Th1 Polarisation unterstützt, die dominante Funktion *in vivo* negativ-regulatorischer Art ist^{31,32}. Überdies ist IL-27 auch ein potenter Unterdrücker autoimmunologischer Aktivität, welche durch IL-17-sekretierende Th17 Zellen vermittelt wird¹⁶. Die Frage nach den immunsupprimierenden Wirkungsmechanismen von IL-27 ist bislang nur unzureichend geklärt. Durch Unterdrücken der IL-2 Produktion beeinträchtigt IL-27 die Proliferation der T-Zellen³³. Ein weiteres Zytokin, welches von IL-27 direkt unterdrückt wird, ist das Interleukin-6, welches in Entzündungssituationen ein besonders starkes stimulatorisches Potential aufweist³⁴. Da IL-6 unter anderem die Th17 Differenzierung und die Expression des IL-23 Rezeptors induziert, spielt der Antagonismus von IL-6 eine zentrale Rolle in den immunsupprimierenden Effekten von IL-27. Interleukin-17 ist ein kritischer Faktor bei andauernden inflammatorischen Reaktionen, da es Chemokine und Zytokine an den Entzündungsherd rekrutiert. Die immunregulatorische Funktion von IL-27 könnte somit,

durch erhöhte IL-17 Konzentration ausgelöste, überschießende Immunantworten verhindern. Doch IL-27 wirkt nicht nur auf T-Zellen. Einige wenige Studien haben sich mit den Effekten von IL-27 auf andere IL-27R-tragende Zellen beschäftigt. Interleukin-27 induziert in aktivierten murinen B-Zellen eine erhöhte Proliferation und die STAT1- und T-bet-abhängige IgG2a Produktion³⁵. Humane NK Zellen exprimieren nach IL-27 Bindung T-bet und zeigen erhöhte Proliferation und IFN γ Produktion in Synergie mit IL-2 und IL-12²⁵. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass IL-27 die Makrophagenfunktionen unterdrückt³⁶. All diese Studien zeigen, dass IL-27 neben den adaptiven Immunantworten auch die unspezifischen Immunzellen stark beeinflusst.

Bezüglich neonataler DC scheint es unumstritten, dass die Produktion des bioaktiven IL-12p70 stark beeinträchtigt ist, wobei eine defiziente IL-12p35-Genexpression dafür verantwortlich gemacht wird³⁷. Nach Aktivierung des p35 Genes, wird in der p35 Promotorregion ein Nukleosom (nuc-2) selektiv und schnell umorganisiert. Diese Chromatinumgestaltung ist in neonatalen DC stark beeinträchtigt, kann aber durch Zugabe von IFN γ induziert werden³⁸. Die geringe IL-12 Produktivität Neugeborener ist dabei nicht auf die postnatale Phase beschränkt. Die Fähigkeit, IL-12 zu sekretieren steigt bis zum Erwachsenenalter proportional an, wobei jedoch zwölfjährige Kinder noch immer signifikant weniger IL-12 synthetisieren als Erwachsene³⁹. Im Gegensatz dazu sind neonatale DC in der Lage, nach Aktivierung mit TLR Liganden Interleukin-23 zu produzieren⁴⁰. Im Vergleich zu adulten DC sekretieren neonatale DC gleiche Konzentrationen von IL-23 als Antwort auf TLR2 und TLR3 Liganden, höhere Konzentrationen als die adulten DC nach Stimulation des TLR4 bzw. TLR8. Dabei induzieren/stabilisieren/verstärken die Bestandteile der Kulturüberstände der aktivierten DC die IL-17 Produktion in polyklonal stimulierten neonatalen T-Zellen. Inwieweit ein funktionierender IL-23/IL-17 Pfad im neonatalen Immunsystem den suboptimalen IL-12/IFN γ Weg kompensieren kann, ist bislang noch ungeklärt. Hinsichtlich der IL-27 Produktion neonataler Zellen, des dritten Mitglieds der IL-12 Familie, gibt es zum jetzigen Zeitpunkt noch keine Veröffentlichungen.

1.2.4. Toll-like Rezeptoren

Immunantworten bei Säugetieren können generell in zwei Kategorien eingeordnet werden, zum einen in die angeborene, unspezifische und zum anderen in die erworbene, spezifische Immunantwort. Das Hauptmerkmal der erworbenen Immunität ist die klonale Expansion spezifischer Lymphozyten (T- und B-Zellen), welche auf ein spezifisches Antigen reagieren und Grundlage des immunologischen Gedächtnisses sind. Das Antigen-spezifische Gedächtnis wird nicht auf die Nachkommen vererbt, so dass es bei jeder Generation, mit der Kindheit einhergehend, neu etabliert werden muss. Somit gibt es eine postnatale Verzögerung bis spezifische Immunantworten greifen können. Hier setzt die unspezifische (angeborene,

innate) Immunität ein, die hauptsächlich durch Makrophagen und dendritische Zellen vermittelt wird. Die unspezifische Immunität bildet die erste Verteidigungslinie des Körpers gegen Pathogeneinfall, bis die spezifischen Lymphozyten aktiviert werden. Die Zellen des angeborenen Immunsystems exprimieren Rezeptoren, die hoch konservierte und essenzielle Strukturen auf Mikroorganismen, sog. Pathogen-assoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*; PAMP), erkennen. Bei Säugetieren sind bislang etwa 100 dieser Rezeptoren identifiziert, die in der Gruppe der Pathogenerkennungsrezeptoren (*pattern recognition receptors*; PRR) zusammengefasst sind. Bis vor kurzem ging man davon aus, dass die beiden Immunantworten getrennt voneinander arbeiten, bis die sog. Toll-like Rezeptoren (TLR) entdeckt wurden, die das „*missing link*“ bilden. Toll-like Rezeptoren sind Typ I Transmembran-Proteine, deren Name sich von ihrer Homologie zu dem *Drosophila melanogaster* Protein Toll ableitet. Dieses Protein ist an der Embryonalentwicklung der Fruchtfliege beteiligt. Später fand man heraus, dass Toll in der Pathogenerkennung der Fruchtfliege eine große Rolle spielt, da es an der Identifizierung von Pilzen und grampositiven Bakterien beteiligt ist⁴¹. Die Insekten-Toll-ähnlichen Proteine, die dementsprechend genannten Toll-like Rezeptoren der Säugetiere, werden wegen ihrer Sequenzähnlichkeit in einer Gruppe zusammengefasst. Alle Mitglieder der Toll-Familie bestehen aus einer extrazellulären Leucin-reichen Domäne und einer intrazytoplasmatischen Domäne, welche Homologien mit der Interleukin-1 Rezeptorfamilie zeigt und deswegen als Toll/IL-1R (TIR) Domäne bezeichnet wird⁴². Bis heute sind zehn humane und 13 murine TLR charakterisiert. Die TLR werden vor allem in den Geweben und Zellen exprimiert, welche in immunologische Funktionen involviert sind, wie Milz und periphere Blut-Leukozyten oder die eine Exposition mit der Außenwelt haben, wie Haut, Lunge und der Gastrointestinaltrakt. Die Oberflächenexpression der TLR ist sehr gering, bis höchstens 500 Moleküle befinden sich auf unreifen DC⁴³. In der Expression der TLR gibt es eine ungewöhnlich hohe interindividuelle Variabilität, so dass die Reaktionen auf die unterschiedlichen Pathogene individuell stark variieren⁴⁴. Von den zehn humanen TLR sind die TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 intrazellulär, die restlichen TLR in der Zellmembran lokalisiert. Die Toll-like Rezeptoren können Homodimere und Heterodimere formen und eine effektive intrazelluläre Signalkaskade induzieren, welche sowohl unspezifische als auch spezifische Immunantworten auslösen kann^{45,46}. Unspezifische Immunantworten werden von DC induziert, indem nach TLR Aktivierung inflammatorische Zytokine (wie TNF α , IL-1 β und IL-6) und Chemokine (z.B. MIP-2) synthetisiert werden. Die gesteigerte Expression von MHC Klasse II Molekülen und Kostimulatoren (CD80 und CD86) führen zur Stimulation spezifischer T-Zellen⁴⁷. So bildet das „*missing link*“ eine Brücke zwischen angeborener und erworbener Immunantwort. Die Identifizierung der TLR Liganden ist bislang noch nicht abgeschlossen. Die bis heute bekannten Liganden der TLR sind in *Tabelle 1.1* zusammengefasst:

Tabelle 1.1 Humane TLR und TLR-Liganden. TLR, die vorrangig virale Strukturen erkennen, sind hellblau unterlegt, TLR, welche überwiegend bakterielle Produkte binden, sind orange gekennzeichnet.

TLR	Lokalisation	Ligandengruppe	Liganden
TLR1	Oberfläche	Korezeptor für TLR2 - s.u.	unbekannt
TLR2	Oberfläche	mikrobielle Moleküle von gramnegativen und grampositiven Bakterien, Mykoplasmen und Hefen	Zyosan, Zellwandbestandteil der Hefe
TLR3	intrazellulär, zellspezifisch	doppelsträngige RNA (dsRNA) und synthetische Analoga von dsRNA	Polyinosin-polycytidyl-Säure (Poly(I:C)), synth. dsRNA
TLR4	Oberfläche	gramnegative Lipopolysaccharide und Lipid A	LPS aus <i>E.coli</i>
TLR5	Oberfläche	Bestandteil von Flagellar-Filamenten von gramnegativen und grampositiven Bakterien	Flagellin
TLR6	Oberfläche	Mycoplasma Lipoproteine	Malp2
TLR7	endosomales Kompartiment	GU-reiche kurze Einzelstrang RNA (ssRNA) und kleine synthetische Moleküle und Nukleosidanaloga	ssRNA; Loxoribin, kleine synth. Moleküle, Zytostatika
TLR8	endosomales Kompartiment	GU-reiche kurze Einzelstrang RNA (ssRNA) und kleine synthetische Moleküle und Nukleosidanaloga	ssRNA; Resiquimod (R848), Zytostatika
TLR9	endosomales Kompartiment	unmethylierte C poly G (CpG) – Oligonukleotide (GTCGTT) mikrobielle DNA	CpG A; CpG B
TLR10	Oberfläche	unbekannt	
TLR1/TLR2	Oberfläche	Triazetylierte Lipoproteine	PamCys
TLR2/TLR6	Oberfläche	Diazetylierte Lipoproteine	Malp2

In der Regel sind mehrere TLR an der Erkennung des Pathogens und der Signalweiterleitung zur Auslösung der entsprechenden Immunantwort beteiligt ⁴⁸. Die *Abbildung 1.4* soll am Beispiel der grampositiven (Gram+) und gramnegativen (Gram-) Bakterien veranschaulichen, wie die Toll-like Rezeptoren anhand der Expression der extra- und intrazellulären TLR-Liganden zwischen unterschiedlichen Pathogenen unterscheiden können.

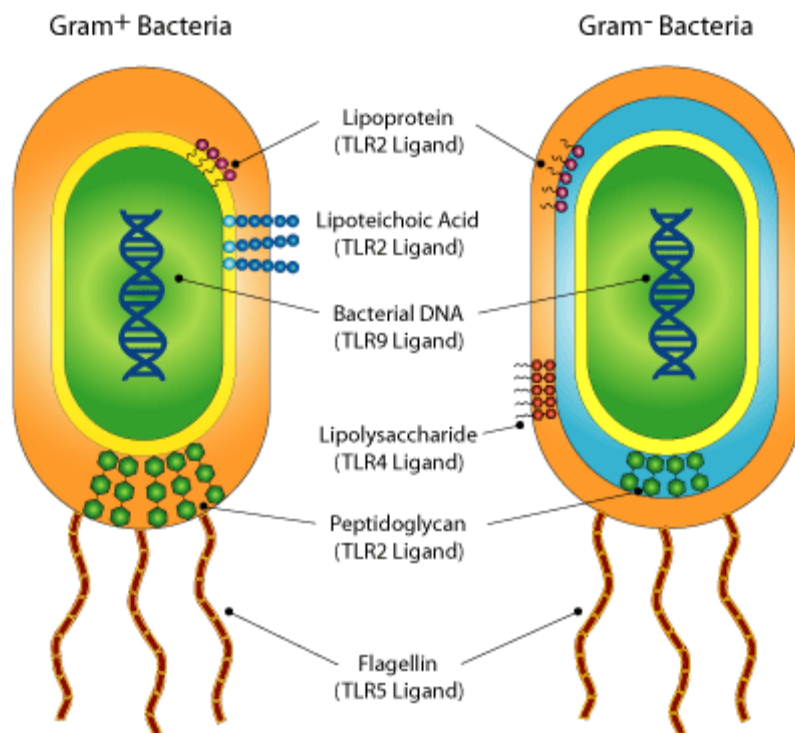


Abbildung 1.4: TLR-Liganden auf Bakterien. Dargestellt sind die TLR Liganden auf bzw. in grampositiven und gramnegativen Bakterien (http://www.invivogen.com/sscat.php?ID=9&ID_cat=2).

1.2.5. Signaltransduktion

Nach Pathogenkontakt dimerisiert der TLR und die Signalweiterleitung beginnt mit Bindung eines Adapterproteins. Bislang sind vier verschiedene TLR-spezifische Adapterproteine bekannt: MyD88 (*myeloid differentiation primary response gene 88*), TIRAP (*Toll-interleukin 1 receptor (TIR) domain-containing adapter protein*), TRAF (*TNF receptor-associated factor*) und TRAM (*TRIF related adaptor molecule*). Mit Ausnahme von TLR3 können alle TLR einen MyD88 abhängigen Signalweg induzieren. Er führt über die Phosphorylierung mehrerer Kinasen zur Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B (Nukleärer Faktor κ B). NF- κ B wandert in den Zellkern und führt zur Transkription verschiedener Effektorproteine des unspezifischen Immunsystems. Die MyD88 unabhängige Signalkaskade löst die Aktivierung des *interferon-regulating factor* (IRF-3) aus, wobei Interferon β und Interferon β -induzierbare Gene transkribiert werden und die Aktivierung von NF- κ B folgt. Die verschiedenen Toll-like Rezeptor Signalwege sind in *Tabelle 1.2* aufgeführt.

Tabelle 1.2: Signalwege der Toll-like Rezeptoren ⁴⁹⁻⁵².

TLR	Adapterprotein	Transkriptionsfaktor	Genexpression
TLR1/2, TLR2, TLR2/6	MyD88 TIRAP	NF-κB	proinflammatorische Zytokine
TLR3	TRIF	IRF3	Interferon β
TLR4	MyD88 TIRAP	NF-κB	proinflammatorische Zytokine
	TRIF TRAM	IRF3	Interferon β
TLR5, TLR7, TLR9	MyD88	NF-κB	proinflammatorische Zytokine

Zum gegenwärtigen Zeitpunkt (Stand 2007) sind die genauen Mechanismen der Signalwege innerhalb der DC noch ungeklärt. Möglicherweise folgt der Aktivierung über die Toll/IL-1R Domäne die Interaktion mit den Adaptermolekülen (Tab. 1.2) und die *IL-1 receptor associated kinase* (IRAK) wird durch Protein-Protein Wechselwirkung rekrutiert ⁵³. Anschließend wird IRAK autophosphoryliert, löst sich vom Rezeptorkomplex und bildet mit dem *tumor necrosis factor receptor-associated factor 6* (TRAF6) ein IRAK/TRAF6 Signalosom. Daraufhin folgen die Phosphorylierungen angeschlossener Kinasen, zu welchen die *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) p38 und die *extracellular signal-regulated protein kinases* (ERK) 1 und 2 gehören ^{54,55}. Die Aktivierung der MAPK ist für das Überleben, die Reifung und Zytokinsekretion der DC wichtig ^{56,57}. Nach Stimulation der TLR leiten die phosphorylierten MAPK die Signale weiter und unterstützen so die Aktivierung und Translokation der Transkriptionsfaktoren wie NF-κB ⁵⁸. Der mit der MAPK p38 assoziierte „Signaltransduktor und Aktivator der Transkription“ STAT 1 wird zusätzlich zur Reifung der DC benötigt ⁵⁹. Tyrosin-phosphoryliertes STAT 1 dimerisiert und wandert in den Nukleus, wo es die Transkription verschiedener Gene initiiert ⁶⁰.

1.2.6. Subpopulationen der dendritischen Zellen

Die Verbindung zwischen angeborener und erworbener Immunität vermitteln verschiedene DC Subpopulationen. Die Mehrheit humaner DC sind myeloider Herkunft. Diese DC Population stellt die wichtigsten APC, da sie deutlich effizienter in der Antigenaufnahme und –prozessierung sind, als andere Antigen-präsentierende Zellen ⁶¹. Darüber hinaus zeigen sie eine höhere Grundexpression der MHC Klasse II und kostimulatorischer Moleküle. Zusätzlich haben sie, verglichen mit anderen APC, ein außergewöhnliche hohes Potential, T-Zellen zu stimulieren ⁶². Zu den myeloiden DC gehören DC aus dem peripheren Blut, für die die Expression des Oberflächenmarkers CD11c charakteristisch ist, CD1a-positive

Langerhans Zellen in den Epithelien und dermale DC. Es wird geschätzt, dass die DC im peripheren Blut etwa 0,1% der weißen Blutkörperchen ausmachen. *In vitro* können die DC einerseits aus CD34-positiven hämatopoetischen Stammzellen (*hematopoietic stem cells*; HPC) generiert (HPC-DC) oder mit Hilfe von IL-4 und *granulocyte macrophage-colony stimulating factor* (GM-CSF) aus CD14-positiven Monozyten differenziert werden (mDC) ⁶³. Die Differenzierung der unreifen DC aus Monozyten kann anhand der Expression des DC-spezifischen *ICAM-3 grabbing nonintegrin* (DC-SIGN; CD209) kontrolliert werden, welches spezifisch auf mDC nachgewiesen werden kann ⁶⁴. CD209 spielt eine entscheidende Rolle bei der Migration der reifenden DC und bei der Etablierung des ersten Kontaktes zwischen DC und T-Zelle.

Neben den myeloiden DC gibt es eine CD11c-negative DC Population, die lymphoiden Ursprungs ist und ebenfalls die angeborene mit der adaptiven Immunantwort verbindet. Für diese sog. plasmazytoiden DC (pDC) konnte gezeigt werden, dass sie nach viralen Infektionen große Mengen an Typ I Interferonen produzieren, welche verschiedenste Effektorzellen aktivieren ⁶⁵: Typ I Interferone inhibieren die virale Replikation in infizierten Zellen, verstärken die zytotoxische Aktivität von Makrophagen und NK-Zellen, induzieren die Produktion von IL-15 und dadurch die Proliferation von zytotoxischen T-Zellen, unterstützen die Vitalität der T-Zellen und induzieren die Antikörperproduktion in B-Zellen. Viele Zelltypen können Typ I Interferone produzieren; pDC haben jedoch eine um 1000fach höhere Effizienz, nach Inkubation mit DNA- und RNA-Viren Typ I Interferone zu sezernieren ⁶⁶. Plasmazytoide DC sind somit trotz schwächerer phagozytischer Fähigkeiten effiziente APC und Induktoren Antigen-spezifischer Immunantworten ⁶¹. Nach Pathogenkontakt sezernieren sie auch andere Zytokine, wie IL-12, IL-10, IL-6 und TNF α ⁶⁷. Jedoch können pDC aufgrund der limitierten Expression des Sets von Pathogenerkennungs-Rezeptoren nicht auf alle mikrobiellen Antigene reagieren, so dass deren Plastizität stark beschränkt ist ⁶⁸. Innerhalb der TLR Familie exprimieren humane pDC die intrazellulären TLR7, TLR8 und TLR9, welche antivirale synthetische Moleküle und nichtmethylierte CpG Motife erkennen ⁶⁹.

1.3 Zielsetzung der Arbeit

Für die hohe Morbidität und Mortalität im ersten Lebensjahr wird die Unfähigkeit des neonatalen Immunsystems adäquat auf Infektionen zu reagieren, verantwortlich gemacht. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die neonatalen immunologischen Defizite auf eine entwicklungsabhängige Unreife der neonatalen dendritischen Zellen zurückzuführen sind. Die dendritischen Zellen, die im adulten Immunsystem die Schnittstelle zwischen der frühen, unspezifischen Pathogenerkennung und einer adäquaten Reaktion der spezifischen T-Zellen bilden, unterliegen im neonatalen Immunsystem einer Funktionseinschränkung. Diese äußert sich in einer reduzierten Expression von heterodimerem IL-12 und der daraufhin fehlenden Th1-vermittelten Immunantwort. Ein Großteil der Veröffentlichungen zu neonatalen dendritischen Zellen und deren Fähigkeiten sind aus dem Mausmodell hervorgegangen. Da es diverse Hinweise über die Differenzen in der Zellentwicklung bei humanen und murinen Neugeborenen gibt, sind Untersuchungen im humanen System dringend notwendig.

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsschrift sollten daher

- alle bislang identifizierten neonatalen Subpopulationen dendritischer Zellen phänotypisch und funktionell charakterisiert und deren Fähigkeit zur Polarisierung naiver T-Zellen untersucht und mit adulten dendritischen Zellen verglichen werden.
- Dazu sollten sowohl die Antigen-präsentierenden Oberflächenmoleküle und Kostimulatoren als auch das ganze Spektrum Pathogen-bindender Toll-like Rezeptoren auf bzw. in dendritischen Zellen detektiert werden.
- Die für die Polarisierung wichtigen Zytokinexpressionsmuster der stimulierten dendritischen Zellen, insbesondere das Muster der IL-12 Familie, sollten analysiert bzw. sollte hier die Differenzierung naiver T-Zellen in Kombinationszellkulturen nachgewiesen werden.
- Darüber hinaus sollte die Untersuchung der Phosphorylierung der Signalkinasen Aufschluss darüber geben, ob die Signaltransduktion in den neonatalen Zellen aberrant ist.

2. Material und Methoden

Alle Arbeitsschritte wurden, sofern nicht anders angegeben, unter sterilen Bedingungen an einer mikrobiologischen Sicherheitswerkbank [Laminar Flow, Klasse II, Serie `SE` Modell 51424/2, Microflow; Nunc GmbH, Wiesbaden] durchgeführt. Reaktionsgefäße [Eppendorf, Hamburg] und Pipettenspitzen [Sarstedt, Nümbrecht; Eppendorf, Hamburg und Starlab, Ahrensburg] wurden durch 30minütiges Autoklavieren bei 121°C sterilisiert. Lösungen, Wasch- und Kulturmedien waren steril. Das Einstellen von pH-Werten erfolgte mit Hilfe eines Mikroprozessor pH-mV-Meters, pH 526 SenTix 97T [Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim].

2.1. Untersuchungsmaterial

Dendritische Zellen können aufgrund ihrer geringen Zelldichte im peripheren Blut nicht direkt aus dem Neugeborenen isoliert werden. Aus diesem Grund wurden für die Versuche der vorliegenden Arbeit die DC aus humanen peripheren mononukleären Zellen (PBMC, *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) oder hämatopoetischen Stammzellen (HPC, *Hematopoietic Stem Cells*) des Nabelschnurblutes generiert. Die entscheidende Vergleichsgröße für alle Versuche war die Situation im adulten System. Die PBMC und HPC wurden sofort nach Blutentnahme separiert und entweder weiterverarbeitet oder in flüssigem Stickstoff gelagert.

Das Nabelschnurblut wurde nach komplikationsloser Schwangerschaft unter möglichst sterilen Bedingungen aus Plazenten gesunder termgeborener Kinder gewonnen, die mittels *sectio* zur Welt kamen. Adulte PBMC wurden nach freiwilliger Blutspende oder aus Leukapheresaten gesunder Erwachsener gewonnen.

2.2. Separation der peripheren mononukleären Zellen aus Vollblut

Zur Gerinnungshemmung wurde das Nabelschnurblut sofort nach der Entnahme mit 40 IE/ml, das adulte Vollblut mit 20 IE/ml Heparin-Natrium [Liquemin 5.000; Hoffman - La Roche, Grenzach-Whylen] gemischt und direkt weiterverarbeitet.

Vor Isolation der PBMC aus dem Vollblut wurde dieses zur Gewinnung autologen Plasmas 10 Minuten (min) bei 360xg und 20°C zentrifugiert [Megafuge 1.0RS; Heraeus, Hanau], die Plasmaphase abgenommen, 15 min bei 1500xg und 20°C zentrifugiert und die flüssige Phase bei -80°C tiefgefroren. Das dem Plasma entsprechende Volumen wurde mit Phosphatpufferter Kochsalzlösung (*phosphat-buffer salt solution*; PBS) [D-PBS; Gibco/Invitrogen,

Karlsruhe] ersetzt. Die Separation der PBMC erfolgte mit Hilfe der Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation. Ficoll [Lymphozyten-Separationsmedium; PAA, Pasching, Österreich] ist ein verzweigtes nicht-ionisches Saccharose-Polymer mit einem Molekulargewicht von etwa 400 kDA und einer Dichte von 1.077 g/ml bei Raumtemperatur (RT). Je nach Dichte der Zellen werden diese entweder die Ficoll-Phase passieren (Erythrozyten und Granulozyten) oder bleiben oberhalb der Ficoll-Phase (Lympho- und Monozyten), so dass es zu einer Anreicherung der PBMC an der Phasengrenze zwischen Ficoll und Plasma kommt.

In einem 50 ml Polypropylenröhrchen [Greiner, Frickenhausen] wurde eine dem Blutvolumen entsprechende Menge Ficoll vorgelegt und vorsichtig mit Vollblut überschichtet. Um Mischungen der beiden Phasen und somit Zellverluste zu vermeiden, mussten Blut und Ficoll die gleiche Temperatur von etwa 20°C haben. Das Zweiphasensystem wurde 30 min mit 400xg bei 20°C ohne Bremse zentrifugiert. Nach der Zentrifugation bildete die PBMC-Fraktion an der Phasengrenze zwischen Ficoll und Plasma eine weißliche Interbande. Diese wurde vorsichtig mit einer Pasteurpipette [John Poulten LTD, England] entnommen, ohne Ficoll mit zu pipettieren, da sich Ficoll negativ auf die Vitalität der Zellen auswirkt. Blut adulter Spender wurde wie in Kapitel 2.2.1., Nabelschnurblut wie in Kapitel 2.2.2. beschrieben, weiterverarbeitet.

2.2.1. Blut adulter Spender (AB)

Um mögliche Verunreinigungen der PBMC-Fraktion durch Ficoll oder Zelltrümmer zu entfernen, wurden die Zellen aus Blut adulter Spender zweimal gewaschen. Dazu wurden sie in 12-40 ml Waschmedium (WM) suspendiert und 10 min mit 360xg bei 4°C zentrifugiert. Anschließend wurde das Zellpellet in 1 ml des zur Weiterverarbeitung verwendeten Mediums homogen resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (Kapitel 2.3.).

Waschmedium (WM)

RPMI 1640 (1x), mit 2g/l NaHCO ₃ , ohne Glutamin [Biochrom, Berlin] mit		
2 mM	L-Glutamin	[Gibco Life Technologies, Eggenstein]
100 U/ml	Penicillin	[Biochrom, Berlin]
100 µg/ml	Streptomycin	[Biochrom, Berlin]

2.2.2. Nabelschnurblut (NB bzw. CB, *cord blood*)

Aufgrund der hohen Anzahl an Vorläufern der Erythrozyten in Nabelschnurblut ist die Interbande aus neonatalen peripheren mononukleären Zellen (PBMC) mit Erythroblasten angereichert. Um die Erythroblasten zu lysieren, wurde die Interbande in ein 50 ml Röhrchen überführt und 10 min mit 400xg bei RT zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml hypotonem

Ammoniumchlorid (ACK) - Lyse Puffer pro 10 ml Ausgangsblutvolumen resuspendiert und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss wurde diese Suspension mit 25 ml PBS sorgfältig vermischt und 15 min mit 300xg bei Raumtemperatur zentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden mit 30 ml PBS resuspendiert und erneut 15 min mit 300xg bei RT zentrifugiert. Nach diesem zweiten Waschschrift wurde das Zellpellet in 1 ml PBS aufgenommen und die Zahl der PBMC (Kap. 2.3.) bestimmt.

ACK Lyse Puffer für die Erythrozytenlyse in Nabelschnurblut

4,145 g NH₄Cl, [Merck, Darmstadt]

0,500 g KHCO₃, [Merck, Darmstadt]

17,6 mg Na₂EDTA, [Sigma, Deisenhofen] in 400 ml Aqua bidestillata lösen

- pH Wert mit 1N HCl [Roth, Karlsruhe] auf 7,2- 7,4 einstellen,
- mit Aqua bidestillata auf 500 ml auffüllen, durch einen 0,2 µm Filter [Nalgene; Nalge Europe, Neerijse, Belgien] sterilfiltriert; Lagerung bei Raumtemperatur

2.3. Zellzahlbestimmung

Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte mikroskopisch mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer. Diese Kammer ist mit einem eingravierten Zählnetz mit 4 x 16 Quadraten auf einem plan geschliffenen Glasboden versehen. Wird ein Deckglas auf die Kammer gebracht, entsteht über dem Netz ein definiertes Volumen von 0,4 µl.

Die in 1 ml suspendierten Zellen wurden in PBS 1:50 verdünnt. Ein Aliquot dieser Verdünnung wurde in die Kammer pipettiert und die Zellen in allen 4 x 16 Quadraten mit einem Mikroskop [Zeiss, Jena] bei 20facher Vergrößerung ausgezählt. Die Zellzahl in 1 ml unverdünnter Zellsuspension errechnet sich wie folgt:

$$\begin{aligned} & (\text{gezählte Zellen} / \text{Kammervolumen}) \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{Suspensionsvolumen} \\ & = (\text{gezählte Zellen} / 0,4\mu\text{l}) \times 50 \times 1000 = \text{Zellzahl/ml} \end{aligned}$$

Die Zählung unter dem Mikroskop erfolgte unsteril.

2.4. Langzeitlagerung peripherer mononukleärer Zellen

Durch die Lagerung der PBMC in flüssigem Stickstoff (N₂) ergab sich die Möglichkeit das Nabelschnurblut und adultes Blut, welches zu verschiedenen Zeiten gewonnen wurde, zeitgleich in einem Versuch einzusetzen. Hiermit waren identische Versuchsbedingungen für die Proben gegeben.

Die PBMC wurden nach der Zellzahlbestimmung 10 min mit 360xg bei 4°C zentrifugiert. Das Zellpellet wurde in 4°C kaltem Einfriermedium in einer Zelldichte von entweder 5×10^6 Zellen/ml oder bei sehr hohen Zellzahlen in einer Dichte von 10×10^6 Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 1,8 ml resuspendiert. Die Zellsuspension wurde in 1,8 ml Röhrchen [Cryotubes; Nunc GmbH, Wiesbaden] überführt und in vorgekühlte (4°C), mit Isopropanol [Isopropylalkohol; Hedinger, Stuttgart] gefüllte Einfrierbehälter [Freezing Container; Nalgene, Nalge Europe, Neerijse, Belgien] gestellt. Anschließend wurden die Behälter 24 Stunden (h) bei -80°C gelagert, wobei das Isopropanol gewährleistete, dass die Zellen mit einer Rate von 1°C/min abgekühlt wurden. Nach ca. 24 h wurden die Proben in die Flüssigphase eines Stickstoff-Tanks (-196°C) umgesetzt.

Einfriermedium

FCS [fetal calf serum; PAN Biotech GmbH, Aidenbach]
mit 10% Dimethylsulfoxid [DMSO; Serva, Heidelberg]

- Das FCS wurde vor Gebrauch 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert. Bei Hitze werden Moleküle des Komplement-Systems und das LPS-bindende Protein (LBP) zerstört. Das Serum wurde in Portionen à 50 ml aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren.

2.5. Auftauen tiefgefrorener peripherer mononukleärer Zellen

Die tiefgefrorenen Proben wurden in flüssigem Stickstoff schwimmend in ein vorgewärmtes (37°C) Wasserbad überführt und aufgetaut, bis nur noch ein kleiner Rest an Eis zu sehen war. Die Zellsuspension wurde sofort in ein 50 ml Polypropylenröhrchen [Greiner, Frickenhausen] mit ca. 15 ml vorgelegtem Waschmedium überführt, auf 40 ml mit WM aufgefüllt und 10 min mit 360xg bei RT zentrifugiert um Reste an DMSO und FCS zu entfernen. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen, das Pellet wurde sorgfältig in 1 ml WM resuspendiert. Anschließend wurde die Zellsuspension erneut mit WM auf 40 ml aufgefüllt und 10 min mit 360xg bei RT zentrifugiert. Schließlich wurden die Zellen in 1 ml des zur Weiterverarbeitung verwendeten Mediums homogen resuspendiert und die Zellzahl (Kap. 2.3) bestimmt.

2.6. Vitalitätsprüfung

Um den Anteil lebender bzw. toter Zellen nach dem Auftauen oder vor, während und nach einer Zellkultur zu ermitteln, wurden die Zellen mit Hilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Propidium-Jodid (PI) einer Vitalitätsprüfung unterzogen. Dieser nicht membrangängige Farbstoff interkaliert in doppelsträngige DNA. Dadurch werden membrangeschädigte

nekrotische Zellen selektiv angefärbt. Lebende Zellen mit intakter Membran werden nicht gefärbt.

Propidium-Jodid wurde in einem Polystyren RIA-Reagenzglas [Falcon; Becton Dickinson, Heidelberg] in einer Endkonzentration von 30 µg/ml mit 200 µl der zu untersuchenden Zellsuspension vermischt und 15 min in Dunkelheit bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Emission von PI im Durchflusszytometer [FACS, Fluorescence-Activated Cell Scanner, FACSCanto; Becton Dickinson] nach Anregung mit einem blauen Laser mit einer Wellenlänge von 488 nm und 15 mW Ausgangsleistung gemessen. Für jede Probe wurden 10.000 Ereignisse mit einem Fluoreszenz 2 (FL2) – Detektor erfasst. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der FACS Diva™ Software [Becton Dickinson].

Alle Arbeitsschritte nach der PI-Zugabe erfolgten unsteril.

Propidium Jodid (PI); [Sigma-Aldrich, Deisenhofen]

Stammlösung: 100 µg/ml in PBS; Lagerung bei 4°C im Dunkeln

2.7. Magnetische Separation von Zell-Subpopulationen

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden verschiedene Zellpopulationen untersucht. Einige Populationen wurden direkt aus den PBMC isoliert (T-Zellen, Monozyten und plasmazytoide DC), andere wiederum mussten durch Kultivierung generiert werden (myeloide DC). In jedem dieser Fälle wurden möglichst reine Zellpopulationen benötigt. Mit Hilfe eines „*Magnetic activated cell sorter*“ [MACS[®]; Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach] ist es möglich, bestimmte Zellen einerseits anzureichern oder andererseits aus einer Zellsuspension zu depletieren. Dabei werden die Zellen mit Antikörpern gegen verschiedene Oberflächenproteine inkubiert und mittels Anreicherungs- bzw. Depletionssäulen eluiert. An die Antikörper sind paramagnetische MACS[®] *MicroBeads* (Tab. 2.1) gekoppelt. Die physiologische Funktion der Zellen wird aufgrund der extrem kleinen Abmessungen der MACS[®] *MicroBeads* (50 nm Durchmesser) nicht beeinflusst. Die Säulen bestehen aus einer Matrix, welche die Zellen nicht beeinflusst. Zur Separation werden die Säulen einem starken Magnetfeld ausgesetzt, so dass Zellen mit gebundenen magnetischen *MicroBeads* an der Matrix zurückgehalten werden, wohingegen die unmarkierte Fraktion nicht gebunden wird. Zum Eluieren der gebundenen markierten Zellen wird die Säule aus dem magnetischen Feld entfernt. Die Reinheit der jeweiligen Fraktionen wurde durchflusszytometrisch (Kap. 2.12) überprüft

Für die verschiedenen Versuche wurden CD4-positive T-Zellen (Kap. 2.7.1.), CD14-positive Monozyten (Kap. 2.7.1.), CD34-positive hämatopoetische Stammzellen (Kap. 2.7.2.), CD45RA-positive naive T-Zellen und BDCA-2 positive plasmazytoide DC (Kap. 2.7.1.) angereichert. Die dafür verwendeten MACS[®] *MicroBeads* sind in *Tabelle 2.1* aufgelistet.

Tabelle 2.1: Verwendete MACS[®] Antikörper

MACS [®] MicroBead-Antikörper [Miltenyi Biotec]	Eingesetztes Volumen
CD4	20 µl / 1x10 ⁷ Zellen
CD14	20 µl / 1x10 ⁷ Zellen
Humanes Fc-blockierendes IgG	100 µl / 1x10 ⁸ Zellen
CD34	100 µl / 1x10 ⁸ Zellen
Microbead gekoppelte Anti-Hapten-Ak	100 µl / 1x10 ⁸ Zellen
CD45RA	20 µl / 1x10 ⁷ Zellen
BDCA-2	20 µl / 1x10 ⁷ Zellen

2.7.1. Positive Separation

2.7.1.1. Markierung der Zellen

Die PBMC wurden nach dem Auftauen (Kap. 2.5.) in 80 μl MACS[®]-Puffer I pro 10^7 Zellen aufgenommen. Anschließend wurden 20 μl *MicroBeads* pro 10^7 Zellen zugegeben, gut gemischt und 15 min bei 4°C inkubiert. Um ungebundene Antikörper zu entfernen, wurden dem Gemisch 5 ml MACS[®]-Puffer I hinzugefügt, suspendiert und 7 min mit 300xg bei 4°C gewaschen. Das Zellpellet wurde in 500 μl Puffer aufgenommen, resuspendiert und auf Eis gekühlt.

MACS[®]-Puffer I

- | | |
|-----------|--|
| PBS | [Gibco/Invitrogen, Karlsruhe] |
| 5 mM EDTA | [Serva, Heidelberg] |
| 0,5 % BSA | [Bovine Serum Albumine, BSA, Sigma-Aldrich, Deisenhofen] |
- Mit einem 0,2 μm Filter [Nalgene; Nalge Europe, Neerijse, Belgien] sterilfiltriert
 - Um Luftblasen in den Säulen zu vermeiden, wurde der Puffer im Ultraschallbad [Sonorex Super RK103H; Bandelin electronic, Berlin] 15 min entgast und sofort auf Eis gut gekühlt.

2.7.1.2. Anreicherung der gewünschten Zellpopulation

Für eine Ausgangsmenge über 6×10^7 Zellen wurde eine LS-Säule [Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach] in einen VarioMACS[®] [Miltenyi Biotec] eingesetzt. Bei einer Zellzahl von weniger als 6×10^7 wurde eine MS-Säule [Miltenyi Biotec] in einen MiniMACS[®] [Miltenyi Biotec] installiert. Um eine luftblasenfreie Füllung der Säule zu garantieren, wurde die LS-Säule mit 3.000 μl , die MS-Säule mit 500 μl MACS[®]-Puffer I gespült. Die markierte Zellsuspension wurde auf die vorbereitete Säule gegeben, dreimal mit je 3.000 μl Puffer (LS-Säule) bzw. dreimal mit je 500 μl (MS-Säule) gewaschen und das Eluat als Negativ-Fraktion in einem 15 ml Röhrchen [Falcon; Becton Dickinson, Heidelberg] aufgefangen. Die magnetisch markierten Zellen sollten dabei an die Matrix der Säule binden, während unmarkierte Zellen die Säule passieren. Anschließend wurde die Säule aus dem Magnet entfernt und auf ein neues Röhrchen, außerhalb des Magnetfeldes des MACS[®], gesetzt. Die Positiv-Fraktion wurde eluiert, indem die Säule zweimal mit je 5.000 μl Puffer (LS-Säule), bzw. zweimal mit je 1.000 μl Puffer (MS-Säule) unter Verwendung des Presskolbens (Taucher) gespült wurde. Die Zellen der gewünschten Fraktionen wurden 10 min mit 360xg bei 4°C zentrifugiert, in 1 ml des zur Weiterverarbeitung verwendeten Mediums homogen resuspendiert und die Zellzahlen bestimmt (Kap. 2.3.). Zur Überprüfung der Reinheit der Fraktionen und zur Qualitätskontrolle der verschiedenen Säulen wurde jeweils eine kleine

Probe der unbehandelten PBMC sowie der Positiv- und der Negativ-Fraktion durchflusszytometrisch mit fluorochrommarkierten Antikörpern gegen die jeweiligen Oberflächenmarker phänotypisiert (Kap. 2.12.). In den Fällen, in denen das Anreicherungsresultat nicht den Erwartungen entsprach, erfolgte ein zweiter Anreicherungsschritt, wobei eine neue Säule verwendet wurde.

2.7.2 Separation der hämatopoetischen Stammzellen

2.7.2.1. Markierung der Zellen

Für die Separation hämatopoetischer Stammzellen (HPC) standen keine mit *MicroBeads* gekoppelten Antikörper zur Verfügung. Die Markierung der HPC erfolgte mit Hilfe von *MicroBeads* [Miltenyi Biotec] die an Anti-Hapten-Ak gebunden waren. Aus diesem Grund mussten unspezifische Antikörper-Bindungsstellen auf der Zelloberfläche blockiert werden. Dazu wurden die PBMC zunächst nur mit Fc-Rezeptor-blockierendem humanem IgG [Miltenyi Biotec] inkubiert. Im Abstand von fünf Minuten wurden die spezifischen monoklonalen, hapten-gekoppelten Anti-CD34-Antikörper [Miltenyi Biotec] den PBMC zugesetzt und danach gut gemischt. Nach einer Inkubationsphase von 20 min bei 4°C, konnten ungebundene Immunglobuline durch Zugabe von 5 ml MACS[®]-Puffer II pro 10⁸ Zellen und anschließende Zentrifugation mit 300xg für 10 min bei 4°C entfernt werden. Das Pellet wurde in 400 µl MACS[®]-Puffer II pro 10⁸ Zellen resuspendiert. Da die verwendeten Anti-CD34-Antikörper an ihrer Fc-Domäne ein bestimmtes Hapten trugen, war es nun durch Zugabe von Microbead-gekoppelten Anti-Hapten-Antikörpern [Miltenyi Biotec] möglich, die CD34⁺ HPC selektiv zu markieren. Nach einer Inkubation von 20 min bei 4°C und einer Zentrifugation mit 300xg für 10 min bei 4°C wurde das Pellet in 500 µl MACS[®]-Puffer II resuspendiert.

MACS[®]-Puffer II

- | | |
|-----------|--|
| PBS | [Gibco/Invitrogen, Karlsruhe] |
| 2 mM EDTA | [Serva, Heidelberg] |
| 0,5 % BSA | [Bovine Serum Albumine, BSA, Sigma-Aldrich, Deisenhofen] |
- Mit einem 0,2 µm Filter [Nalgene] sterilfiltriert
 - Um Luftblasen in den Säulen zu vermeiden, wurde der Puffer im Ultraschallbad [Sonorex Super] 30 min entgast und sofort auf Eis gut gekühlt.

2.7.2.2. Anreicherung der hämatopoetischen Stammzellen

Die Anreicherung der HPC erfolgte mit Hilfe einer LS Säule (Kap. 2.7.1.2.). Um eine möglichst hohe Reinheit der CD34-positiven HPC zu erzielen, wurde der komplette Separationsschritt einmal wiederholt. Die CD34-negative Fraktion wurde nach Bestimmung der Zellzahl in flüssigem Stickstoff eingefroren (Kap. 2.4), wobei eine kleine Menge (ca. 3×10^5 Zellen) direkt zur Phänotypisierung weiterverwendet wurde (Kap. 2.12.).

Die CD34-positive Fraktion wurde nach Zentrifugation mit 360xg für 10 min bei RT in 1ml KM / 10% AB-Serum resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (Kap. 2.3). Auch von dieser Fraktion wurden ca. 3×10^5 Zellen zur Erfolgskontrolle aliquotiert und ebenso wie die CD34-negative Fraktion mit Hilfe des FACS durch Anfärbung eines anderen CD34 Epitops auf ihre Reinheit kontrolliert (Kap. 2.12.).

Kulturmedium (KM)

RPMI 1640 (1x), mit 2g/l NaHCO₃, ohne Glutamin [Biochrom, Berlin] mit
 2 mM L-Glutamin [Gibco Life Technologies, Eggenstein]
 100 U/ml Penicillin [Biochrom]
 100 µg/ml Streptomycin [Biochrom]
 1 mM Natrium-Pyruvat [Biochrom]
 1x Non Essential Amino Acids [Gibco Life Technologies]
 0.05 mM β-mercaptoethanol [Sigma-Aldrich, München]

AB-Serum [Pan Biotech GmbH, Aidenbach]

Das AB-Serum wurde vor Gebrauch 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert. Bei Hitze werden Moleküle des Komplement-Systems und das LPS-bindende Protein (LBP) zerstört. Das Serum wurde in Portionen à 50 ml aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren.

2.8. Amplifikation der hämatopoetischen Stammzellen

Die positiv separierten HPC (Kap. 2.7.2.) wurden in KM / 10% AB-Serum [Pan Biotech] à 1×10^5 Zellen pro Vertiefung („well“) in 24-well Flachbodenplatten [NUNCLON™, Delta; Nunc GmbH, Wiesbaden] ausplattiert und mit 50 ng/ml *fetal-liver-tyrosine-kinase 3-Ligand* (FLT3-L), 40 ng/ml *stem cell factor* (SCF) und 20 ng/ml Thrombopoetin (TPO) mit einem Endvolumen von 1 ml inkubiert [alle tebu-bio GmbH, Offenbach]. Die Inkubation erfolgte bei 37°C in einer Atmosphäre mit 5% CO₂. An jedem dritten Tag erfolgte die Teilung der Zellen, indem die Zellen im well resuspendiert wurden, 500 µl Zellsuspension pro well entnommen, in ein neues well gegeben und anschließend in jedes well 500 µl an frischem KM / 10% AB-Serum mit den oben genannten Zytokinmengen hinzu gegeben wurde. Abhängig vom Versuch und der dazu benötigten Zellzahl erfolgte die Amplifikation der HPC zwischen zwei und vier Wochen.

2.9. Generierung unreifer dendritischer Zellen

2.9.1. Differenzierung amplifizierter hämatopoetischer Stammzellen bzw. isolierter Monozyten zu unreifen dendritischen Zellen

Nach der Amplifikation der hämatopoetischen Stammzellen durch Kultivierung mit SCF, TPO und FLT3-L (Kap. 2.8.) wurden die Zellen geerntet und zweimal für 10 min mit 360xg bei RT zentrifugiert. Sowohl die amplifizierten HPC als auch die separierten Monozyten (Kap. 2.7.1.) wurden in Kulturmedium mit 10% ES-FCS resuspendiert und die Zellzahl bestimmt (Kap. 2.3). Je nach Zellzahl wurden die Zellen entweder à 1×10^5 Zellen pro *well* in 96-well Flachbodenplatten [NUNCLON™, Delta; Nunc GmbH, Wiesbaden] mit einem Gesamtvolumen von 200 µl oder à 1×10^6 Zellen pro *well* in 24-well Flachbodenplatten [NUNCLON™, Delta; Nunc GmbH] mit einem Gesamtvolumen von 1.000 µl inklusive 100 ng/ml *granulocyte-macrophage-colony-stimulating factor* (GM-CSF) und 20 ng/ml Interleukin-4 für 3-5 Tage stimuliert.

ES-FCS [Biochrom, Berlin]

Das ES-FCS wurde vor Gebrauch 30 min bei 56°C Hitze-inaktiviert. Bei Hitze werden Moleküle des Komplement-Systems und das LPS-bindende Protein (LBP) zerstört. Das Serum wurde in Portionen à 50 ml aliquotiert und bei -20°C tiefgefroren.

2.9.2. Differenzierung plasmazytoider dendritischer Zellen

Die plasmazytoiden dendritischen Zellen wurden nach Isolierung der PBMC (Kap. 2.2.) im MACS® mit *MicroBead*-gekoppelten BDCA-Antikörper isoliert (Kap. 2.7.1.). Die so separierten pDC sind mit 10 ng/ml Interleukin-3 [Strathmann Biotech, Hamburg] für 60 Stunden in 96-*well* Flachbodenplatten [Nunc] bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert worden.

2.10. Stimulation unreifer dendritischer Zellen

Unreife DC (Kap. 2.9.) wurden mit unterschiedlichen Pathogen-assoziierten Molekülen stimuliert (Tab. 2.2), dabei die Expression der Oberflächenmarker durchflusszytometrisch analysiert (Kap. 2.12.), die Phosphorylierung von Signalmolekülen durchflusszytometrisch nachgewiesen (Kap. 2.15.) und die Konzentrationen (pro-) inflammatorischer Zytokine in den Kulturüberständen bestimmt (Kap. 2.14.).

Für die Stimulation der unreifen dendritischen Zellen wurden den unreifen DC jeweils 100 µl in 96-*well* Platten bzw. 500 µl in 24-*well* Platten Kulturüberstand entnommen und bei -20°C zur Zytokinanalyse (Tag drei entspricht d3) eingefroren. In allen Ansätzen wurde 100 µl bzw. 500 µl frisches KM mit frischem GM-CSF und IL-4 (Kap. 2.9.) und den unterschiedlichen Stimuli (Tab. 2.2) ersetzt. Die unreifen DC wurden mit einzelnen Stimuli und mit Kombinationen verschiedener Stimuli aktiviert. Unstimulierte DC dienten als Kontrollen.

Tabelle 2.2: Die für die Stimulation der unreifen DC verwendeten Stimuli in den eingesetzten Konzentrationen. Es wurden diejenigen Konzentrationen eingesetzt, die vom jeweiligen Hersteller empfohlen wurden. Für LPS, CD40L, IFN γ und Cordycepin sind die Konzentrationen im Labor etabliert worden.

Stimulus	Hersteller	Eingesetzte Konzentration
Zymosan	InvivoGen [San Diego, CA, USA]	2 µg/ml
Poly(I:C)	InvivoGen	25 µg/ml
LPS	InvivoGen	10 µg/ml
Flagellin	InvivoGen	100 ng/ml
Malp2	InvivoGen	500 ng/ml
Loxoribin	InvivoGen	100 µM
R848	InvivoGen	5 µg/ml
ssRNA40	InvivoGen	5 µg/ml
CpG A (ODN 2216)	InvivoGen	1 µg/ml
CpG B (ODN 2006)	InvivoGen	1 µg/ml
Pam3Cys	InvivoGen	100 ng/ml
HKUEC	InvivoGen	108 Zellen
CD40L	Strathmann Biotec [Hamburg]	100 ng/ml
Interferon γ (IFNγ)	Strathmann Biotec	50-100 ng/ml
Cordycepin	Sigma-Aldrich	1 µg/ml
PMA	Sigma-Aldrich	50 ng/ml

2.11. Kombinierte Zellkulturen

2.11.1. Allogene DC-T-Zellkultur (*Mixed lymphocyte reaction (MLR)*)

Von gemischten Lymphozytenreaktionen (*mixed lymphocyte reaction*, MLR) spricht man, wenn Lymphozyten von unterschiedlichen Probanden (allogen) miteinander kultiviert werden. In der vorliegenden Arbeit wurden aufgereinigte adulte T-Lymphozyten mit allogenen adulten DC und allogenen neonatalen DC kokultiviert. Dazu wurden adulte und neonatale CD14 positive Zellen mit Hilfe des MACS[®] isoliert (Kap. 2.7.1.) und entsprechend Kapitel 2.9.1. in 96-*well*-Flachbodenplatten mit 200 µl Endvolumen zu unreifen DC differenziert. Nach drei Kulturtagen erfolgte ein Mediumwechsel, wobei je 100 µl Kulturüberstand entnommen und mit 100 µl KM/ES-FCS, GM-CSF und IL-4 ersetzt wurden. Am fünften Kulturtag wurden den unreifen DC je 100 µl Kulturüberstand entnommen und mit KM inklusive GM-CSF und IL-4 und folgenden TLR-Liganden ersetzt und für 48 h inkubiert: Zymosan, Poly(I:C), LPS, Flagellin, Malp2, Loxoribin, R848, CpG A, HKUEC oder Cordycepin und einer Kombination aller TLR-Liganden in den in Kapitel 2.10. *Tabelle 2.2* genannten Konzentrationen. Allogene T-Zellen (TZ) wurden mit Hilfe der *MicroBead*-gekoppelten Antikörper gegen CD4 und CD45RA separiert (Kap. 2.7.1.) und à 1x10⁵ Zellen pro *well* und 100 µl KM mit 10% AB-Serum in 96-*well*-Rundbodenplatten kultiviert. Die stimulierten DC wurden in KM gewaschen, gezählt (Kap. 2.3.) und à 1x10⁴ respektive à 1x10³ DC je 100 µl auf die TZ gegeben. Die Kokultur bei 37°C und 5% CO₂ wurde folgendermaßen angesetzt (*Tab. 2.3*):

Tabelle 2.3: Zusammensetzung der Kokultur. Endvolumen im *well* jeweils 200µl

100 µl mit 1x10 ⁵ AB-TZ	+ 100 µl KM+AB-Serum
100 µl mit 1x10 ⁵ AB-TZ	+ 100 µl mit 1x10 ⁴ AB unstimulierte DC
100 µl mit 1x10 ⁵ AB-TZ	+ 100 µl mit 1x10 ⁴ CB unstimulierte DC
100 µl mit 1x10 ⁵ AB-TZ	+ 100 µl mit 1x10 ⁴ AB stimulierte DC (je Stimulus ein <i>well</i>)
100 µl mit 1x10 ⁵ AB-TZ	+ 100 µl mit 1x10 ⁴ CB stimulierte DC (je Stimulus ein <i>well</i>)
100 µl mit 1x10 ⁵ AB-TZ	+ 100 µl mit 1x10 ³ AB unstimulierte DC
100 µl mit 1x10 ⁵ AB-TZ	+ 100 µl mit 1x10 ³ CB unstimulierte DC
100 µl mit 1x10 ⁵ AB-TZ	+ 100 µl mit 1x10 ³ AB stimulierte DC (je Stimulus ein <i>well</i>)
100 µl mit 1x10 ⁵ AB-TZ	+ 100 µl mit 1x10 ³ CB stimulierte DC (je Stimulus ein <i>well</i>)

Nach fünf Kulturtagen wurden 150 µl Kulturüberstand entnommen und für den Th1/Th2 CBA (Kap. 2.14.2.) bei -20°C asserviert. In jedes *well* wurden 100 µl KM mit 10% AB-Serum gegeben und mit 50µl WM inklusive ³H-Thymidin auf 200µl aufgefüllt. Die Messung der Proliferation erfolgte gemäß Kapitel 2.13.

2.11.2. T-Zellkulturen mit Überständen aus dendritischen Zellkulturen, welche aus Monozyten generiert wurden

Adulte und neonatale T-Zellen wurden nach Isolierung der PBMC (Kap. 2.2.) mit Hilfe des MACS[®]-Systems isoliert (Kap. 2.7.1.). Dabei wurden zuerst die CD4-positiven Zellen separiert und gewaschen. Dazu wurde das Eluat auf 14 ml mit Waschmedium aufgefüllt und 10 min bei 4°C mit 360xg zentrifugiert. Das Pellet wurde in 1 ml MACS[®] Puffer aufgenommen, die Zellen gezählt und mit einem zweiten *Microbead* gekoppelten Antikörper gegen den CD45RA Oberflächenmarker gefärbt. Das Eluat wurde erneut gewaschen (s.o.), in 1 ml Kulturmedium mit 10% autologem Plasma aufgenommen und gezählt (Kap. 2.3.). Die T-Zellen wurden à 2 x 10⁵ Zellen pro *well* in 96-Rundbodenplatten à 100µl ausplattiert. Die mDC wurden, wie in Kapitel 2.10. beschrieben, für 24 h stimuliert. Dabei wurden folgende Stimuli verwendet (Tab. 2.4); unstimulierte DC-Kulturüberstände dienten als Kontrollen.

Tab. 2.4: Verwendete Stimuli und die eingesetzten Konzentrationen

Stimulus	Eingesetzte Konzentration
LPS	10 µg/ml
Poly(I:C)	25 µg/ml
ssRNA	5 µg/ml
LPS + Poly(I:C)	10 µg/ml + 25 ng/ml
LPS + ssRNA	10 µg/ml + 5 µg/ml

Nach 24 h wurden den DC 100 µl des Kulturüberstandes entnommen und den ausplattierten T-Zellen zugefügt. Diese kombinierte Zellkultur wurde drei Tage bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert und 100 µl Kulturüberstand entnommen. Die Kulturüberstände wurden bis zur Verwendung im CBA (Kap. 2.14.2.) bei -20°C tiefgefroren.

2.11.3. T-Zellkulturen mit autologen plasmazytoiden dendritischen Zellen (pDC)

Bei der magnetischen Isolation der plasmazytoiden DC aus den PBMC wurde das Eluat, die sog. „Negativ-Fraktion“ aufgefangen und mit paramagnetisch gekoppelten Antikörpern gegen CD4 und CD45RA inkubiert und die CD4-positiven Zellen gemäß Kapitel 2.7.1. separiert. Die CD4/CD45RA-positiven Zellen wurden bis zur Verwendung bei -196°C gelagert (Kap. 2.4.) und am Kulturtag aufgetaut (Kap. 2.5.). Die mit IL-3 vorinkubierten (Kap. 2.9.2.) und mit CpG A und CpG B stimulierten pDC (Kap. 2.10.) wurden geerntet, gezählt (Kap. 2.3.) und jeweils 10.000 pDC mit jeweils 100.000 Zellen pro *well* CD4/CD45RA-positiver autologer T-Zellen in 96-*well* Rundbodenplatten mit einem Endvolumen von 200µl bei 37°C

und 5% CO₂ kokultiviert. Nach drei Kulturtagen wurden jeweils 100 µl Kulturüberstand entnommen und bis zur Verwendung im CBA (Kap. 2.14.2.) bei -20°C tiefgefroren.

2.12. Durchflusszytometrische Phänotypisierung

2.12.1. Prinzip

Anhand von Zelloberflächenproteinen, der sog. CD-Antigene („*cluster of differentiation*“), ist es möglich, verschiedene (Sub-)Populationen der PBMC zu unterscheiden. Mit Hilfe von monoklonalen Antikörpern, die mit Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert sind und an die Oberflächenmembranproteine binden, werden die Zellen markiert und den verschiedenen Populationen zugeordnet. Die fluorochrommarkierten Zellen, die sich in einem partikelfreien Flüssigkeitsstrom befinden, werden im Durchflusszytometer mit Hilfe von Luftdruck durch eine Messzelle geleitet, wo sie einen Laserstrahl passieren. Damit jeder Partikel einzeln durch den gleichen Punkt im Laserstrahl fließt, ist das Zuflussröhrchen vor dem Messpunkt konisch verengt.

Die zwei Laser des FACSCanto™ [Becton Dickinson, Heidelberg] erzeugen jeweils einen kohärenten Lichtstrahl definierter Wellenlängen mit einem Maximum von 488 nm (blauer Laser) respektive 633 nm (roter Laser). Das Streulicht und die Fluoreszenz der Zellen, die den Laserstrahl passieren, werden durch Linsen fokussiert, von Fotodetektoren gesammelt und in elektronische Signale konvertiert. Der „*Forward Scatter*“ (FSC) Detektor, der das von der Zelle in einem Winkel von 1° bis 2° von der Laserstrahlachse gestreute Licht (488 nm) sammelt, stellt ein Maß für die Zellgröße dar. Der „*Side Scatter*“ (SSC) Detektor detektiert das im rechten Winkel gestreute Licht (488 nm). Damit können unterschiedliche interne Brechungseigenschaften, die zum Beispiel durch die Granularität der Zellen bestimmt sind, bei Zellen gleicher Größe nachgewiesen werden. Durch optische Filter können die verschiedenen Fluoreszenzsignale getrennt und den jeweiligen Detektoren zugeleitet werden. Um gleichzeitig mehrere Antigene auf einer Zelle nachzuweisen, können bis zu sechs Fluorochrome unterschiedlicher Emissionsspektren kombiniert werden. Geringfügige Überlagerungen der Emissionsspektren der einzelnen Fluorochrome werden rechnerisch kompensiert. Dabei wird der Teil des Signals, der jener Überlappung entspricht, von dem anderen Fluoreszenzsignal subtrahiert.

Die Darstellung der in den Fotodetektoren ermittelten Signale erfolgt in Form von Histogrammen oder Punktdiagrammen („*Dot Plots*“). Dabei dienen die eindimensionalen Histogramme zur quantitativen Darstellung, indem die logarithmisch verstärkte Fluoreszenzintensität gegen die Zellzahl aufgetragen wird. In zweidimensionalen *Dot Plots*

können zwei Parameter pro Zelle dargestellt werden. Jede Zelle wird dabei in Abhängigkeit von der Signalstärke der erfassten Parameter in einem Koordinatensystem dargestellt.

Vor der Färbung wurden die zu untersuchenden Zellen gewaschen. Dazu wurden die Zellen in 1 ml PBS [Gibco/Invitrogen, Karlsruhe] resuspendiert, auf 12 ml mit PBS aufgefüllt und 7 min mit 360xg bei 4°C zentrifugiert. Zur Blockierung von Fc-Rezeptoren und unspezifischer Bindungsstellen auf der Zelloberfläche wurde das Pellet in 50 µl PBS resuspendiert, mit 50 µl Polyglobin N [Humanes Immunglobulin G; 0,05 g/ml, 1:10 in PBS verdünnt; Bayer, Leverkusen] vermischt und 10 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. 100 µl Zellsuspension wurden in FACS-Röhrchen [Becton Dickinson] überführt und mit den jeweiligen Antikörpern (Kap. 2.12.2) gefärbt, indem die Antikörper 15-20 min bei RT in Dunkelheit inkubiert wurden. Anschließend wurden die Ansätze zweimal mit je 2 ml PBS mit 0,05% BSA [Bovine Serum Albumine, Sigma-Aldrich, Deisenhofen] und 0,025% NaN₃ [Natriumazid; Merck, Darmstadt] gemischt und je 10 min mit 360xg bei 4°C zentrifugiert. Zur Fixierung wurde das Zellpellet in 200-300 µl PBS mit 0,5% Formaldehydlösung resuspendiert und maximal 72 h bei 4°C bis zur Analyse am FACS gelagert. Alle Arbeitsschritte nach Zugabe der Antikörper erfolgten unsteril.

Für jede Probe wurden 10.000-30.000 Ereignisse erfasst. Um Zelltrümmer weitgehend von der Analyse auszuschließen, wurde ein Schwellenwert (*Threshold*) im *Forward Scatter* gesetzt. Alle Streulichtsignale wurden linear, alle Fluoreszenzsignale logarithmisch verstärkt, wobei die angelegte Spannung je nach Versuch variierte.

Die Auswertung der Versuche erfolgte mit Hilfe der FACSDiva™ Software [Becton Dickinson]. Im Streulichtdiagramm war es möglich, diejenigen Regionen einzugrenzen, die jeweils für die Analyse wichtig waren. Dabei wurden je nach Fragestellung, Regionen, sog. „*gates*“, um die jeweiligen Populationen gelegt und ungewünschte Populationen von der Analyse ausgeschlossen. Die durchflusszytometrische Messung erfolgte unsteril.

Formaldehyd-Lösung (0,5%)

5 ml	Roti®-Histofix, Formaldehydlösung, 4,5% [Roth, Karlsruhe]
40 ml PBS	[Gibco/Invitrogen, Karlsruhe]

2.12.2. Verwendete Antikörper

Für die Untersuchung der Reifung der dendritischen Zellen sind folgende Antikörper genutzt und à 5 µl pro 1-5x10⁵ Zellen eingesetzt worden [Becton Dickinson]: CD11c, CD14, CD34, CD40, CD80, CD83, CD86, CD209 und HLA-DR. Die Antikörper waren, je nach Versuchsaufbau, mit folgenden Fluorochromen konjugiert: FITC, PE, PerCp, APC, APC-Cy7, PE-Cy7, Alexa Fluor 647 und Alexa Fluor 488.

Die Oberflächenmarker CD11c, CD14, CD34 und CD209 dienten der Identifizierung der einzelnen Zellpopulationen: Hämatopoetische Stammzellen exprimieren CD34, Monozyten

werden anhand des Oberflächenproteins CD14 erkannt und CD11c hilft bei der Erkennung von Zellen der myeloiden Linie. CD209 (DC-SIGN) wird ausschließlich von dendritischen Zellen exprimiert, so dass CD209 in der vorliegenden Arbeit genutzt wurde, um den Erfolg der Differenzierung der DC aus Monozyten zu bestätigen.

Zur Untersuchung der Reifestadien der dendritischen Zellen wurden Antikörper verwendet, die Kostimulatoren bzw. den Antigen-präsentierenden Komplex (HLA-DR) erkennen: Die Interaktion von CD40 auf APC mit dem Liganden CD40L auf aktivierten T-Zellen unterstützt die Zellaktivierung, die Entwicklung von Gedächtniszellen, sowie die T-Zell-Polarisierung. CD80 und CD86 dienen der Vermittlung kostimulatorischer Signale an die T-Zellen, indem sie CD28 bzw. CTLA-4 binden. Um den Reifegrad der dendritischen Zellen festzustellen, wurde zusätzlich die Expression von CD83 untersucht. CD83 ist ein Adhäsionsmolekül, welches auf reifen DC vorkommt und dessen Rezeptor von aktivierten T-Zellen exprimiert wird.

2.13. Messung der Proliferation mit Hilfe der ^3H -Thymidin

Einbaurate

Eine Möglichkeit, die Zellwachstumsrate einer *in vitro* Zellkultur zu analysieren, ist die Messung der ^3H -Thymidin-Einbaurate. Dazu wurde den Kulturen nach den jeweiligen Inkubationszeiten $0,5 \mu\text{Ci } ^3\text{H}$ -Thymidin [Amersham, Braunschweig] pro *well* zugegeben und bei 37°C und einer Atmosphäre mit $5\% \text{CO}_2$ inkubiert. Tritium (^3H), ein niederenergetischer Beta-Strahler, wird, gekoppelt an Thymidin, während der S-Phase des Zellzyklus in die DNA-Tochterstränge eingebaut. Mit Hilfe eines Flüssigszintillations-Messgerätes ("*Beta-Counter*") können so proliferierende Zellen nachgewiesen werden.

Nach 16 h Inkubationsdauer wurde die Proliferation durch Tiefrieren bei -20°C abgestoppt, die Platten nachfolgend wieder aufgetaut und die Kultur unter Verwendung eines Erntegerätes [„Basic 96“; TomTec, N.J., USA] auf einen Filter [Printed Filtermat A; Wallac, Turku, Finnland] übertragen. Nach Trocknung des Filters wurde dieser in einem mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit [Roth, Karlsruhe] gefülltem Plastikbeutel [Wallac] verschweißt und im *Beta-Counter* [Wallac] gemessen. Die Messung erfolgte in „*Counts per minutes*“ (cpm). Alle Arbeitsschritte nach der Inkubation mit ^3H -Thymidin erfolgten unsteril.

2.14. Nachweis von Zytokinen

Zu verschiedenen Zeitpunkten der einzelnen Zellkulturen wurden Kulturüberstände abgenommen, bei -20°C tiefgefroren und nach dem Auftauen auf die Konzentration unterschiedlicher Zytokine hin untersucht. Dazu wurden zwei Methoden benutzt, für den Nachweis von Interleukin-(IL-)12p40 und den Nachweis von Interferon α (IFN α) der *Enzyme-linked immunosorbant Assay* [ELISA], für den Nachweis von IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70, Interferon (IFN) γ und Tumor Nekrose Faktor (TNF) α der *Cytometric Bead Array* [CBA; Becton Dickinson].

2.14.1. Enzyme-linked immunosorbant Assay (ELISA)

Die verwendeten ELISA Sets basieren auf der Methode eines Sandwich-ELISA (Abb. 2.1).

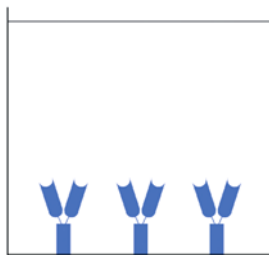
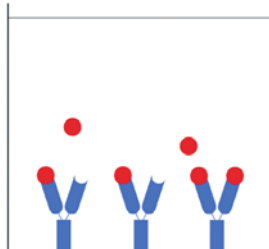
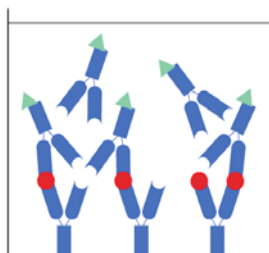


Abbildung 2.1 Methode eines Sandwich-ELISA.

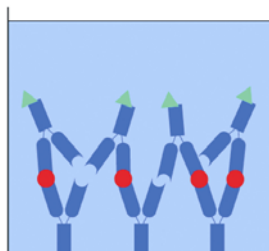
Bei einem Sandwich-ELISA binden hoch aufgereinigte, antigen-spezifische (in diesem Fall Zytokin spezifische) *capture* Antikörper nicht kovalent aufgrund von hydrophobischen Interaktionen an der Oberfläche von Mikrotiterplatten.



Das Zytokin aus den Kulturüberständen bindet an die immobilisierten *capture* Antikörper.



Nachdem ungebundenes Material heraus gewaschen ist, bindet ein zweiter Antigen-spezifischer Biotin-konjugierter Detektions-Antikörper an das gebundene Zytokin. Anschließend wird Avidin zugegeben, welches mit hoher Affinität an Biotin bindet und mit einer Meerrettich-Peroxidase gekoppelt ist.



Nach Zugabe von Substrat erfolgt eine Farbreaktion, welche spektrofotometrisch am ELISA-Messgerät bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen werden kann. Durch eine Verdünnungsreihe einer Standardprobe kann eine Standardkurve generiert und die Konzentration des Zytokins in der Probe anhand der korrespondierenden OD-Werten der Standardkurve berechnet werden.

2.14.1.1. Nachweis von Interleukin-12p40 (IL-12p40)

Für den IL-12p40 ELISA [OpteiA™ ELISA Set, Becton Dickinson, Heidelberg] wurde der lyophilisierte IL-12p40-Standard (im Kit enthalten) auf RT gebracht und in 1 ml deionisiertem Wasser gelöst (Standardstammlösung). Nach 15 min wurde der Standard aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren. Anschließend wurde eine Multititerplatte (96 *well*, Maxisorp; Nunc) mit dem *capture* Antikörper beschichtet. Dazu wurden pro Platte 48 μl *capture* Antikörper mit 11,95 ml *Coating Buffer* verdünnt (1:250) und von dieser Lösung jeweils 100 μl in jedes *well* pipettiert, die Platte versiegelt und bei 4°C über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen, abgesaugt und unspezifische Bindungsstellen mit 200 μl *Assay Diluent* pro *well* blockiert. Die versiegelte Platte wurde 1 h bei RT inkubiert. Die Platte wurde dreimal mit Waschpuffer gewaschen und abgesaugt. Für die Standardverdünnung wurde als Topstandard eine Standardverdünnung von 4000 pg/ml in *Assay Diluent* angesetzt und in \log_2 Schritten bis zu einer Konzentration von 7,8 pg/ml verdünnt. Von den Standardverdünnungen und von jeder Probe wurden 100 μl in jedes *well* pipettiert. Der Standard sowie die Kontrollen (Kulturmedium und *Assay Diluent*) wurden jeweils dreifach bestimmt. Die versiegelte Platte wurde 2 h bei RT inkubiert, fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und abgesaugt. Maximal 15 min vor Verwendung wurde 48 μl Detektions-Antikörper in 11,9 ml *Assay Diluent* verdünnt (1:250) und mit 48 μl Enzym gemischt. Die Detektionslösung wurde à 100 μl in die *well* gegeben, die Platte versiegelt und für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Platte siebenmal gewaschen, wobei bei jedem Waschgang der Waschpuffer 30 s bis 1 min im *well* belassen wurde. Nach dem Absaugen der Platte wurden für die Substratlösung 5,5 ml TMB mit 5,5 ml Hydrogenperoxidlösung gemischt, à 100 μl in die *well* verteilt und 15 min im Dunkeln inkubiert. Zum Abstoppen der Enzymreaktion wurden je 50 μl Stopp Lösung in die *well* pipettiert und innerhalb von 30 min bei 450 nm im Fotometer [MRXII; Dynex Technologies GmbH, Berlin] gemessen. Die Auswertung der Daten erfolgte mit der *Revelation Software* [London, GB]. Die Durchführung des ELISA erfolgte unsteril.

Coating Buffer:	0,1M Sodium Carbonate pH9,5: 4,2g NaHCO_3 + 1,78g Na_2CO_3 in 500ml Aqua lösen <ul style="list-style-type: none"> pH auf 9,5 einstellen
Waschpuffer:	500ml PBS +0,25ml Tween 20 [Merck, Darmstadt] (= 0,05%)
Stopp Lösung:	2 N H_2SO_4 = 1 M; MG: 98,08 40% H_2SO_4 heißt 400 ml 100% H_2SO_4 pro l Dichte: 1,3 kg/l 1l 40% H_2SO_4 enthält $40\% \times 1,3 = 520\text{g } \text{H}_2\text{SO}_4$ 520g H_2SO_4 = 5,3 M = 10,6 N <ul style="list-style-type: none"> Für eine 2 N H_2SO_4 wurde die 40% Lösung im Verhältnis 1:5,3 mit Aqua dest. verdünnt

2.14.1.2. Nachweis von Interferon α (IFN α)

Mit Hilfe eines kommerziell erhältlichen ELISA [Human Interferon Alpha (Hu-IFN- α) ELISA Kit, PBL Biomedical Laboratories, New Jersey, USA] wurde die Produktion von IFN α in adulten und neonatalen plasmazytoiden DC nachgewiesen.

Zu Beginn des ELISA wurde der mitgelieferte Standard in *Dilution Buffer* [Flasche C, PBL] verdünnt. Dafür wurden 250 μ l Standard (10.000 pg/ml) mit 250 μ l *Dilution Buffer* vermischt (5.000 pg/ml). Aus dieser Verdünnung wurden wiederum 250 μ l entnommen und mit 250 μ l *Dilution Buffer* vermischt (2.500 pg/ml). Auf diese Weise wurde eine Verdünnungsreihe bis 156 pg/ml angesetzt. In die bereits mit *capture* Antikörper beschichtete Platte wurden je zwei *well* mit 100 μ l der jeweiligen Standardverdünnung belegt. In die übrigen *well* wurden je 100 μ l der tiefgefrorenen Kulturüberstände der stimulierten pDC pipettiert. Die Platte wurde versiegelt und eine Stunde bei 24°C in einer geschlossenen Kammer inkubiert. Die Platte wurde einmal mit Waschpuffer gewaschen, d.h. mit 200 μ l Waschpuffer befüllt und abgesaugt. Der Detektionsantikörper wurde in Dilution Buffer 1:150 verdünnt und à 100 μ l in die Platte gegeben. Die Platte wurde erneut versiegelt und eine Stunde bei 24°C in einer geschlossenen Kammer inkubiert. Das HRP Konjugat [vial E, PBL] wurde mit 105 μ l HRP *Conjugate Diluent* [Flasche F, PBL] gelöst und 1:10 mit HRP *Conjugate Diluent* weiter verdünnt. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (s.o.) wurde die Platte mit 100 μ l pro *well* der HRP-Konjugat Verdünnung befüllt, versiegelt und eine Stunde bei 24°C inkubiert. Die Platte wurde viermal gewaschen und je 100 μ l auf RT vorgewärmte TMB *Substrate Solution* [Flasche G, PBL] in jedes *well* pipettiert. Nach 15-minütiger Inkubation im Dunkeln bei RT wurde 100 μ l *Stop Solution* [Flasche H, PBL] dazugegeben und innerhalb von 5 min im Fotometer bei einer Wellenlänge von 450 nm gemessen.

Die Auswertung der Daten erfolgte mit der *Revelation Software*. Die Durchführung des ELISA erfolgte unsteril.

Waschpuffer: 50 ml des *Wash Solution Concentrate* (Flasche A) mit 1.000 ml Aqua dest. verdünnen
Bei 2-8°C lagern, immer gekühlt eingesetzt.

2.14.2. Cytometric Bead Array (CBA)

Das CBA System basiert auf der Detektion unterschiedlich stark fluoreszierender Partikel „beads“, welche an spezifische Antikörper gekoppelt sind. Die *bead* Populationen sind stabil mit einem fluoreszierenden Farbstoff konjugiert, der bei einer Wellenlänge von 650 nm emittiert und im dritten Fluoreszenzkanal aufgrund der mittleren Fluoreszenzintensität (MFI) aufgelöst wird. Analog zum ELISA (Kap. 2.14.1) binden die Antikörper-gekoppelten *Capture Beads* die löslichen Substanzen in Serum, Plasma, Tränenflüssigkeit oder Kulturüberständen mit hoher Affinität. Nach Zugabe eines PE-gekoppelten Detektionsantikörpers, der mit der Substanz und den *Capture Bead* Antikörper einen Komplex bildet, wird die Intensität von PE im Durchflusszytometer gemessen. Mit Hilfe einer Standardverdünnung bekannter Konzentrationen kann die Substanzkonzentration genau quantifiziert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden zu unterschiedlichen Kultivierungszeitpunkten Zellkulturüberstände entnommen und auf Zytokinkonzentrationen untersucht. Dabei wurden zwei verschiedene CBA genutzt: der humane Th1/Th2 Zytokin CBA mit dem IFN γ , TNF α , IL-10, IL-5, IL-4 und IL-2 nachgewiesen werden kann und der humane Inflammations CBA, der zur Detektion der inflammatorischen Zytokine IL-12p70, TNF α , IL-10, IL-6 IL-1 β und IL-8 dient. Beide CBA wurden nach folgendem Protokoll eingesetzt.

Der lyophilisierte Standard wurde in *Assay Diluent* gelöst und 15 min äquilibriert. Anschließend wurde mit *Assay Diluent* eine Standardverdünnung von 5.000 pg/ml hergestellt und in log₂ Schritten bis zu 5 pg/ml weiter verdünnt. Von allen *Cytokine Capture Beads* wurden jeweils 5 μ l pro test (d.h. pro Standard/Probe/Kontrollen) zusammen pipettiert. Die gemischten *Beads* wurden resuspendiert und à 25 μ l in FACS-Röhrchen gegeben. Pro Röhrchen wurden 25 μ l PE *Detection Reagent* zugefügt und jeweils 25 μ l verdünnter Standard bzw. Probe hinzugefügt. Die Ansätze wurden 24 h bei 4°C im Dunkeln inkubiert. Die Röhrchen wurden mit 1 ml *Wash Buffer* gewaschen, der Überstand vorsichtig abgesaugt und mit 200 μ l *Wash Buffer* aufgefüllt. Die Instrumenteneinstellungen am FACS erfolgten mit *Cytometer Setup Beads*. Diese wurden à 50 μ l in drei FACS Röhrchen (A, B und C) verteilt. Röhrchen B wurde mit 50 μ l FITC *Positive Control* und Röhrchen C mit PE *Positive Control* befüllt. Die Röhrchen inkubierten 30 min bei RT im Dunkeln und wurden anschließend mit *Wash Buffer* auf 500 μ l aufgefüllt. Die Instrumenteneinstellungen richteten sich nach Vorgabe der BDTM CBA Software. Die Durchführung des CBA erfolgte unsteril.

BD™ Cytometric Bead Array (CBA) – Human Inflammation Kit [BD]:

Human IL-8 Capture Beads
Human IL-1 β Capture Beads
Human IL-6 Capture Beads
Human IL-10 Capture Beads
Human TNF α Capture Beads
Human IL-12p70 Capture Beads
Human Inflammation PE Detection Reagent
Human Inflammation Standard
Cytometer Setup Beads
PE Positive Control Detector
FITC Positive Control Detector
Wash Buffer
Assay Diluent

BD™ Cytometric Bead Array (CBA) – Human Th1/Th2 Cytokine CBA [BD]:

Human IL-2 Capture Beads
Human IL-4 Capture Beads
Human IL-5 Capture Beads
Human IL-10 Capture Beads
Human TNF α Capture Beads
Human IFN γ Capture Beads
Human Th1/Th2 PE Detection Reagent
Human Th1/Th2 Cytokine Standard
Cytometer Setup Beads
PE Positive Control Detector
FITC Positive Control Detector
Wash Buffer
Assay Diluent

2.15. Durchflusszytometrische Analyse phosphorylierter intrazellulärer Signalmoleküle

Die Aktivierung inflammatorischer Immunantworten dendritischer Zellen nach Stimulation mit Pathogenen resultiert in der Produktion und Ausschüttung (pro-) inflammatorischer Zytokine. Dazu werden verschiedene Signalkaskaden aktiviert (Kap. 1.2.5.) und Kinasen phosphoryliert. Die Phosphorylierung aktivierter Kinasen kann mit anti-Phosphorylierungs-Antikörper durchflusszytometrisch (Kap. 2.12.1.) analysiert werden.

Unreife DC wurden mit 10 $\mu\text{g/ml}$ LPS, 5 $\mu\text{g/ml}$ ssRNA40 [Invivogen] und einer Kombination aus LPS und ssRNA40 10 min, 1 h und 4 h bei 37°C im Wasserbad stimuliert. Als Kontrollen dienten unstimulierte unreife DC. Bei der Analyse des phosphorylierten STAT1 wurden die unreifen DC der Positivkontrolle mit 50 ng/ml Interferon γ , bei allen anderen Phospho-Antikörpern mit 50 ng/ml PMA 10 min stimuliert. Anschließend wurden die Zellen mit 2% Paraformaldehyd für 10 min bei 37°C fixiert und mit 90% Methanol [Roth] über Nacht bei -20°C permeabilisiert. Die Zellen wurden zweimal in *Stain Buffer* [BD Pharmingen™, Heidelberg] für 10 min bei RT und 360xg zentrifugiert und dekantiert. Das Pellet wurde mit

20 µl Phospho-Antikörpern [BD™; siehe *Tabelle 2.5*] pro 1×10^6 Zellen für 1 h bei RT inkubiert und erneut mit *Stain Buffer* gewaschen (10 min, RT, 360xg). Das Pellet wurde in 300 µl *Stain Buffer* aufgenommen, resuspendiert und im FACS analysiert.

Die Arbeiten nach der Zellfixierung erfolgten unsteril.

Tabelle 2.5: Verwendete Anti-Phospho-Antikörper mit ihren Konjugaten

Anti-Phospho-Antikörper:
Anti-Phospho-p38 MAPK PE
Anti-Phospho-STAT1 PE
Anti-Phospho-ERK 1/2 Alexa Fluor® 647

PMA [Phorbolmyristataldehyd, Sigma-Aldrich, Deisenhofen]

Paraformaldehyd [Rotihistofix; Roth, Karlsruhe]

2% in PBS [Gibco]

2.16. Molekulargenetischer Nachweis der Toll-like Rezeptoren

2.16.1. Die Polymerasekettenreaktion

Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*; PCR) können spezifische DNA-Sequenzen *in vitro* mit hoher Ausbeute amplifiziert werden. In drei Teilschritten mit jeweils unterschiedlichen Temperaturen, die zyklisch wiederholt werden, verdoppelt sich die Menge des von Startmolekülen eingerahmten Matrizenfragments und wird im darauf folgenden Zyklus zum Ausgangsmaterial. Im ersten Schritt, der Denaturierung der DNA-Doppelstränge (bei etwa 90°C), wird die DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen. Beim *Annealing* (etwa 50°C), hybridisieren sogenannte Primer, die von einer Polymerase als Starter genutzt werden, mit den beiden DNA-Matrizensträngen. Im dritten Schritt, der Elongation, synthetisiert eine DNA-Polymerase bei etwa 70°C neue DNA und kopiert somit die beiden Matrizenstränge.

Für die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten PCR wurde entweder ein konventioneller BlockCycler oder ein LightCycler™ einer sog. *Realtime PCR* verwendet. Im Gegensatz zum BlockCycler, bei dem der gesamte Block, in dem die Proben stehen, erhitzt wird, führt der LightCycler™ den Proben alternierend erhitzte und gekühlte Luft zu (*Abb. 2.2*). Mit Hilfe von dünnen Glas-Kapillaren wird aufgrund der großen Kapillar-Oberfläche die Probe deutlich schneller und gleichmäßiger als im BlockCycler erwärmt. Ein weiterer Vorteil des LightCyclers™ ist die simultane Überwachung der Reaktion mit Hilfe eines Fluoreszenzfarbstoffes (SYBR® *Green I*). Die Intensität der Fluoreszenz, die nach jedem

Zyklus gemessen wird, ist proportional zur Menge des PCR Produkts. SYBR[®] Green bindet nur doppelsträngige DNA, so dass am Ende jeder Elongationsphase, in der das Amplifikat als Doppelstrang-DNA vorliegt, die maximale Fluoreszenz gemessen wird. Dazu befindet sich im LightCycler[™] eine optische Einheit mit drei Detektionskanälen und eine Licht-emittierende Diode (LED). Bei einer Wellenlänge von 470 nm wird Licht von der Diode auf die Kapillarenspitze fokussiert und der Farbstoff angeregt. Die Fluoreszenz wird über Filter und Spiegel der Detektion und elektronischen Auswertung zugeführt. Die gemessenen Signale werden dann direkt auf einen Bildschirm übertragen.

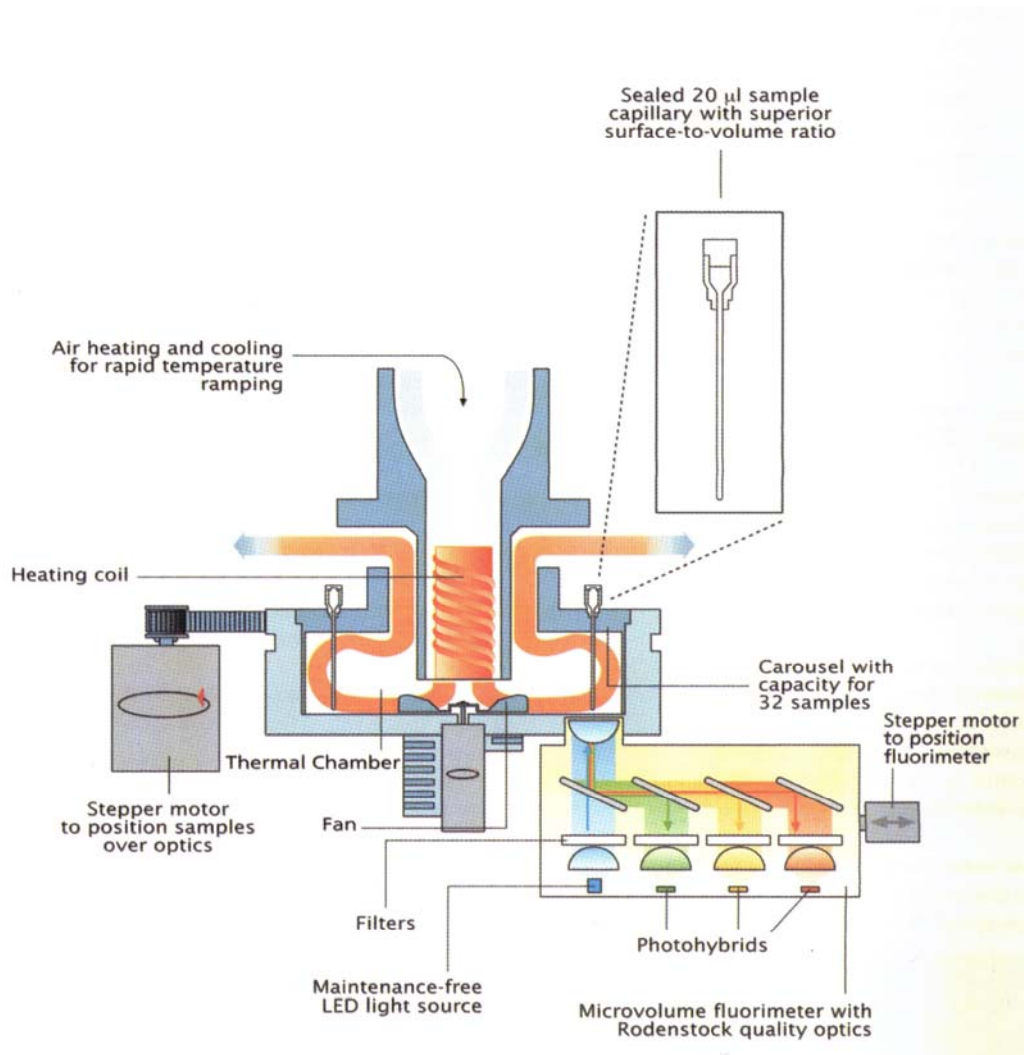


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung eines LightCyclers[™] [Roche, Mannheim]

Die Auswertung der PCR im BlockCycler und die Überprüfung der Produkte des LightCyclers[™] erfolgt mit Hilfe eines Ethidiumbromid-haltigen Agarosegels. Die PCR-Produkte werden mit geeigneten Molekulargewicht-Standards („Leiter“) im Gel elektrophoretisch nach Größe aufgetrennt und anschließend im UV-Licht sichtbar gemacht. Dabei werden helle Farbbanden unterschiedlicher Intensität sichtbar, die dokumentiert werden kann. Primer-Dimere und unspezifische Nebenprodukte können durch zusätzliche diffuse Bandenbildung erkannt werden.

Die Schmelzkurvenanalyse ermöglicht die Überprüfung der Reinheit des PCR-Produkts des LightCyclersTM. Dabei werden am Ende der PCR die Proben langsam erhitzt und alle 0,2°C die Fluoreszenz gemessen. Sobald die entstandene DNA denaturiert, löst sich das SYBR[®] Green und die Fluoreszenz fällt steil ab. Jedes doppelsträngige PCR-Produkt hat eine spezifische Schmelztemperatur (T_m), bei der 50% der DNA einfach- und 50% doppelsträngig vorliegen. Durch Vergleich der Schmelztemperatur des PCR-Produkts mit der einer Positiv-Kontrolle kann die Identität des Produkts verglichen werden. Zusätzliche, d.h. nicht-spezifische PCR-Produkte, wie Primer Dimere, können anhand ihrer geringeren Schmelztemperatur detektiert werden.

Die Quantifizierung unbekannter Proben erfolgt über einen Vergleich von Konzentrationen der eingesetzten Proben, indem der Zyklus, bei dem das log-lineare Signal sich vom Hintergrund unterscheidet, identifiziert wird. Dazu wird auf dem Fluoreszenz-Niveau, bei dem sich die PCR in der log-linearen Phase befindet, eine Grenze gesetzt („noise band“). Man berechnet daraufhin die logarithmischen Werte der Daten oberhalb der *noise band*. Es wird eine Gerade durch eine definierte Anzahl dieser Daten gelegt und die Schnittpunkte dieser Daten („crossing points“) mit der *noise band* bestimmt. Die *crossing points*, die man auf die Zyklenzahl bezieht, werden gegen den Logarithmus der Konzentration aufgetragen. Durch Vergleich der *crossing points* eines Standards mit den *crossing points* der unbekanntenen Proben werden die Konzentrationen der unbekanntenen Proben berechnet.

2.16.2. RNA-Isolierung aus Monozyten, unreifen und gereiften dendritischen Zellen sowie aus T-Zellen

In der vorliegenden Arbeit wurde die Methode der PCR genutzt, um mRNA (*messenger RNA*) in Monozyten, unreifen und gereiften dendritischen Zellen sowie in T-Zellen nachzuweisen. Dafür musste aus den Zellen die Gesamt-RNA isoliert werden.

Die RNA wurde unter Verwendung eines RNA-Isolierungs-Kits [High Pure RNA Isolation Kit; Roche, Mannheim] aus den zu untersuchenden Zellen extrahiert. Dafür wurden maximal 1×10^6 Zellen in 200 μ l PBS aufgenommen und unter Zugabe von 400 μ l Lyse-/Bindepuffer suspendiert. Das Lysat wurde auf einen zweilagigen Glasvlies-Filter pipettiert, welcher sich in einem Polypropylen-Auffanggefäß befand. Anschließend wurde 15 sec bei 10.000 Umdrehungen pro Minute (U/min) zentrifugiert, das Eluat verworfen und der Filter wieder eingesetzt. 10 μ l der DNase-Gebrauchslösung wurden in 90 μ l DNase Inkubationspuffer verdünnt, auf den Filter pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Dabei wurden gegebenenfalls verbliebene genomische Sequenzen aus dem Nukleinsäureextrakt entfernt, um deren Amplifikation zu verhindern und eine exakte RNA-Quantifizierung zu gewährleisten. Nach Zugabe von 500 μ l Waschpuffer I wurde 15 sec bei 10.000 U/min zentrifugiert, der Durchlauf

verworfen und mit 500 µl Waschpuffer II in gleicher Weise verfahren. Zum Abschluss des Waschvorgangs wurde die Säule mit 200 µl Waschpuffer II beladen und 2 min bei 13.000 U/min zentrifugiert. Danach wurde das Auffanggefäß mitsamt Inhalt verworfen und der Filter in ein 1,5 ml Eppendorfgefäß gesetzt. Die Elution der RNA erfolgte durch einminütige Inkubation mit 50 µl auf 70°C erwärmten Elutionspuffer und anschließender Zentrifugation bei 10.000 U/min. Zur Fällung der RNA wurde diese mit 10 µl 3M Natrium-Acetat-Trihydrat [Roth, Karlsruhe] (NaAc mit 0,2%igen Diethylpyrocarbonat (DEPC; Sigma Aldrich, Deisenhofen)) und 260 µl vorgekühltem (-20°C) Ethanol [EtOH, 32205 absolut; Riedel-de Haën, Seelze] vermischt und 1-24 h bei -20°C gelagert. DEPC hat die Eigenschaft, Ribonukleasen durch kovalente Modifikationen zu inaktivieren. Im Anschluss wurde die Probe 20 min mit 13.000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen und 3 min inkubiert. Nach zehnminütiger Zentrifugation mit 13.000 U/min bei 4°C wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Eppendorfgefäß 15-30 min bei RT getrocknet. Das Pellet wurde, je nach eingesetzter Zellzahl, mit 5–10 µl Aqua bidestillata (mit DEPC) aufgenommen und bis zur Verwendung in einer RT-PCR (Kapitel 2.16.3.) bei 4°C gelagert. Alle Arbeitsschritte erfolgten unsteril.

Lyse-/Bindepuffer

4,5 M Guanidiniumchlorid
50 mM Tris-HCl
30% Triton®X-100 (w/v), pH 6,6; Lagerung bei RT

DNase I

10 KU in 550 µl Elutionspuffer, Lagerung bei -20°C

DNase Inkubationspuffer

1 M NaCl
20 mM Tris-HCl
10 mM MnCl₂, pH 7,0; Lagerung bei RT

Waschpuffer I

Mit 15 ml Ethanol [EtOH, 32205 absolut; Riedel-de Haën, Seelze] vermischt
5 M Guanidiniumchlorid
20 mM Tris-HCl, pH 6,6; Lagerung bei RT

Waschpuffer II

Mit 40 ml Ethanol [EtOH, 32205 absolut; Riedel-de Haën] vermischt
20 mM NaCl
2 mM Tris-HCl, pH 7,5; Lagerung bei RT

Elutionspuffer

Nuklease-freies Aqua bidestillata

2.16.3. Reverse Transkription

Die isolierte Gesamt-RNA (RNA) dient bei der Reversen Transkription (RT-PCR) als Ausgangsmaterial. Dabei wird mit Hilfe des Enzyms Reverse Transkriptase eine DNA-Kopie (cDNA = *copy* DNA) hergestellt, die als Ausgangsmatrize für die Amplifikation in der PCR fungiert. Dazu werden Oligo *Random*-Primer benutzt, die an den Poly(A)-Schwanz der mRNA am 3'Ende binden. Eine RNA-abhängige DNA-Polymerase verlängert die Primer entlang der RNA-Matrize. Um den Abbau der RNA durch RNasen zu reduzieren, wird ein rekombinanter RNase Inhibitor zugegeben und die Proben auf Eis gekühlt.

Zur Denaturierung von RNA-Sekundärstrukturen wurden bis zu 1 µg RNA (isoliert aus höchstens 1×10^6 Zellen) mit 0,5 µg/µl Oligo *Random*-Primer [Promega, Madison, USA] in 0,2 ml Tubes [Perkin Elmer, Weiterstadt] in einem BlockCycler [Gene Amp PCR System 2400; Perkin Elmer, Weiterstadt] 5 min auf 70 °C erhitzt und sofort 5 min auf Eis gekühlt, um Renaturierungen zu verhindern. Anschließend erfolgte die Zugabe von RT Puffer, Anti-RNase, Reverser Transkriptase und dNTPs in den in *Tabelle 2.6* angegebenen Konzentrationen. Mit Aqua bidestillata wurde auf ein Endvolumen von 20 µl aufgefüllt. Die Reaktion wurde im BlockCycler 60 min bei 37°C inkubiert. Um die Reaktion zu beenden, d.h. die Reverse Transkriptase zu inaktivieren, wurde die Probe für 5 min auf 99°C erhitzt. Die cDNA wurde auf 4°C abgekühlt und bis zur Weiterverwendung gelagert.

Tabelle 2.6: Verwendete Reagenzien für die RT-PCR

Produkt	Eingesetzte Konzentration	Hersteller
5xBuffer RT Puffer	1x	Quiagen
Reverse Transcriptase	4 U/µl	Quiagen
Set of dATP, dCTP, dGTP, dTTP	0,5 mM	Quiagen
ANTI-Rnase	20 U/µl	Ambion
Random Primer	0,5 µg/µl	Promega, Madison, USA

2.16.4. Wahl der Primer

Da der Nachweis der Toll-like Rezeptoren auf der Oberfläche von Monozyten und dendritischen Zellen aufgrund der geringen Expression durchflusszytometrisch sehr schwierig ist, wurde in der vorliegenden Arbeit versucht, die mRNA der TLR in Monozyten und DC nachzuweisen. Dafür mussten zunächst spezifische TLR-Primer *designed* werden.

Die Primer für die einzelnen TLR PCR wurden mit Hilfe zweier Internet-Programme erstellt. Zuerst wurden die einzelnen Gensequenzen der TLR unter PubMed – Nucleotide: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar> gesucht und die jeweilige *Origin* Sequenz in ein Textverarbeitungsprogramm kopiert. Dabei wurden alle SNPs oder andere Mutationsstellen notiert und für die Primerwahl ausgespart. Alle

Leerzeichen und Zahlen der Sequenz wurden entfernt und die modifizierte Sequenz in ein Primerdesign-Programm (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) kopiert. Jeweils drei 150-250 bp lange Primer wurden ausgewählt und kommerziell synthetisiert (Tabelle 2.7).

Primersequenzen

Tabelle 2.7.: Nach Optimierung der TLR-PCR verwendete TLR-Primerpaare. Die von MWG-Biotech synthetisierten Primer wurden wie oben beschrieben konstruiert, die Primer für den TLR5 und TLR6 wurden bei R&D Systems direkt bestellt. Alle *Accession numbers* der TLR-Gensequenzen finden sich im Anhang.

Bezeichnung	Spezifität	Sequenz 5'-3'	Produktlänge [bp]	Hersteller
TLR1	3'Primer 5'Primer	ata ttg ggc acc cct aca aa aat ggc aaa atg gaa gat gc	117	MWG-Biotech AG, Ebersberg
TLR2	3'Primer 5'Primer	gta cct gtg ggg etc att gt ctt cct tgg aga ggc tga tg	136	MWG-Biotech AG
TLR3	3'Primer 5'Primer	cca cac act tcc ctg atg aa atc cca aag ggc aaa agg	132	MWG-Biotech AG
TLR4	3'Primer 5'Primer	agt gag gat gat gcc agg at ttc atg cca gct ctt ctg tg	147	MWG-Biotech AG
TLR5	3'Primer 5'Primer	nicht angegeben	482	R&D Systems
TLR6	3'Primer 5'Primer	nicht angegeben	565	R&D Systems
TLR7	3'Primer 5'Primer	atc ttg gca cct etc atg ct cca agg agt ttg gaa att agg a	147	MWG-Biotech AG
TLR8	3'Primer 5'Primer	aac atc agc aag acc cat cc cag cat tga cga ctg aag ga		MWG-Biotech AG
TLR9	3'Primer 5'Primer	cca gac cct ctg gag aag c ctg gag etc aca ggg tag ga	147	MWG-Biotech AG
TLR10	3'Primer 5'Primer	ttt gcc acc aac ctg aag ac tca ggc cag act caa tac cc	128	MWG-Biotech AG

Tabelle 2.8: Verwendete Primer des *Housekeeping genes*. Die *Accession number* der Gensequenz befindet sich im Anhang.

Bezeichnung	Spezifität	Sequenz 5'-3'	Produktlänge [bp]	Hersteller
β-Aktin	3'Primer 5'Primer	gga ctt cga gca aga gat gg agc act gtg ttg gcg tac ag	234	MWG-Biotech AG

2.16.5. Optimierung der Toll-like Rezeptor-PCR im LightCycler™

Es wurde ein Protokoll entwickelt, um die TLR mit molekulargenetischen Mitteln nachweisen zu können. Dazu wurde aus separierten Monozyten, unreifen und stimulierten DC die RNA isoliert (Kap. 2.16.2) und mit Reverser Transkriptase cDNA synthetisiert (Kap. 2.16.3.). Mit verschiedenen TLR-spezifischen Primern (Tab. 2.7) wurde ausgehend von dieser cDNA in einer optimierten PCR die mRNA der TLR 1-10 amplifiziert.

Die Amplifizierung der TLR mRNA erfolgte mit dem LightCycler™ [LightCycler™ System; Roche], wobei für jeden TLR eine spezifische PCR etabliert werden musste. Dazu wurden die

verschiedenen Parameter der einzelnen TLR-PCR für eine möglichst große Produktausbeute bei geringer Entstehung von Primer-Dimeren oder Nebenprodukten optimiert.

Die Primerkonzentration wurde zwischen 0,5 und 1,5 μM variiert, die MgCl_2 -Konzentration zwischen 3 und 5 mM. Nach 12 min Präinkubation bei 95°C (Aktivierung der Polymerase) folgten 35-55 Zyklen mit jeweils 1 sec bei 95°C (Denaturierung der DNA), 5 sec bei 49°C–62°C (*Annealing*) und 3-25 sec bei 72°C (Elongation).

Die Heiz- bzw. Abkühlrate betrug 20°C pro Sekunde. Da SYBR[®] *Green I* die Fähigkeit besitzt, ausschließlich doppelsträngige DNA zu interkalieren, und die gesamte DNA am Ende der Elongationsphase doppelsträngig vorliegt, wurde nach jeder Elongationsphase die Fluoreszenz des SYBR[®] *Green I* gemessen. Zur Analyse der PCR in einer Schmelzkurve, wurden die PCR-Produkte im Modus „*Melting curve*“ mit 20°C/sec auf 95°C erhitzt, direkt auf 65°C abgekühlt und die Temperatur 15 sec lang gehalten. Das Schmelzen der Produkte erfolgte mit einer Heizrate von 0,2°C/sec. Zum Abschluss erfolgte eine Kühlung der Amplifikate auf 40°C für 30 sec, bevor die PCR beendet war. Wenn keine Nebenprodukte und Primer-Dimere in den Schmelzkurven zu erkennen waren, wurde das Produkt abschließend mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 2.16.6.) identifiziert.

Zur Überprüfung der einzelnen TLR-PCR wurde im Anschluss an jede PCR eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt (Kap. 2.16.1.). Die Schmelztemperaturen der amplifizierten PCR-Produkte sind in der folgenden *Tabelle 2.9.* aufgelistet:

Tabelle 2.9: Schmelztemperaturen der amplifizierten PCR-Produkte

Produkt	Schmelztemperatur in °C
TLR1 mRNA	81
TLR2 mRNA	86
TLR3 mRNA	83
TLR4 mRNA	90
TLR5 mRNA	88
TLR6 mRNA	83
TLR7 mRNA	82
TLR8 mRNA	84
TLR9 mRNA	91
TLR10 mRNA	82
Aktin mRNA	91

2.16.6. Agarosegelelektrophorese

Die Elektrophorese durch Agarosegele dient der Identifizierung der PCR-Produkte und zur Überprüfung des Amplifikationserfolgs. Die DNA im Gel kann mit der fluoreszierenden interkalierenden Substanz Ethidiumbromid (EtBr) als Banden lokalisiert werden. Die DNA wandert innerhalb des Gels horizontal in einem elektrischen Feld konstanter Spannung in Richtung Anode. Dabei passieren große DNA-Fragmente die Gelmatrix langsamer als kleinere Moleküle. Die Trennleistung kann durch die Konzentration der Gele beeinflusst werden. Hochprozentige Gele trennen besonders große Fragmente gut, während sich

niedrigprozentige Gele zur Auftrennung kleiner Fragmente eignen. Die Auftrennung der PCR-Produkte erfolgte in 2-3%igen Agarosegelen [BioTech Trade & Service GmbH, St. Leon-Rot].

Die abgewogene Agarose wurde in 0,5-fach (0,5x) Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE-Puffer) unter ständigem Rühren hinzu gegeben, 15 min bei Raumtemperatur geliert und anschließend 2-5 min in der Mikrowelle erhitzt. Nach Abkühlung auf 60°C wurden 0,5 µg/ml Ethidiumbromid [EtBr, mit 10 mg/ml; Gibco, Eggenstein] zugefügt, sorgfältig vermischt und die Agaroselösung in einen Gelträger [Easy Cast™, #B2; AGS GmbH, Heidelberg] gegossen. Um Taschen für die DNA-Proben zu erhalten, wurde in das noch flüssige Gel ein Kunststoffkamm mit 16 Zähnen gesetzt. Nach Aushärtung des Gels wurde der Kamm entfernt und das Gel in eine mit 0,5x TBE gefüllte Elektrophoresekammer [Power Pac 3eo; Bio Rad, München] überführt. Es wurden 5-10 µl der DNA-Proben mit je 1,5 µl Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Der Ladepuffer bewirkte einerseits - aufgrund seines Glycerolgehaltes zur Erhöhung der Dichte - dass die Proben in die Taschen absanken, andererseits ermöglichten die darin enthaltenen Farbstoffe Bromphenolblau und Xylencyanol eine visuelle Überprüfung des Trennungsvorganges. Bei jedem Lauf wurde ein Längen-Marker [50bp DNA Ladder; Promega, Madison, USA] auf das Gel mit aufgetragen, der die 50 bp Abschnitte markierte, anhand derer die Größe der PCR-Produkte genau überprüft werden konnte. Anschließend wurde die Kammer verschlossen und für 1,5 h eine Spannung von 90 V angelegt. Alle Arbeitsschritte erfolgten unsteril.

TBE; Stammlösung (5x):

- 54 g Tris base [Roth, Karlsruhe]
- 27,5 g Borat [Serva, Heidelberg]
- 20 ml 0,5 M EDTA [Serva, Heidelberg]
 - eingestellt auf pH 8
 - TBE-Gebrauchslösung: 0.5x

Ladepuffer [Blue/Orange 6x Loading Dye; Promega, Madison, USA]

- 0,25% Bromphenolblau
- 0,25% Xylencyanol
- 30% Glycerol
- 50 mM EDTA

Die Gele wurden anschließend mit Hilfe eines UV-Transilluminators [2020E; Stratagene] mit UV-Licht bestrahlt. Bei einer Anregung mit Licht der Wellenlänge 254 nm fluoresziert das in die DNA-Doppelhelix interkalierte Ethidiumbromid, so dass DNA-Banden sichtbar wurden. Mittels einer Digitalkamera [EOS 20D; Canon, Amsterdam, Niederlande] mit einer Blende von 1,4 und einer Belichtungszeit von 0,6 sec wurden die Gele digitalisiert. Die Bilder wurden zur Dokumentation mit einem Bildbearbeitungsprogramm [*Photoshop Software*; Adobe Systems GmbH, München] bearbeitet. Alle Arbeitsschritte erfolgten unsteril.

2.16.7. Quantitative spezifische Toll-like Rezeptor-PCR

Die TLR-PCR wurden mit dem LightCycler™ durchgeführt. Zur Amplifikation der TLR mRNA wurde mit den in *Tabelle 2.7* beschriebenen Primerpaaren und dem LightCycler™ - DNA Master SYBR® *Green I* Kit, [Roche] gearbeitet. Das Kit enthält LightCycler™ - DNA Master SYBR® *Green I* in zehnfacher Konzentration, 25 mM MgCl₂ Stammlösung und Aqua bidestillata. Da die Reaktionsfähigkeit des SYBR® *Green I* unter Lichteinfluss und Wärme schnell abnimmt, wurde der PCR-Ansatz in einem vorgekühlten abgedunkeltem Kühlblock durchgeführt. Mit Ausnahme der cDNA (Kap. 2.16.3.) wurde alles in einer PCR-Arbeitshäube [Clene Cab; Herolab, Wiesloch] angesetzt, in der vor jedem Arbeitstag alle Spitzen, Pipetten und Reaktionsgefäße für 30 min mit UV-Licht bestrahlt wurden.

Nach Optimierung der einzelnen TLR-PCR (Kap. 2.16.5.) wurden die Ansätze, in den in *Tabelle 2.10* aufgeführten Konzentrationen, in einem 1,5 ml Eppendorf-Tube [Eppendorf, Hamburg] präpariert und in Glaskapillaren [LightCycler™ – Capillaries; Roche, Mannheim] überführt. Außerhalb der PCR-Arbeitshäube erfolgte die Zugabe von 2,5 µl cDNA der zu untersuchenden Zellen pro Kapillare und die Zentrifugation der Proben mit 3.000 U/min für 5 sec. Die Kapillaren wurden in den LightCycler™ gesetzt. Alle Arbeitsschritte erfolgten unsteril.

Tabelle 2.10: Eingesetzte Reagenzien im Master Mix

Master Mix	Stammlösung	Eingesetzte Konzentration
Aqua bidestillata		7,5 µl
MgCl ₂	25 mM	4 mM
Primerpaare:	10 µM	0,5 µM
LightCycler™ - DNA Master SYBR® <i>Green I</i>	10x	1x

Die Denaturierung der cDNA erfolgte, indem die Proben auf 95°C erhitzt und 12 min inkubiert wurden. Anschließend folgte die Amplifizierung mit 35-40 Zyklen mit folgenden Inkubationszeiten (*Tab. 2.11*):

Tabelle 2.11: Amplifizierungsprotokolle der einzelnen TLR-PCR.

TLR1-PCR mit 40 Zyklen	Denaturierung	Amplifizierung	Elongation
°C	95	55	72
sec	0	5	9
°C/sec	20	20	20
TLR2-PCR mit 40 Zyklen	Denaturierung	Amplifizierung	Elongation
°C	95	55	72
sec	0	5	9
°C/sec	20	20	20
TLR3-PCR mit 40 Zyklen	Denaturierung	Amplifizierung	Elongation
°C	95	57	72
sec	0	5	9
°C/sec	20	20	20
TLR4-PCR mit 40 Zyklen	Denaturierung	Amplifizierung	Elongation
°C	95	57	72
sec	0	5	9
°C/sec	20	20	20
TLR5-PCR mit 35 Zyklen	Denaturierung	Amplifizierung	Elongation
°C	95	55	72
sec	0	5	20
°C/sec	20	20	20
TLR6-PCR mit 35 Zyklen	Denaturierung	Amplifizierung	Elongation
°C	95	55	72
sec	0	5	24
°C/sec	20	20	20
TLR7-PCR mit 40 Zyklen	Denaturierung	Amplifizierung	Elongation
°C	95	57	72
sec	0	5	9
°C/sec	20	20	20
TLR8-PCR mit 40 Zyklen	Denaturierung	Amplifizierung	Elongation
°C	95	57	72
sec	0	5	9
°C/sec	20	20	20
TLR9-PCR mit 40 Zyklen	Denaturierung	Amplifizierung	Elongation
°C	95	57	72
sec	0	5	9
°C/sec	20	20	20
TLR1-PCR mit 40 Zyklen	Denaturierung	Amplifizierung	Elongation
°C	95	57	72
sec	0	5	9
°C/sec	20	20	20

2.16.8. Herstellung der Standards für die quantitative PCR

Eine Verdünnungsreihe eines Standards ermöglichte Rückschlüsse auf die Konzentration an mRNA in jeder Probe und damit auf die TLR-Expression in den zu untersuchenden Zellen. Zur Herstellung eines Quantifizierungs-Standards wurde cDNA aus Monozyten und unreifen DC (Kapitel 2.16.3.) produziert. Dazu wurden mit Hilfe der zehn verschiedenen TLR-Primer und den optimierten TLR-PCR Protokollen (Kap. 2.16.5.) jeweils 4 spezifische TLR-PCR durchgeführt. Anschließend wurden die Produkte bei 2.000 U/min für 15 sec aus den Kapillaren in 2 ml Eppendorfgefäße heraus zentrifugiert, mittels Agarose-Gelelektrophorese

(Kap. 2.16.6.) überprüft und die Produkte gefällt. Dazu wurden die Produkte mit Elutionspuffer auf 100 µl aufgefüllt, mit 10 µl 3 M Natrium-Acetat-Trihydrat [Roth, Karlsruhe] und 260 µl eisgekühltem Ethanol [Roth] gefällt. Die Produkte wurden mindestens 1 h bei -20°C gelagert und anschließend in einer vorgekühlten Zentrifuge 20 min mit 13.000 U/min bei 4°C zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, das Pellet mit 300 µl 70%igem Ethanol gewaschen und 3 min inkubiert. Nach zehnmütiger Zentrifugation mit 13.000 U/min bei 4°C wurde der Überstand vorsichtig abpipettiert und das Eppendorfgefäß 15-30 min bei RT getrocknet. Das Pellet wurde mit 200 µl Elutionspuffer aufgenommen und jeweils in 10 Schritten 1:10 in Elutionspuffer verdünnt. Diese Verdünnungsreihen wurden aliquotiert, bei -20°C gelagert und zur Quantifizierung der TLR-PCR (Kap. 2.16.7.) genutzt.

Quantifizierung

Der Nachweis der Aktin mRNA stellt eine Möglichkeit dar, auf die Menge an Gesamt RNA in jeder Probe zu schließen. Aktin ist in allen Zellen vorhanden, es ist leicht zu detektieren und dessen Konzentration bleibt unter PCR-Bedingungen konstant. Aktin wird verwendet, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten Gesamt-RNA auszugleichen. Für Aktin wurde ebenfalls ein Standard produziert.

Zur relativen quantitativen Bestimmung der TLR-mRNA wurden alle Proben normalisiert, indem die, anhand der Standardkurven berechneten, TLR-mRNA Konzentrationen durch die Konzentrationen der jeweiligen Aktin mRNA dividiert wurde.

Elutionspuffer

Nuklease-freies Aqua bidestillata aus dem RNA-Isolierungs-Kits [High Pure RNA Isolation Kit; Roche, Mannheim]

2.17. Molekulargenetischer Nachweis von Interleukin-27 und seines Rezeptors

Interleukin-27 (IL-27), ein Heterodimer bestehend aus IL-27p28 und dem *Epstein-Barr virus-induced gene 3* (EBI3), ist bei der Initiation von Th1-Immunantworten involviert. Der Nachweis der mRNA für IL-27p28, EBI3 und dem IL-27 Rezeptor WSX-1 erfolgte molekulargenetisch mit Hilfe des LightCyclers™ (Kap. 2.16.1.).

Es wurden adulte und neonatale Monozyten isoliert (Kap. 2.7.1.), zu unreifen DC differenziert (Kap. 2.9.1.) und mit LPS, ssRNA, der Kombination aus LPS und ssRNA sowie der Kombination aus LPS und IFN γ für 48h stimuliert (Kap. 2.10.). Zusätzlich wurden adulte und neonatale T-Zellen separiert (Kap. 2.7.1.). Aus den Monozyten, den unreifen DC, den

stimulierten DC und den T-Zellen wurde RNA isoliert (Kap. 2.16.2.), in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.16.3.) und die Produkte für IL-27p28, EBI3 und WSX-1 in spezifischen PCR im LightCycler™ amplifiziert. Die Wahl der Primer (*Tab. 2.12*) erfolgte gemäß Kapitel 2.16.4.

Tabelle 2.12: Nach Optimierung der PCR verwendete Primerpaare. Alle *Accession numbers* der Gensequenzen finden sich im Anhang.

Bezeichnung	Spezifität	Sequenz 5'-3'	Produktlänge [bp]	Hersteller
IL-27p28	3' Primer 5' Primer	gag cag ctc cct gat gtt tc agc tgc atc ctc tcc atg tt	236	MWG-Biotech AG, Ebersberg
EBI3	3' Primer 5' Primer	tgt tct cca tgg ctc cct ac gct ccc tga cgc ttg taa c	158	MWG-Biotech AG
WSX-1	3' Primer 5' Primer	cca tac ccc tga ccc ctg ttg aga t cag agg ttc cct gat acc cac aca t	175	MWG-Biotech AG
β-Aktin	3' Primer 5' Primer	gga ctt cga gca aga gat gg agc act gtg ttg gcg tac ag	234	MWG-Biotech AG

Die Herstellung der Standardverdünnungen für die spezifischen PCR IL-27p28, EBI3, WSX-1 und β-Aktin erfolgte gemäß Kapitel 2.16.8. Der Reaktionsansatz für die PCR entsprach dem für die TLR-PCR (Kap. 2.16.5.). Die PCR-Protokolle nach Optimierung der einzelnen spezifischen PCR lauteten wie folgt (*Tab. 2.13*)

Tabelle 2.13: Amplifizierungsprotokolle der einzelnen IL-27 PCR.

IL-27p28-PCR mit 40 Zyklen	Denaturierung	Amplifizierung	Elongation
°C	95	60	72
sec	0	5	9
°C/sec	20	20	20
EBI3-PCR mit 40 Zyklen	Denaturierung	Amplifizierung	Elongation
°C	95	60	72
sec	0	5	9
°C/sec	20	20	20
WSX-1-PCR mit 40 Zyklen	Denaturierung	Amplifizierung	Elongation
°C	95	54	72
sec	0	5	7
°C/sec	20	20	20

Die Schmelztemperaturen der amplifizierten PCR-Produkte sind in *Tabelle 2.14* aufgelistet:

Tabelle 2.14: Schmelztemperaturen der amplifizierten PCR-Produkte.

Produkt	Schmelztemperatur in °C
IL-27p28 mRNA	88,7
EBI3 mRNA	91,3
WSX-1 mRNA	88,7
Aktin mRNA	91

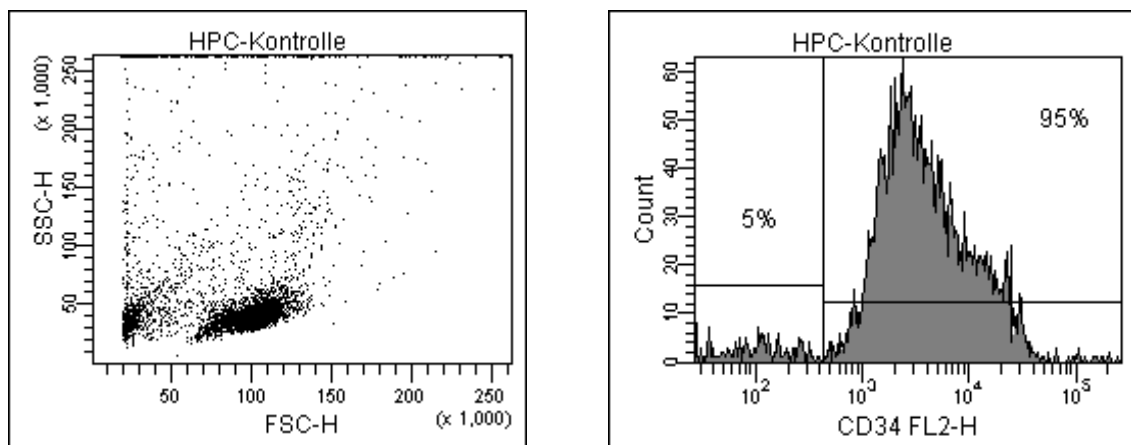
3. Ergebnisse

3.1. Generierung unreifer dendritischer Zellen aus verschiedenen Zellpopulationen

Wie einleitend beschrieben, sollten in der vorliegenden Arbeit neonatale dendritische Zellen charakterisiert und moduliert werden. Dendritische Zellen können aufgrund ihrer geringen Zellzahl nicht direkt aus Vollblut isoliert werden. Aus diesem Grund wurden einige publizierten Protokolle zur DC Generierung getestet, verglichen und unter der Berücksichtigung einer hohen Zellausbeute, Qualität und Praktikabilität etabliert. Die Charakterisierung und Quantifizierung der Zellpopulationen erfolgte mittels Durchflusszytometrie (Kap. 2.12.). Die verschiedenen Zellpopulationen wurden zur Veranschaulichung in den folgenden drei Kapiteln anhand einzelner Beispiele, welche für alle Ergebnisse repräsentativ waren, dargestellt.

3.1.1. Generierung unreifer dendritischer Zellen aus CD34+ hämatopoetischen Stammzellen

Die, aus Nabelschnurblut gewonnene, CD34-positive Zellfraktion mit einer Reinheit von 89,2% bis 95,2% (Kap. 2.7.2.; *Abb. 3.1*) wurde mit FLT3, SCF und TPO für zwei bis vier Wochen amplifiziert (Kap. 2.8.) und anschließend mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenziert (Kap. 2.9.1.). Zur Überprüfung der Zellpopulationen wurden die hämatopoetischen Stammzellen und die unreifen DC durchflusszytometrisch analysiert (*Abb. 3.1 u. 3.2*).



□

Abbildung 3.1: CD34-positive Zellfraktion nach zweifacher MACS-Isolierung. Die isolierten Zellen wurden mit CD34 PE (FL2-H) gefärbt (Kap. 2.12.) und die Reinheit durchflusszytometrisch überprüft. Bei dem dargestellten Beispiel wurde eine Reinheit von 95% CD34⁺ Zellen erreicht.

Es stellte sich heraus, dass die aus adultem Blut gewonnenen HPC sich nicht mit FLT3, SCF und TPO amplifizieren ließen (Tab. 3.1), während die neonatalen Zellen an jedem 3.-4. Kulturtag geteilt werden mussten, da sich ihre Anzahl innerhalb von drei Kulturtagen verdoppelt hat. Aus diesem Grund wurde für alle nachfolgenden Versuche nur mit HPC aus Nabelschnurblut gearbeitet.

Tabelle 3.1: HPC-Zellzahlen während der Amplifizierungskultur pro Proband. Die neonatalen Zellen (CB) wurden alle 3-4 Tage geteilt, die adulten Zellen (AB) verblieben jeweils in ihren well.

	Tag 0	Tag 7	Tag 14	Tag 21
AB 1	500.000	380.000	432.500	410.000
AB 2	620.000	735.000	1.115.000	972.000
AB 3	280.000	310.000	305.000	
CB1	680.000	2.720.000	12.340.000	43.600.000
CB2	3.200.000	11.800.000	46.750.000	
CB3	2.850.000	12.400.000	48.130.000	
CB4	1.980.000	6.250.000	23.000.000	
CB5	2.200.000	7.800.000	26.500.000	
CB6	3.770.000	13.450.000	39.300.000	

Unreife DC zeichnen sich durch das Fehlen bzw. die geringere Expression von Kostimulations- und Reifungsmarkern aus (Kap. 1.2.). Das Oberflächenprotein CD86 eignet sich für die Beurteilung des Reifestadiums dendritischer Zellen besonders gut. CD86 findet sich in geringer Intensität auf nahezu allen Monozyten und unreifen dendritischen Zellen und wird aus diesem Grund als CD86*all* bezeichnet. Während ihrer Reifung exprimieren die dendritischen Zellen den CD86 in höherer Intensität, wobei die mittlere Fluoreszenzintensität über 10⁴ steigt. Diese intensive Expression des CD86 ist allgemein als CD86*high* anerkannt.

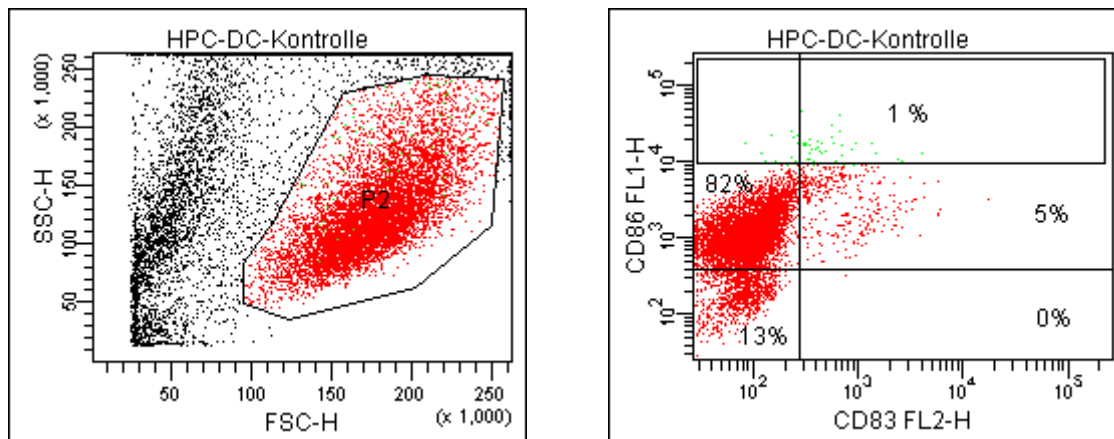


Abbildung 3.2: Unreife dendritische Zellen aus amplifizierten CD34-positiven Zellen wurden mit den Reifungsmarkern CD86 FITC (FL1) und CD83 PE (FL2) gefärbt (Kap. 2.12.). Im vorliegenden Beispiel exprimierten 1% der unreifen DC (P2, rot) den Reifungsmarker CD86^{high}, 5% den Reifungsmarker CD83.

Wie in Abb. 3.2 zu erkennen ist, regulieren nur 1% der unreifen DC den Kostimulator CD86 mit einer hohen Intensität, was der Definition des „CD86^{high}“ entspricht. Nur 5% der unreifen DC exprimieren den Reifungsmarker CD83. Die phänotypische Charakterisierung der reifen DC wird in Kap. 3.2.1. beschrieben.

3.1.2. Generierung unreifer dendritischer Zellen aus Monozyten

Aus Nabelschnurblut konnten 4,3% bis 25%, aus adultem Vollblut 6,1% bis 27% CD14-positive Monozyten (Kap. 2.7.1.) isoliert werden. Die Monozyten wurden mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenziert (Kap. 2.9.1.). Zur Überprüfung der Zellpopulation wurden die Monozyten (Abb. 3.3) und die unreifen DC durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.4).

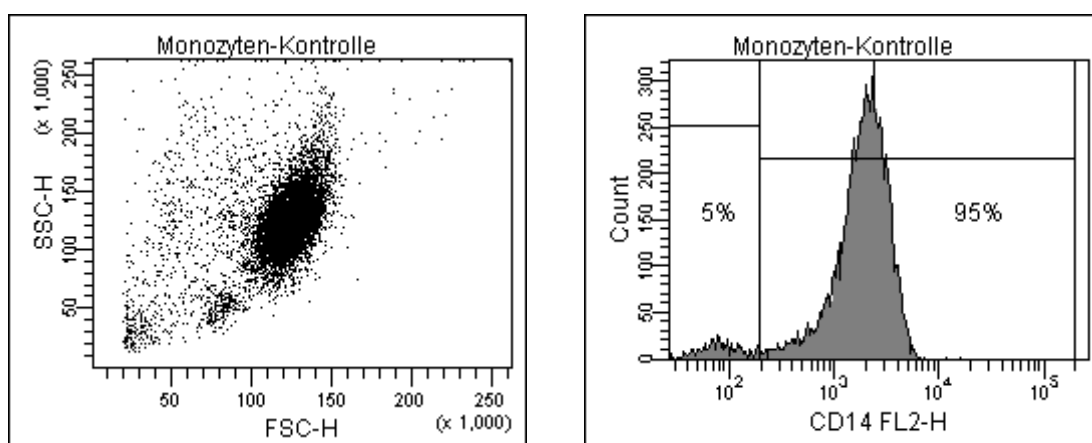


Abbildung 3.3 CD14-positive Zellfraktion nach MACS[®]-Isolierung. Die isolierten Zellen wurden mit CD14 PE (FL2) gefärbt (Kap. 2.12.) und die Reinheit durchflusszytometrisch überprüft. Im vorliegenden Beispiel wurde eine Reinheit von 95% CD14⁺ Zellen erreicht.

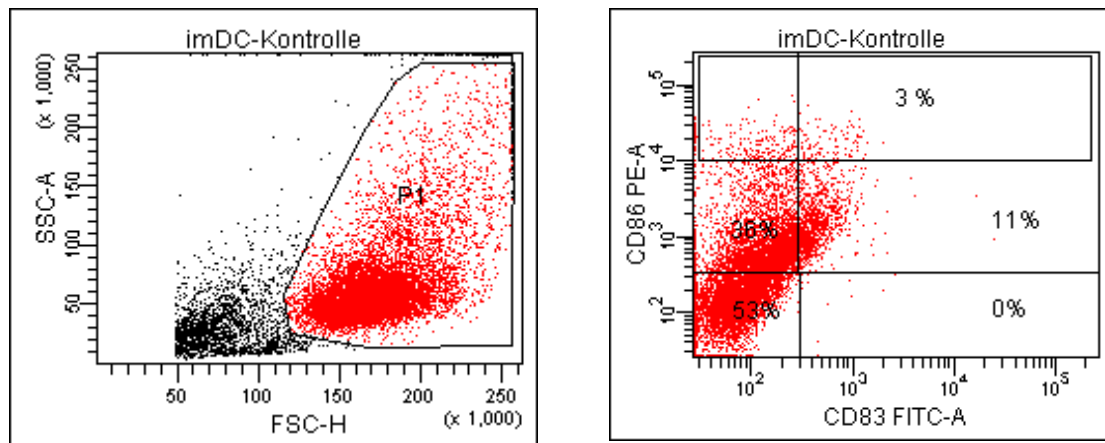


Abbildung 3.4: Unreife dendritische Zellen (imDC) aus Monozyten mit GM-CSF und IL-4 generiert. Die unreifen DC wurden mit den Reifungsmarkern CD83 FITC und CD86 PE gefärbt (Kap. 2.12.). Im vorliegenden Beispiel exprimierten 3% der unreifen DC (P1, rot) CD86 in hoher Intensität (CD86*high*). 11% exprimierten CD83.

Von den unreifen DC, welche durch die Inkubation mit GM-CSF und IL-4 aus Monozyten generiert wurden, exprimierten im dargestellten Beispiel nur 3% den Kostimulator CD86 in hoher Intensität (CD86*high*). Die phänotypische Charakterisierung aller reifen DC wird in Kap. 3.2.2. beschrieben.

3.1.3. Generierung unreifer plasmazytoider dendritischer Zellen

Plasmazytoide DC mussten nicht aus Vorläuferzellen generiert, sondern konnten direkt aus Vollblut isoliert werden. Die pDC wurden mit Hilfe der BDCA-2 *MicroBeads* magnetisch separiert (Kap. 2.7.1.) und durchflusszytometrisch analysiert (Abb. 3.5).

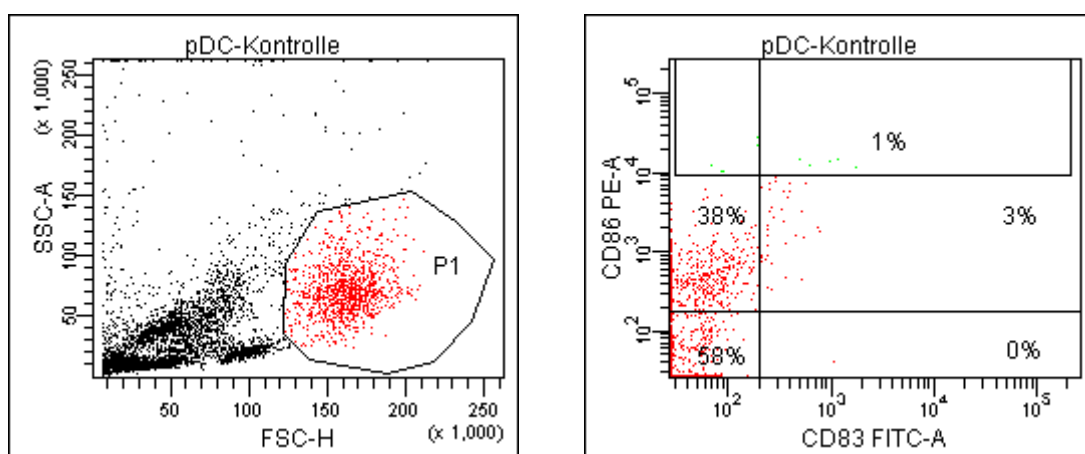


Abbildung 3.5: Unreife plasmazytoide dendritische Zellen wurden mit den Reifungsmarkern CD83 FITC und CD86 PE gefärbt (Kap. 2.12.). Im dargestellten Beispiel exprimierten 1% der unreifen pDC CD86*high* und 3% CD83.

Übereinstimmend mit den unreifen DC aus hämatopoetischen Stammzellen (Kap 3.1.1.) sowie den unreifen DC aus Monozyten (Kap. 3.1.2.) exprimieren nur 1% der unreifen pDC den Kostimulator CD86^{high} und nur 3% den Reifungsmarker CD83. Die phänotypische Charakterisierung aller untersuchten Proben und Oberflächenmarker wird in Kap. 3.1.3. beschrieben.

3.2. Phänotypische Charakterisierung stimulierter dendritischer Zellen

Als „Brücke“ zwischen angeborener und erworbener Immunität verfügen DC für die Detektion von Pathogenen über eine Gruppe von Rezeptoren, die „Toll-like“ Rezeptoren (TLR), die bakterielle und virale Moleküle, sogenannte „PAMP“, binden (Kap. 1.2.4.). Die Analyse der unterschiedlichen Reaktionsmuster von neonatalen und adulten DC nach Stimulation mit diversen PAMP wurden in der vorliegenden Arbeit zur Klärung der neonatalen Immundefizienz genutzt.

3.2.1. Stimulation unreifer dendritischer Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen

Unreife dendritische Zellen aus neonatalen hämatopoetischen Stammzellen wurden nach Amplifikation (Kap. 2.8.) und Kultivierung mit GM-CSF und IL-4 (Kap. 2.9.1.) mit Zymosan, Poly(I:C), LPS, Malp2, Loxoribin, R848, CpG A+B, mit einer Kombination aus allen zur Verfügung stehenden PAMP, hitzeinaktivierten uropathogenen E.coli (HKUEC), Interferon γ (IFN γ) und einer Kombination aus LPS und IFN γ für 48 h stimuliert (Kap. 2.10.) und geerntet. Vergleichskulturen derselben Zellsuspension ohne Pathogenzusatz dienten als Kontrollen. Zur Phänotypisierung wurden die zu untersuchenden Zellen mit den in Kapitel 2.12.2. angegebenen Antikörpern markiert und die Expression der Kostimulatoren durchflusszytometrisch bestimmt. Die Grafiken (Abb. 3.6-3.10) sind nach analysiertem Kostimulator geordnet.

3.2.1.1. Expression von CD80

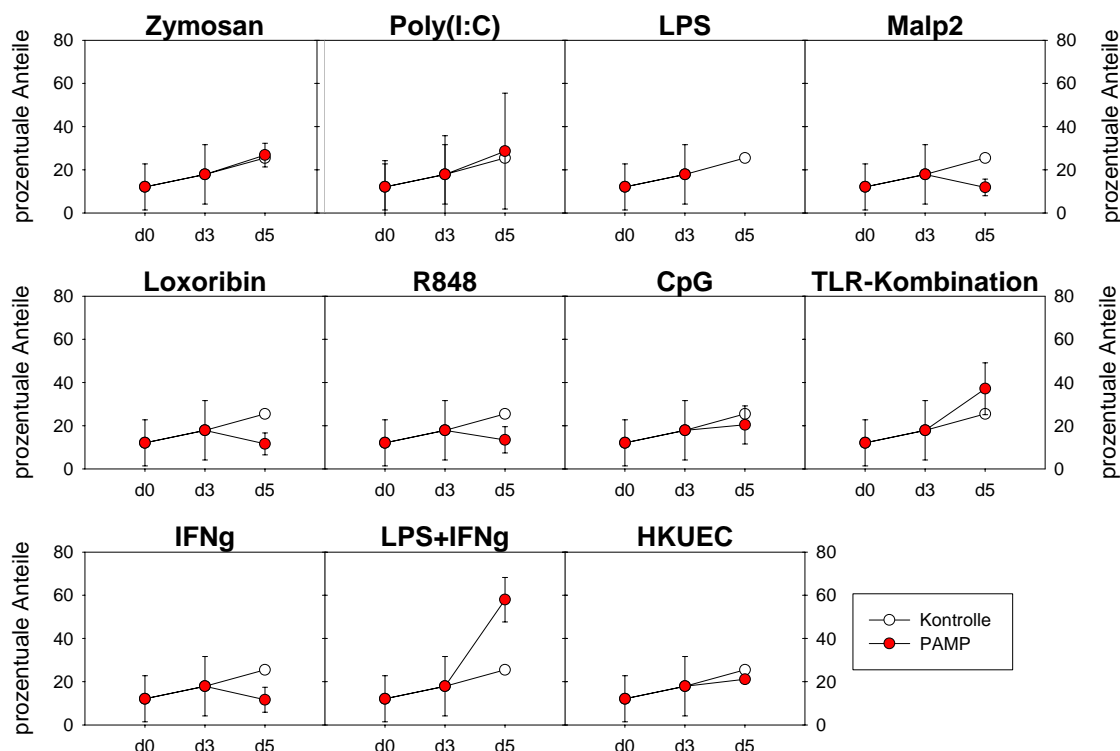


Abbildung 3.6: Expression von CD80 auf stimulierten DC, die aus hämatopoetischen Stammzellen (d0=Tag0) generiert wurden. Die untersuchten Zellen entsprachen der eingegrenzten Region aus Abb. 3.2. Die unreifen DC (d3=Tag3) wurden für 48 h mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert (d5=Tag5). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (s. Anhang). [n=3-15]

Die prozentualen Anteile der CD80 positiven dendritischen Zellen betrug zwischen 15% und 25% (Abb. 3.6). Die Stimulation der DC mit einzelnen Pathogen-assoziierten Molekülen konnte die CD80 Expression nicht steigern. Die Inkubation der unreifen DC mit Malp2, Loxoribin, R848, CPG, IFN γ bzw. mit den HKUEC führte zum Absinken der CD80 Expression. Wurden die Zellen hingegen mit kombinierten PAMP stimuliert oder IFN γ zu LPS hinzugefügt, wurde ein deutlicher Anstieg der CD80 Expression nachgewiesen. Dabei wurden 40% CD80 positive DC nach kombinierter TLR Bindung detektiert. Die Kombination aus LPS und IFN γ konnte einen Anstieg der Expression von CD80 auf 60% der DC induzieren.

3.2.1.2. Expression von CD83

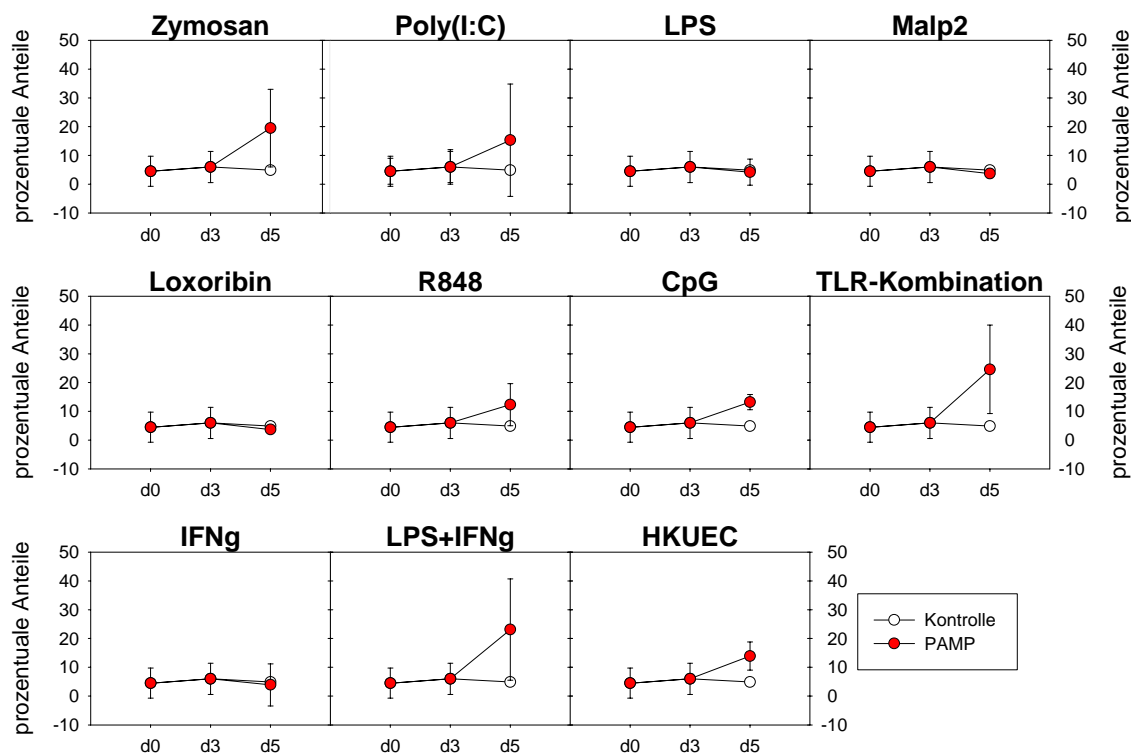


Abbildung 3.7: Expression von CD83 auf stimulierten DC, die aus hämatopoetischen Stammzellen (d0) generiert wurden. Die unreifen DC (d3) wurden für 48 h mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert (d5). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (s. Anhang). [n=2-25]

Der Kostimulator CD83 wurde nur sehr schwach auf den unstimulierten DC exprimiert (Abb. 3.7). Bis auf LPS, Malp2, Loxoribin und IFN γ konnten alle PAMP einen Anstieg der CD83 Expression auf DC aus hämatopoetischen Stammzellen induzieren. Dabei wurden nach Zugabe von Zymosan, der Kombination aus allen TLR-Liganden bzw. der Kombination aus LPS und IFN γ über 20% CD83 positive DC nachgewiesen.

3.2.1.3. Expression von CD86all

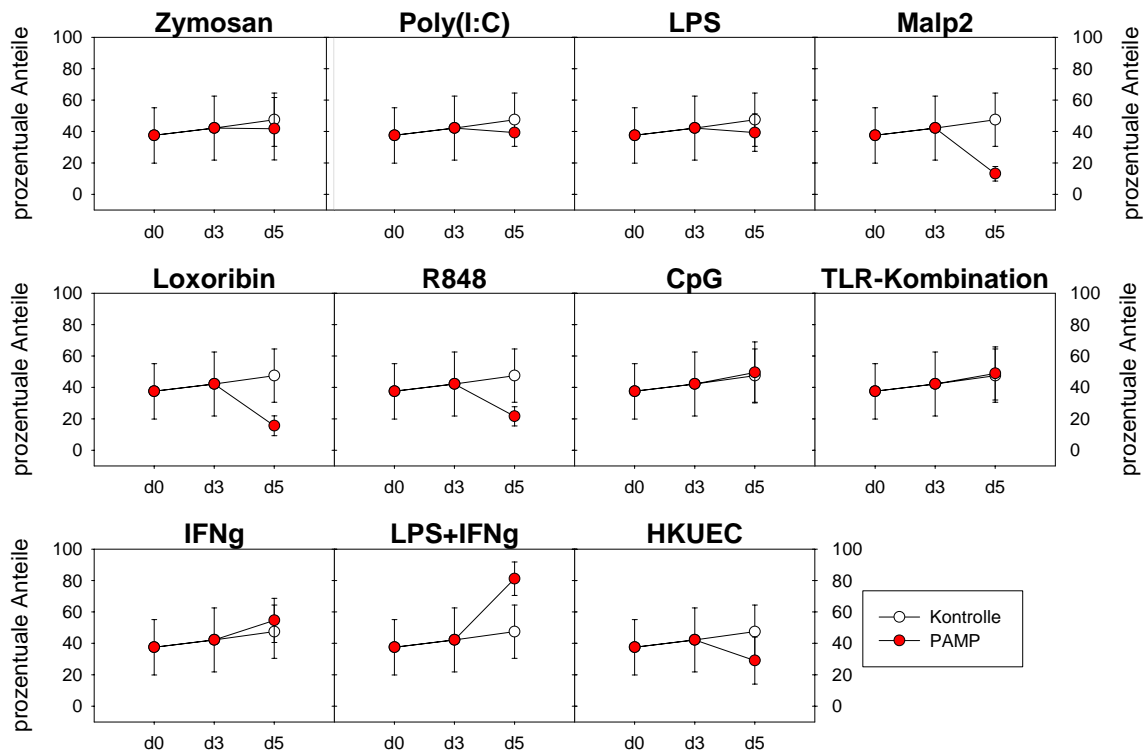


Abbildung 3.8: Expression von CD86all auf stimulierten DC, die aus hämatopoetischen Stammzellen (d0) generiert wurden. Die unreifen DC (d3) wurden für 48 h mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert (d5). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (s. Anhang). [n=2-17]

Auf etwa 40% aller unreifen DC, die aus hämatopoetischen Stammzellen generiert wurden, konnte der Oberflächenmarker CD86all nachgewiesen werden (Abb. 3.8). Nach Inkubation der unreifen DC mit Malp2, Loxoribin, R848 bzw. den hitzeinaktivierten E.coli (HKUEC) wurde die CD86all Expression der DC herunter reguliert. Eine Verdoppelung der CD86all Expression konnte nach kombinierter Stimulation der DC mit LPS und IFN γ detektiert werden.

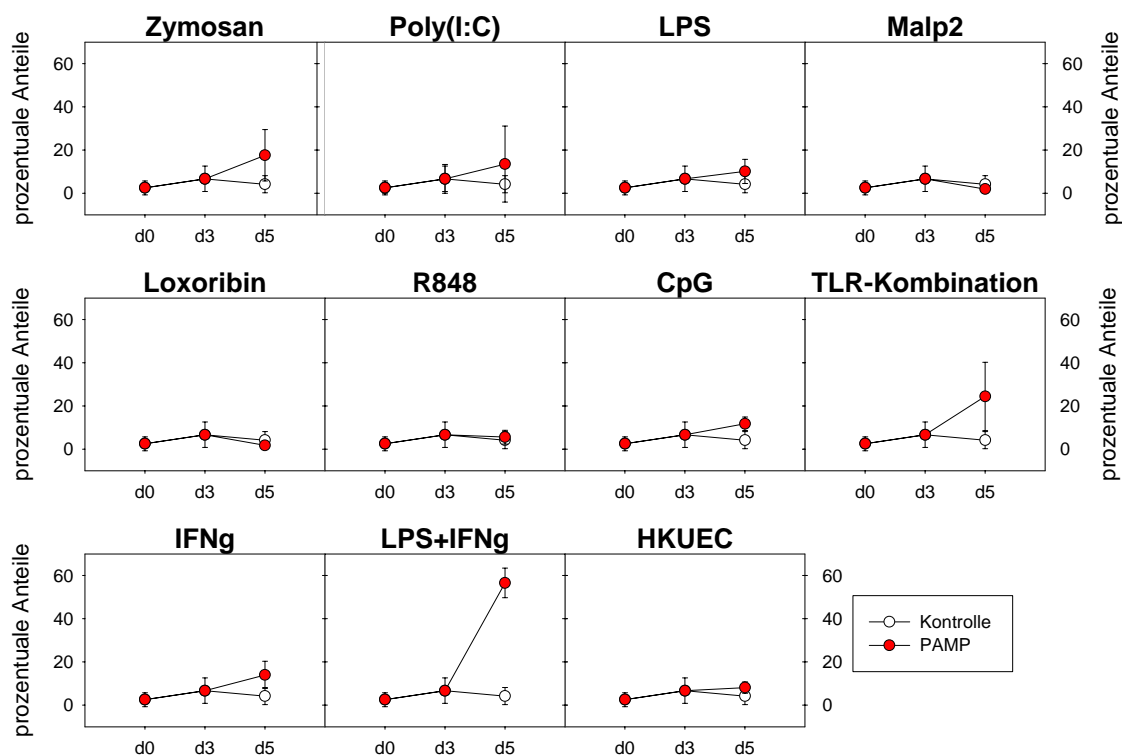
3.2.1.4. Expression von CD86^{high}

Abbildung 3.9: Expression von CD86^{high} auf stimulierten DC, die aus hämatopoetischen Stammzellen (d0) generiert wurden. Die unreifen DC (d3) wurden für 48 h mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert (d5). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (s. Anhang). [n=2-19]

Mit Ausnahme von Malp2, Loxoribin und R848 induzierten alle TLR-Liganden die Expression des stark fluoreszierenden Reifungsmarkers CD86^{high} (Abb. 3.9). Dabei stellte sich heraus, dass eine kombinierte TLR-Stimulation eine deutlich höhere CD86^{high} Expression auslöst. Besonders auffällig war die Wirkung der Kombination aus LPS und IFN γ , wobei die Expression von CD86^{high} auf 60% der dendritischen Zellen nachgewiesen werden konnte.

3.2.1.5. Expression von HLA-DR

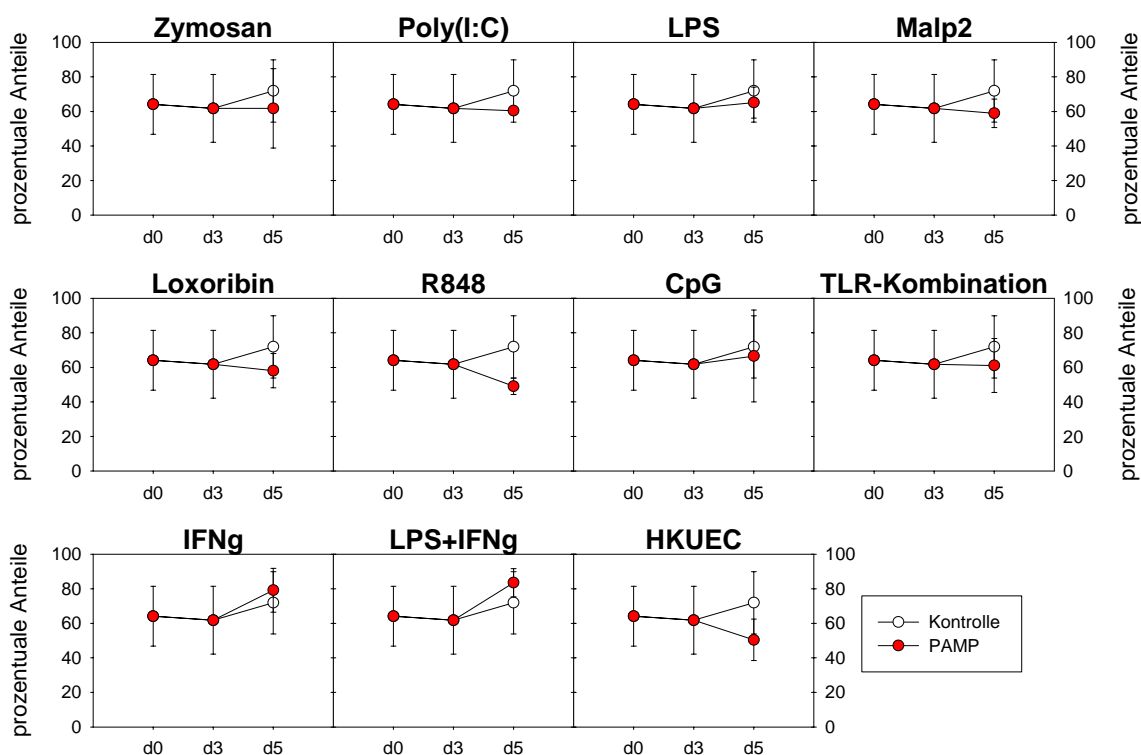


Abbildung 3.10: Expression von HLA-DR auf stimulierten DC, die aus hämatopoetischen Stammzellen (d0) generiert wurden. Die unreifen DC (d3) wurden für 48 h mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert (d5). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (s. Anhang). [n=2-19]

Das humane Leukozytenantigen HLA-DR (MHC Klasse II) war zu etwas mehr als 60% auf den aus HPC generierten DC zu detektieren (Abb. 3.10). Die Stimulation der DC mit den einzelnen PAMP führte zu einem leichten Abfall der HLA-DR Expression. Dabei hatten R848 und die *E.coli* den größten Einfluss und regulierten die HLA-DR Expression um etwa 20% herab. Im Gegensatz dazu führte die Inkubation der DC mit IFN γ zu einem leichten Anstieg, die Stimulation mit LPS und IFN γ zu einem deutlichen Anstieg der HLA-DR positiven Zellen.

Zur besseren Übersicht sind die phänotypischen Eigenschaften der stimulierten DC, welche aus hämatopoetischen Stammzellen generiert wurden, in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

Stimulation	Oberflächenmarker	Absolute Expression	Kontrolle subtrahiert
Zymosan	CD80		
	CD83		
	CD86all		
	CD86high		
	HLA-DR		
Poly(I:C)	CD80		
	CD83		
	CD86all		
	CD86high		
	HLA-DR		
LPS	CD80		
	CD83		
	CD86all		
	CD86high		
	HLA-DR		
Malp2	CD80		
	CD83		
	CD86all		
	CD86high		
	HLA-DR		
Loxoribin	CD80		
	CD83		
	CD86all		
	CD86high		
	HLA-DR		
R848	CD80		
	CD83		
	CD86all		
	CD86high		
	HLA-DR		
CpG DNA	CD80		
	CD83		
	CD86all		
	CD86high		
	HLA-DR		
TLR-Kombination	CD80		
	CD83		
	CD86all		
	CD86high		
	HLA-DR		
IFN γ	CD80		
	CD83		
	CD86all		
	CD86high		
	HLA-DR		
LPS+IFN γ	CD80		
	CD83		
	CD86all		
	CD86high		
	HLA-DR		
HKUEC	CD80		
	CD83		
	CD86all		
	CD86high		
	HLA-DR		

Tabelle 3.2: Zusammenfassung der phänotypischen Eigenschaften neonataler stimulierter HPC-DC. Die Farbkodierung zeigt mit zunehmender Farbintensität die zunehmende Oberflächenexpression der einzelnen Marker. Die erste Farbspalte stellt die Gesamtexpression der jeweiligen Oberflächenmarker dar. In der zweiten Farbspalte ist die Expression auf den unstimulierten Zellen (Kontrolle) von der Expression auf den stimulierten Zellen subtrahiert worden. Diese Spalte verdeutlicht somit die Zunahme der Expression nach Stimulation der Zellen.

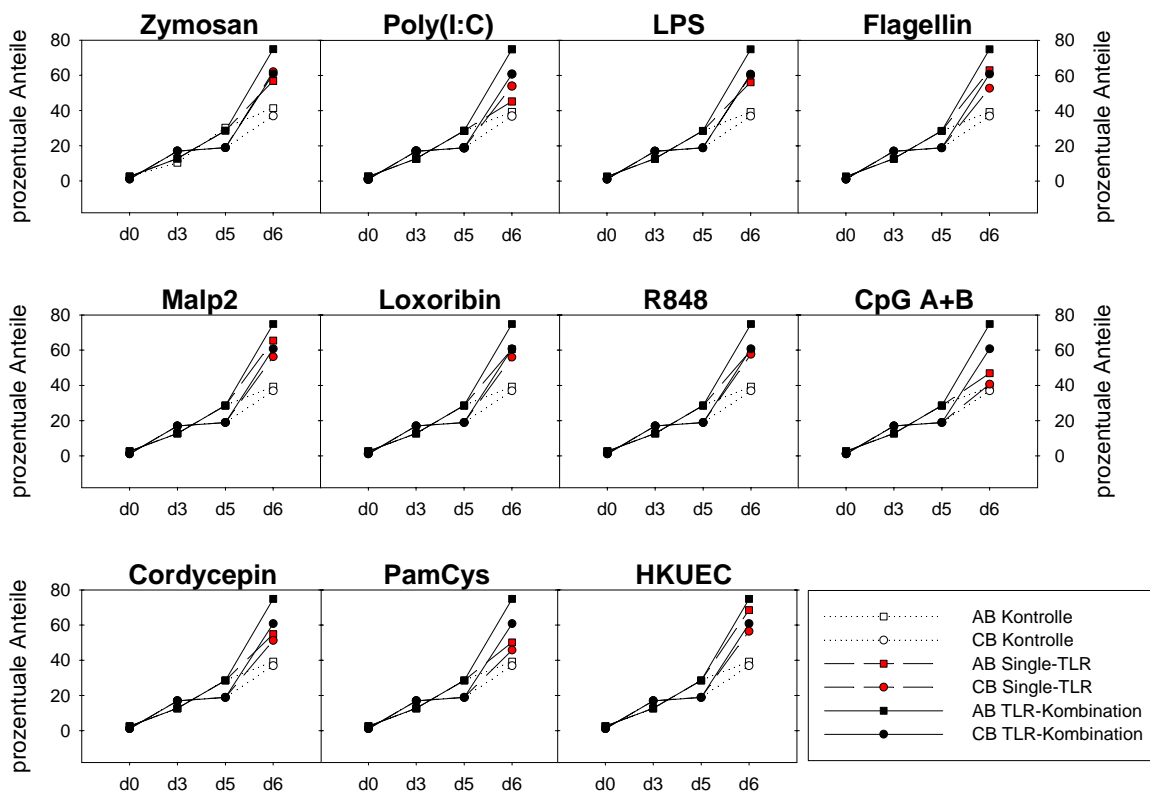
In *Tabelle 3.2* ist besonders deutlich zu erkennen, dass die Kombination von LPS und IFN γ die Hochregulierung aller Kostimulatoren bzw. Reifungsmarker induziert. Gut sichtbar anhand der weißen Banden ist der geringe Einfluss der TLR6- (Malp2) und TLR7-Liganden (Loxoribin) auf die Expression der Oberflächenmoleküle. Einen nur schwachen regulatorischen Einfluss auf die Oberflächenexpression der Reifungsmarker hatten Poly(I:C), LPS, R848, CpG DNA, IFN γ und die HKUEC. Zymosan und die Kombination aller TLR-Liganden induzierten die Hochregulierung von CD80, CD83 und CD86high. Die Übersicht macht deutlich, dass die dendritischen Zellen im unstimulierten Zustand bereits mit einer hohen Anzahl des MHC Klasse II (HLA-DR), aber auch mit einer Vielzahl an Kostimulatoren (CD80, CD83 und CD86all) ausgestattet sind.

3.2.2. Stimulation unreifer dendritischer Zellen aus Monozyten

Unreife DC aus neonatalen und adulten Monozyten (Kap. 3.1.2.) wurden mit den PAMP Zymosan, Poly(I:C), LPS, Flagellin, Malp2, Loxoribin, R848, CpG A+B, PamCys, Cordycepin und HKUEC bzw. mit einer Kombination aus allen zur Verfügung stehenden PAMP für 24 h stimuliert (Kap. 2.10.) und geerntet. Kontrollkulturen aus derselben Zellsuspension ohne Pathogenzusatz dienten als Vergleich. Zur Phänotypisierung wurden die zu untersuchenden Zellen mit den in Kapitel 2.12.2. angegebenen Antikörpern markiert und die Expression der Kostimulatoren durchflusszytometrisch bestimmt. Die Grafiken (*Abb. 3.11-3.16*) sind nach untersuchtem Kostimulator geordnet, wobei in jeder Grafik die unstimulierten Kontrollen und die Kombination aller TLR-Liganden gegen die einzelnen PAMP aufgetragen sind.

3.2.2.1. Expression von CD80

A)



B)

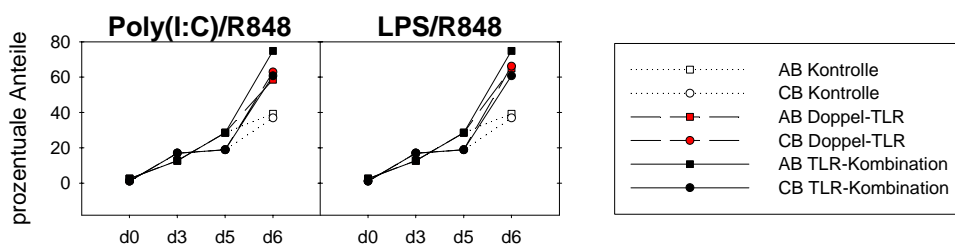


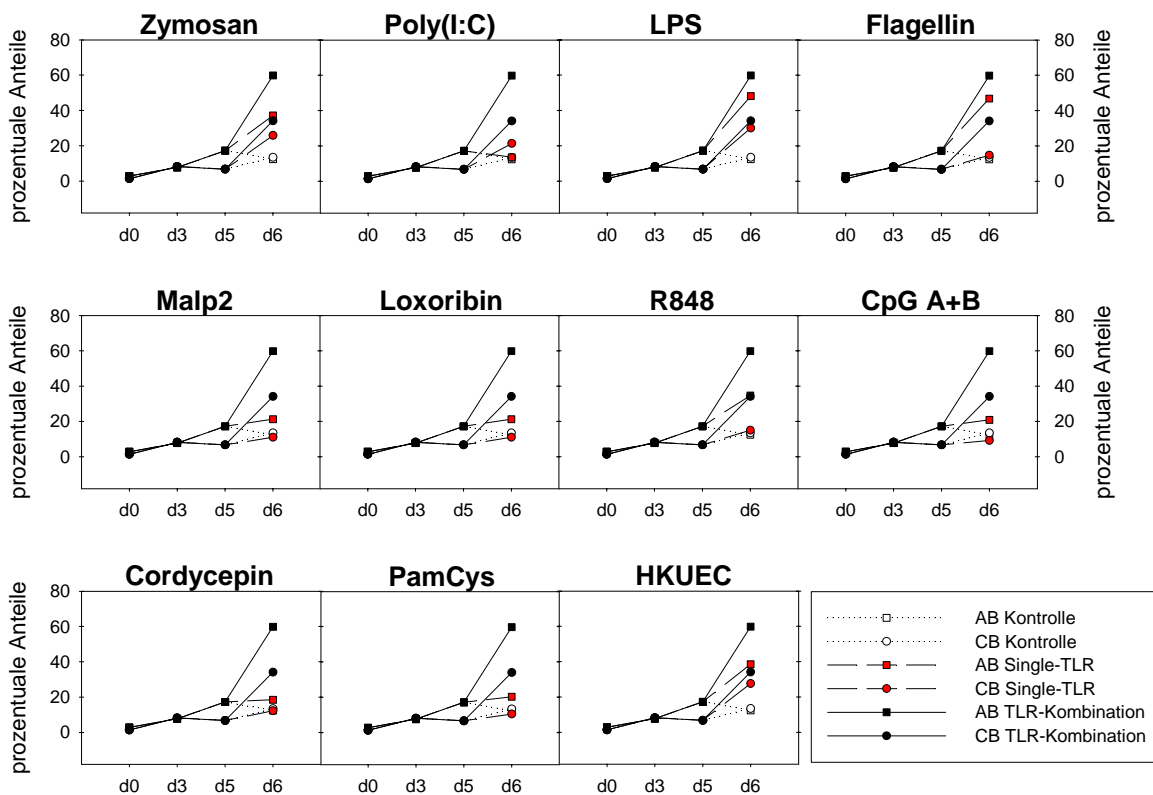
Abbildung 3.11: Expression von CD80 auf stimulierten DC aus Monozyten (d0) generiert. Die unreifen DC (d3) wurden nach einem Mediumwechsel an Tag 5 (d5) für 24 h mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert (d6). In **A**) wird die Stimulation einzelner TLR-Liganden (Single-TLR) mit der kombinierten TLR Stimulation (TLR-Kombination) zwischen AB (adult) und CB (neonatal) verglichen. In **B**) werden zwei TLR stimuliert (Doppel-TLR) und mit der TLR-Kombination verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-9]

Wie aus *Abbildung 3.11* zu ersehen ist, exprimierten Monozyten im Gegensatz zu DC nur minimal den Marker CD80. Erst nach Inkubation der Zellen mit GM-CSF und IL-4 konnte eine Expression auf 17% bis 28% der unreifen DC nachgewiesen werden. Dabei war die Expression auf neonatalen unreifen DC an Tag fünf der DC-Kultur um etwa 6% niedriger als auf unreifen adulten DC. Die Stimulation der DC mit den TLR-Liganden induzierte eine

Erhöhung der CD80 Expression, wobei die kombinierte Stimulation mit allen TLR-Liganden sowohl bei neonatalen wie bei adulten DC den größten Einfluss hatte. Unterschiedliche Reaktionsmuster zeigten die DC nach Inkubation mit Poly(I:C), Flagellin, Malp2, CpG und den HKUEC: die adulten DC exprimierten mehr CD80 als die neonatalen DC. Während bei den adulten Zellen kein Einzel-Stimulus die höchste Expression von CD80 induzierte, die die Kombination bewirkte, reagierten die neonatalen DC mit Ausnahme von Cordycepin, PamCys und CpG auf die Einzel-TLR-Liganden mit einer annähernd hohen CD80 Expression wie auf die Kombination. Nach Inkubation der DC mit den Kombinationen aus Poly(I:C) und ssRNA bzw. LPS und ssRNA wurden in adulten und neonatalen DC über 60% CD80 positive Zellen detektiert.

3.2.2.2. Expression von CD83

A)



B)

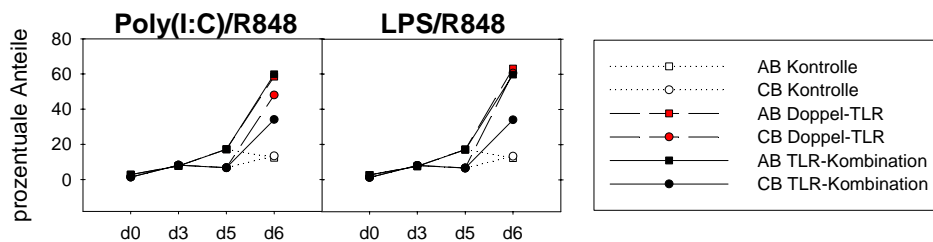


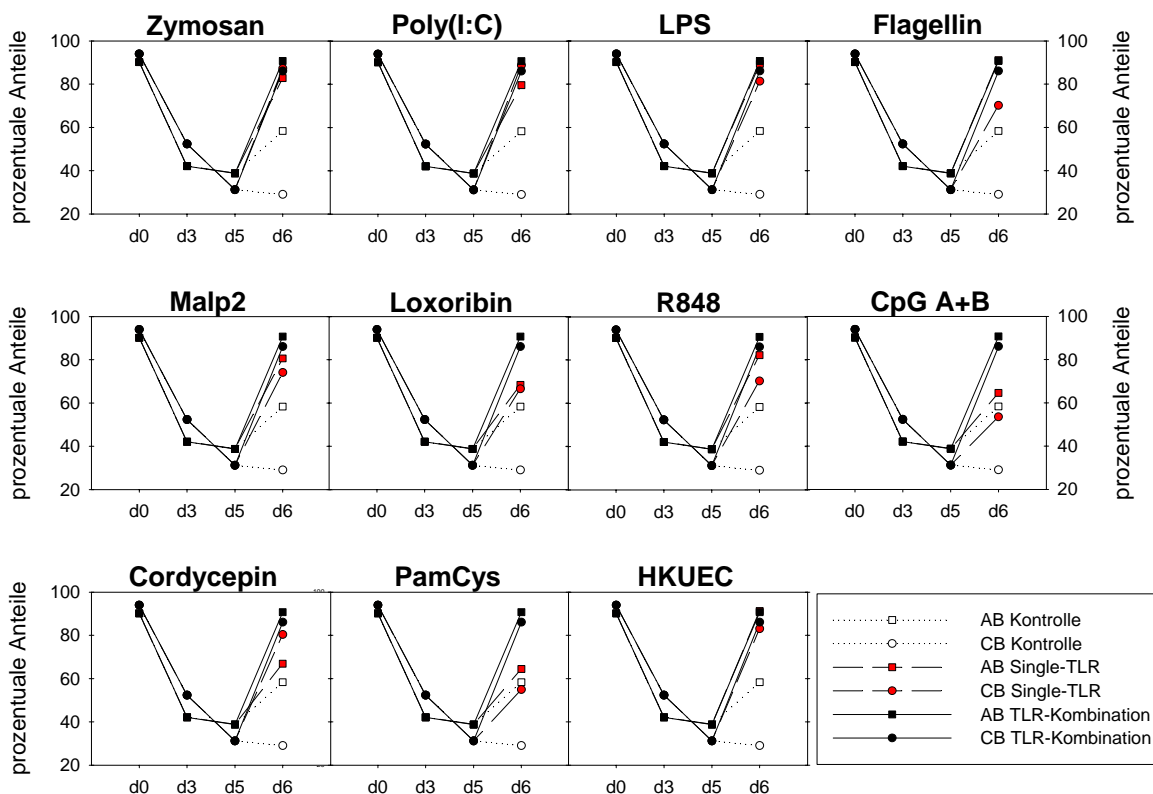
Abbildung 3.12: Expression von CD83 auf stimulierten DC aus Monozyten (d0) generiert. Die unreifen DC (d3) wurden nach einem Mediumwechsel an Tag 5 (d5) für 24 h mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert (d6). In **A**) wird die Stimulation einzelner TLR-Liganden (Single-TLR) mit der kombinierten TLR Stimulation (TLR-Kombination) zwischen AB (adult) und CB (neonatal) verglichen. In **B**) werden zwei TLR stimuliert (Doppel-TLR) und mit der TLR-Kombination verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-9]

Die Expression des Kostimulators CD83 konnte auf Monozyten und unreifen neonatalen DC nicht, auf unreifen adulten DC nur in sehr geringem Ausmaß nachgewiesen werden (Abb. 3.12). Die Stimulation der DC mit Poly(I:C), Malp2, Loxoribin, CpG, Cordycepin und PamCys induzierte weder in adulten noch in neonatalen DC die Expression von CD83. Im Gegensatz dazu konnte die Inkubation der DC mit Zymosan, LPS und den HKUEC die prozentualen Anteile der CD83-positiven Zellen erhöhen. Auffällig war Flagellin, welches

ausschließlich in adulten DC die Expression von CD83 bewirkte. Nach Stimulation aller TLR wurde ein Anstieg der CD83-Expression von 17% auf 60% auf adulten DC und von 9% auf 38% auf neonatalen DC detektiert. Die Kombination aus Poly(I:C) und R848 bzw. LPS und R848 stimulierte die adulten DC zu gleichen Intensität von CD83, wie sie mit der kompletten TLR-Kombination erreicht wurden. Die neonatalen DC, welche mit der Doppelkombination stimuliert wurden, exprimierten mehr CD83, als die neonatalen DC, welche mit der kompletten TLR-Liganden-Kombination aktiviert wurden.

3.2.2.3. Expression von CD86*all*

A)



B)

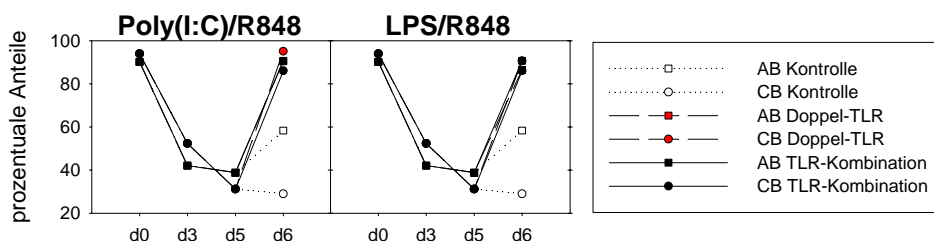


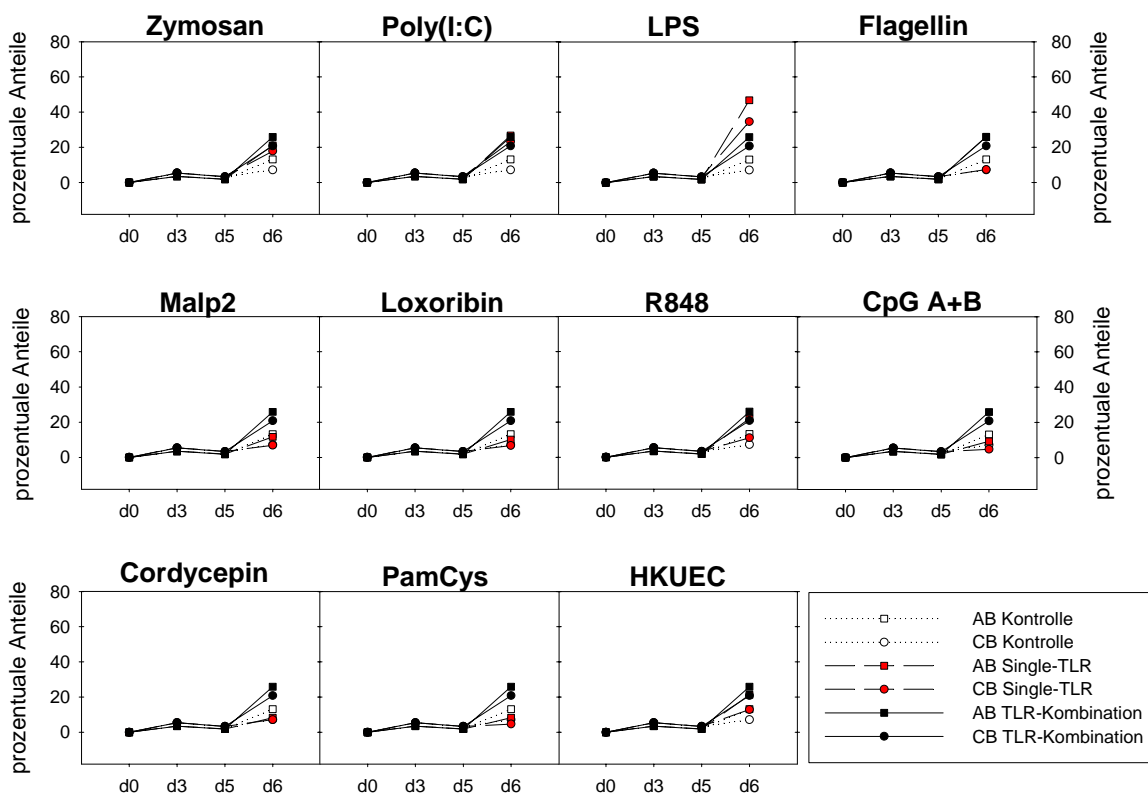
Abbildung 3.13: Expression von CD86*all* auf stimulierten DC aus Monozyten (d0) generiert. Die unreifen DC (d3) wurden nach einem Mediumwechsel an Tag 5 (d5) für 24 h mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert (d6). In **A**) wird die Stimulation einzelner TLR-Liganden (Single-TLR) mit der kombinierten TLR Stimulation (TLR-Kombination) zwischen AB (adult) und CB (neonatal) verglichen. In **B**) werden zwei TLR stimuliert (Doppel-TLR) und mit der TLR-Kombination verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-9]

Im Gegensatz zu CD80 und CD83 konnte auf allen Monozyten die Expression des CD86*all* nachgewiesen werden (Abb. 3.13). Die Inkubation mit GM-CSF und IL-4, d.h. die Generierung unreifer DC führte sowohl bei adulten als auch bei neonatalen DC zur Reduktion der CD86*all* Expression auf 32% bei neonatalen DC bis 38% bei adulten DC. Während nur etwa 30% der unstimulierten neonatalen DC CD86*all* exprimierten, war CD86*all* auf 57% der unstimulierten adulten DC nachzuweisen. In neonatalen DC bewirkten alle TLR-Liganden

einen Anstieg der CD86*all*-Expression, mit Zymosan, Poly(I:C), LPS, Cordycepin, HKUEC und der Kombination auf annähernd 100%. In adulten DC hatte Loxoribin, CpG, Cordycepin und PamCys keinen Einfluss auf die CD86*all*-Expression, während die restlichen TLR-Liganden einen Anstieg der CD86*all*-Expression auf etwa 100% induzierten. Die Stimulation von zwei TLR gleichzeitig führte zu einem Anstieg der CD86*all*-positiven Zellen auf über 80%. Dabei unterschieden sich die adulten nur leicht von den neonatalen DC, welche mit Poly(I:C) in Kombination mit R848 eine leicht höhere CD86*all* Expression zeigten, als die adulten DC.

3.2.2.4. Expression von CD86^{high}

A)



B)

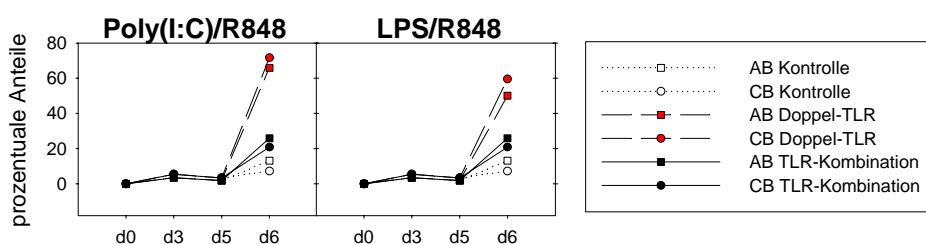


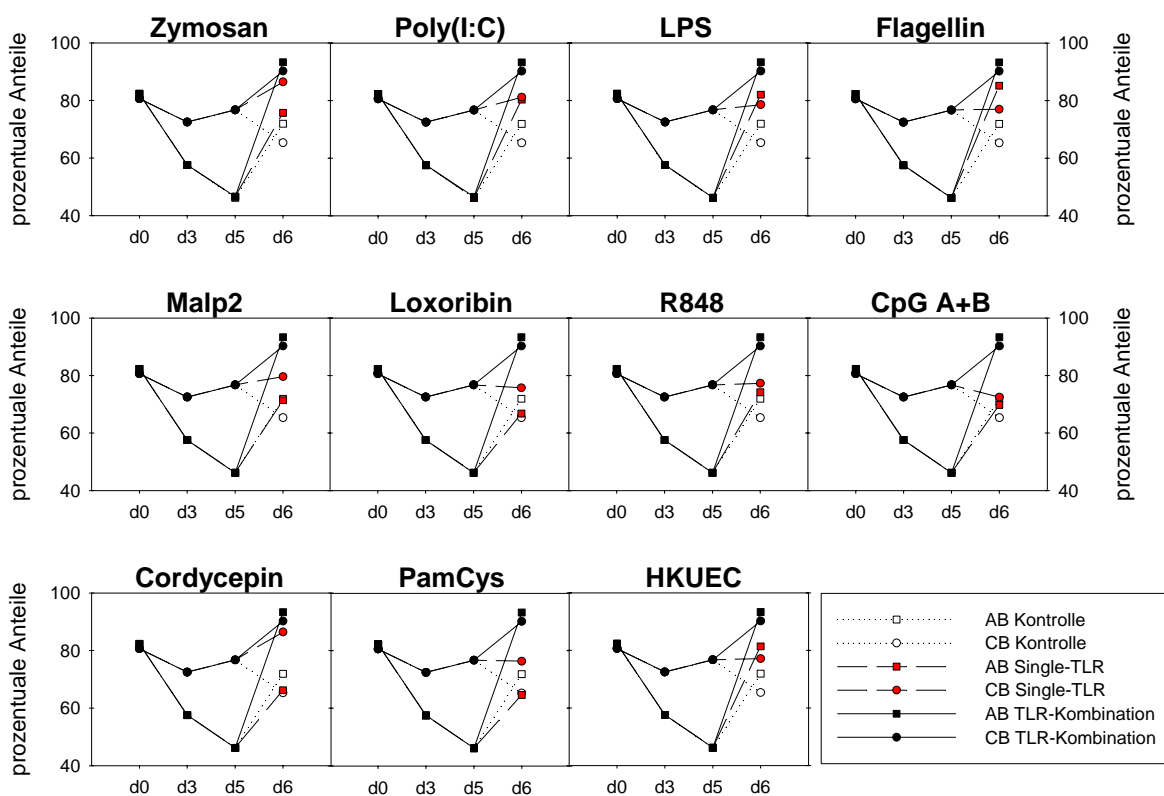
Abbildung 3.14: Expression von CD86^{high} auf stimulierten DC aus Monozyten (d0) generiert. Die unreifen DC (d3) wurden nach einem Mediumwechsel an Tag 5 (d5) für 24 h mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert (d6). In **A**) wird die Stimulation einzelner TLR-Liganden (Single-TLR) mit der kombinierten TLR Stimulation (TLR-Kombination) zwischen AB (adult) und CB (neonatal) verglichen. In **B**) werden zwei TLR stimuliert (Doppel-TLR) und mit der TLR-Kombination verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-9]

Weder die adulten noch die neonatalen Monozyten und unreifen DC exprimierten das CD86^{high} Oberflächenprotein (Abb. 3.14). Die Stimulation der adulten und neonatalen DC mit Zymosan, Poly(I:C), LPS, R848, HKUEC und die kombinierte Stimulation aller TLR induzierten die Expression von CD86^{high}. Dabei war besonders auffällig, dass LPS eine weitaus höhere Expression von CD86^{high} induzierte (28,8% in CB und 55% in AB) als alle anderen Stimuli, auch höher als die Kombination der TLR-Liganden, bei der die prozentualen

Anteile der CD86^{high}-positiven Zellen bei 22% für die neonatalen und bei 26% für die adulten Zellen lagen. Besonders auffallend ist der starke Einfluss einer doppelten TLR Stimulation. R848 kombiniert mit Poly(I:C) bzw. LPS induzierten im Vergleich zu den Kontrollen über 40% respektive über 30% mehr CD86^{high} exprimierende Zellen.

3.2.2.5. Expression von HLA-DR

A)



B)

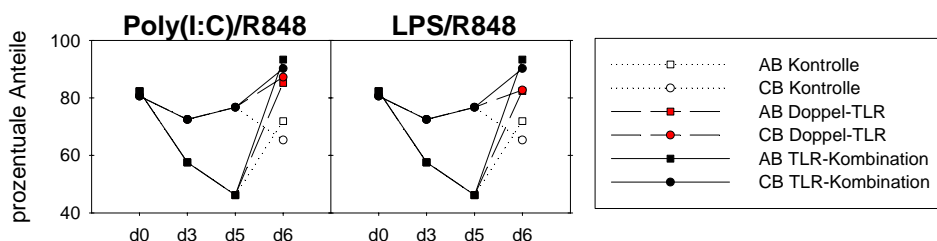
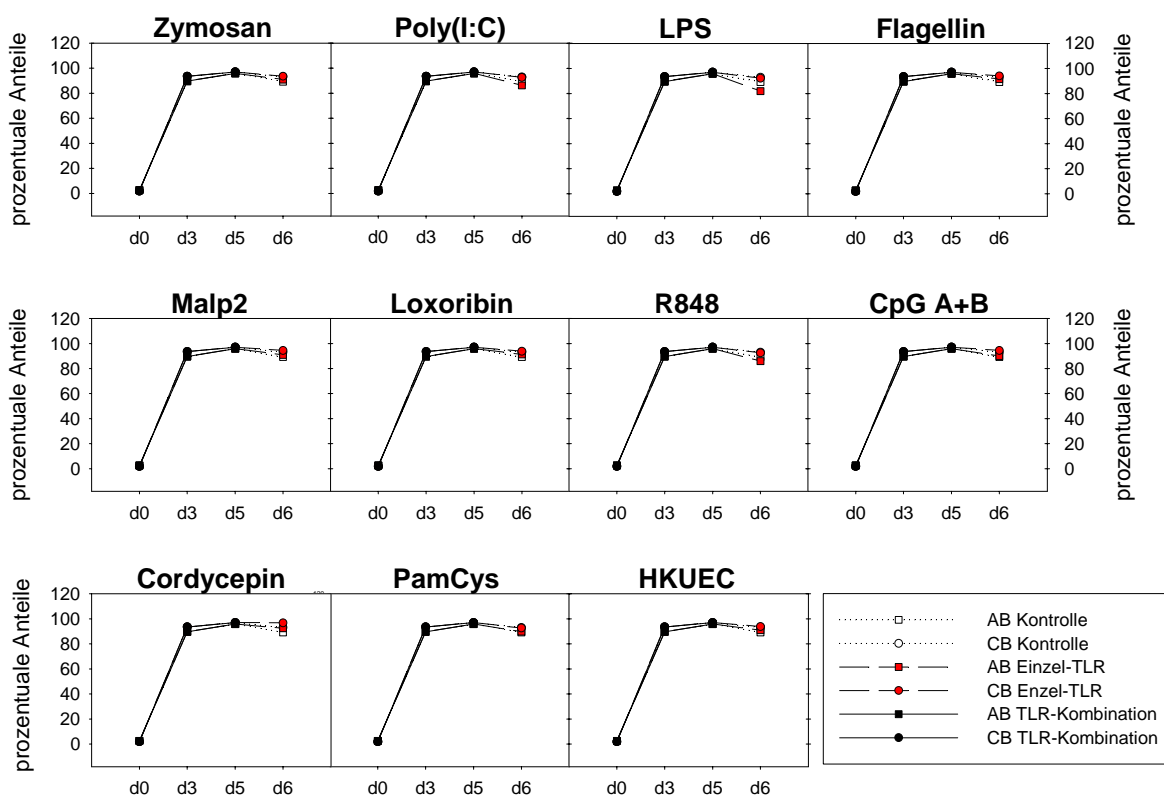


Abbildung 3.15: Expression von HLA-DR auf stimulierten DC aus Monozyten (d0) generiert. Die unreifen DC (d3) wurden nach einem Mediumwechsel an Tag 5 (d5) für 24 h mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert (d6). In **A** wird die Stimulation einzelner TLR-Liganden (Single-TLR) mit der kombinierten TLR Stimulation (TLR-Kombination) zwischen AB (adult) und CB (neonatal) verglichen. In **B** werden zwei TLR stimuliert (Doppel-TLR) und mit der TLR-Kombination verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-9]

Die prozentualen Anteile der HLA-DR-positiven Monozyten betragen sowohl im adulten als auch im neonatalen Blut 82,5% ($\pm 1\%$) (*Abb. 3.15*). Während der Generierung der unreifen dendritischen Zellen regulierten die Zellen der Erwachsenen die Expression von HLA-DR herunter, das Expressionsniveau der neonatalen Zellen blieb annähernd gleich. Nach Stimulierung der adulten und neonatalen unreifen DC mit der Kombination aller TLR-Liganden erfolgte ein starker Anstieg der HLA-DR-positiven DC auf über 90%. Mit Ausnahme von Poly(I:C), LPS und Flagellin folgte auf die Aktivierung einzelner TLR kein Anstieg der HLA-DR Expression auf den adulten DC. Die neonatalen DC hingegen reagierten auf alle TLR-Bindungen mit einer erhöhten HLA-DR Expression im Vergleich zu den unstimulierten Zellen. Dabei hatten Zymosan und Cordycepin eine besonders starke Wirkung. Die simultane Stimulation der TLR8 und TLR3 bzw. TLR4 führte zu einer Hochregulation des HLA-DR auf über 80% sowohl in den adulten als auch in den neonatalen DC.

3.2.2.6. Expression von CD209

A)



B)

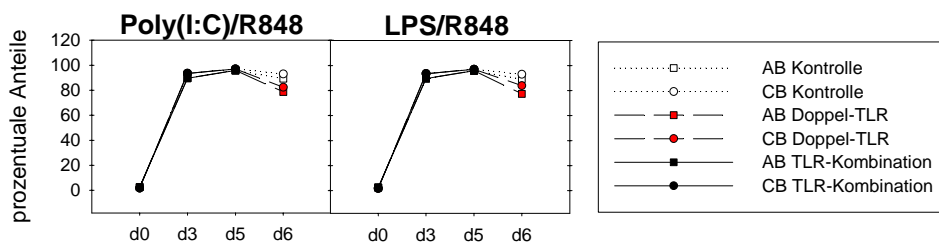


Abbildung 3.16: Expression von CD209 auf stimulierten DC aus Monozyten (d0) generiert. Die unreifen DC (d3) wurden nach einem Mediumwechsel an Tag 5 (d5) für 24 h mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert (d6). In **A**) wird die Stimulation einzelner TLR-Liganden (Single-TLR) mit der kombinierten TLR Stimulation (TLR-Kombination) zwischen AB (adult) und CB (neonatal) verglichen. In **B**) werden zwei TLR stimuliert (Doppel-TLR) und mit der TLR-Kombination verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-9]

Während die adulten sowie die neonatalen Monozyten kein CD209 exprimierten, konnte nach Inkubation der Monozyten mit GM-CSF und IL-4 zur Generierung unreifer DC die Expression von CD209 auf allen unreifen DC induziert werden (Abb. 3.16). Auch nach Stimulation der unreifen DC blieb der Anteil der CD209-positiven Zellen annähernd gleich. Die Stimulation mit der Kombination aus R848 und Poly(I:C) bzw. LPS führte sowohl in den

adulten als auch in den neonatalen DC zu einem leichten Abfall der CD209 Expression um etwa 15% im Vergleich zu den unreifen DC.

Zur besseren Übersicht sind die phänotypischen Eigenschaften der stimulierten DC, welche aus Monozyten generiert wurden, in *Tabelle 3.3* zusammengefasst.

Stimulation	Adulte mDC	Absolute Expression	Kontrolle subtrahiert	Neonatale mDC	Absolute Expression	Kontrolle subtrahiert
Zymosan	CD80			CD80		
	CD83			CD83		
	CD86all			CD86all		
	CD86high			CD86high		
	HLA-DR			HLA-DR		
Poly(I:C)	CD80			CD80		
	CD83			CD83		
	CD86all			CD86all		
	CD86high			CD86high		
	HLA-DR			HLA-DR		
LPS	CD80			CD80		
	CD83			CD83		
	CD86all			CD86all		
	CD86high			CD86high		
	HLA-DR			HLA-DR		
Flagellin	CD80			CD80		
	CD83			CD83		
	CD86all			CD86all		
	CD86high			CD86high		
	HLA-DR			HLA-DR		
Malp2	CD80			CD80		
	CD83			CD83		
	CD86all			CD86all		
	CD86high			CD86high		
	HLA-DR			HLA-DR		
Loxoribin	CD80			CD80		
	CD83			CD83		
	CD86all			CD86all		
	CD86high			CD86high		
	HLA-DR			HLA-DR		
R848/ssRNA	CD80			CD80		
	CD83			CD83		
	CD86all			CD86all		
	CD86high			CD86high		
	HLA-DR			HLA-DR		
CpG DNA	CD80			CD80		
	CD83			CD83		
	CD86all			CD86all		
	CD86high			CD86high		
	HLA-DR			HLA-DR		
Cordycepin	CD80			CD80		
	CD83			CD83		
	CD86all			CD86all		
	CD86high			CD86high		
	HLA-DR			HLA-DR		
PamCys	CD80			CD80		
	CD83			CD83		
	CD86all			CD86all		
	CD86high			CD86high		
	HLA-DR			HLA-DR		
HKUEC	CD80			CD80		
	CD83			CD83		
	CD86all			CD86all		
	CD86high			CD86high		
	HLA-DR			HLA-DR		
Poly(I:C)/R848	CD80			CD80		
	CD83			CD83		
	CD86all			CD86all		
	CD86high			CD86high		
	HLA-DR			HLA-DR		
LPS/R848	CD80			CD80		
	CD83			CD83		
	CD86all			CD86all		
	CD86high			CD86high		
	HLA-DR			HLA-DR		
TLR Kombination	CD80			CD80		
	CD83			CD83		
	CD86all			CD86all		
	CD86high			CD86high		
	HLA-DR			HLA-DR		

Tabelle 3.3: Zusammenfassung der phänotypischen Eigenschaften adulter und neonataler stimulierter mDC. Die Farbkodierung zeigt mit zunehmender Farbintensität die zunehmende Oberflächenexpression der einzelnen Marker. Die erste Farbspalte stellt die Gesamtexpression der jeweiligen Oberflächenmarker dar. In der zweiten Farbspalte ist die Expression auf den unstimulierten Zellen (Kontrolle) von der Expression auf den stimulierten Zellen subtrahiert worden. Diese Spalte verdeutlicht somit die Zunahme der Expression nach Stimulation der Zellen.

Anhand der Farbkodierung ist sehr gut zu erkennen, dass die kombinierten Stimulationen sowohl bei den adulten als auch bei den neonatalen mDC den größten Einfluss auf die Hochregulierung der Kostimulatoren und Reifungsmarker hatten (Tab. 3.3). Die hellen Bereiche der Tabelle stellen die schwache Hochregulierung der Oberflächenmarker nach Stimulation der DC mit CpG DNA, Cordycepin und PamCys dar. Es wird deutlich, dass die unstimulierten mDC die Kostimulatoren CD80, CD83 und CD86 sowie den MHC Klasse II konstitutiv exprimieren.

3.2.3. Stimulation unreifer plasmazytoider dendritischer Zellen

Isolierte adulte und neonatale plasmazytoide dendritische Zellen wurden mit CpG A und CpG B stimuliert (Kap. 2.10.). Vergleichskulturen derselben Zellsuspension ohne CpG-Zusatz dienten als Kontrollen. Die stimulierten DC wurden nach 24 h gerntet, mit Fluorochrom-markierten Antikörpern gefärbt (Kap. 2.12.) und durchflusszytometrisch analysiert.

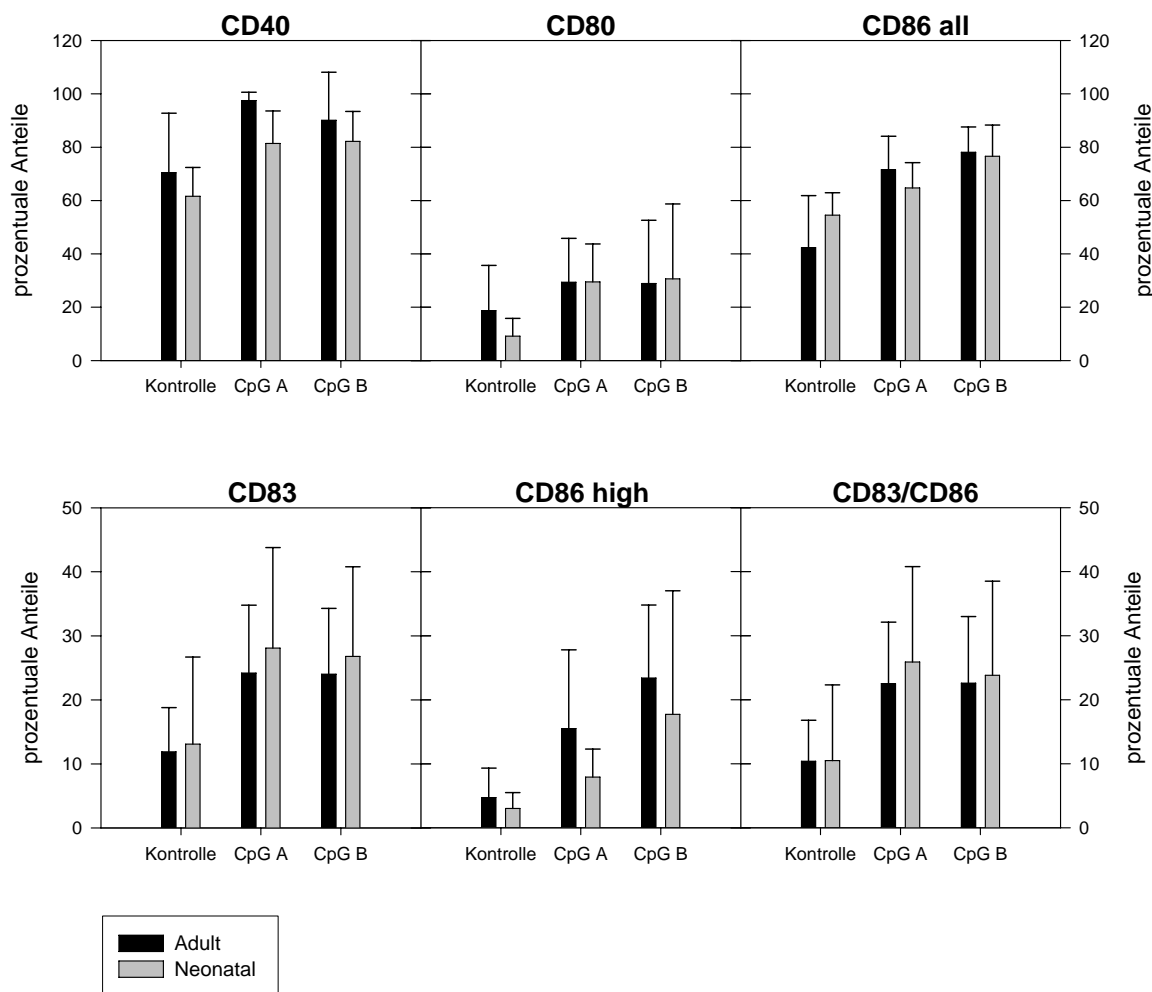


Abbildung 3.17: Expression der Kostimulatoren auf stimulierten pDC. Die pDC wurden 24 h mit CpG A und CpG B stimuliert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (s. Anhang). [n=5-6]

In *Abbildung 3.17* ist sehr gut zu erkennen, dass die plasmazytoiden DC im adulten und neonatalen Blut einen ähnlichen Phänotyp aufweisen. Nach Stimulation der pDC mit CpG-Motiven wird die Expression der Kostimulatoren CD80, CD83 und CD86 erhöht. Es konnten keine großen Unterschiede zwischen den Stimuli CpG A und CpG B detektiert werden.

Zur besseren Übersicht sind die phänotypischen Eigenschaften der stimulierten pDC in *Tabelle 3.4* zusammengefasst.

Tabelle 3.4: Zusammenfassung der phänotypischen Eigenschaften adulter und neonataler stimulierter pDC. Die Farbkodierung zeigt mit zunehmender Farbintensität die zunehmende Oberflächenexpression der einzelnen Marker. Die erste Farbspalte stellt die Gesamtexpression der jeweiligen Oberflächenmarker dar. In der zweiten Farbspalte ist die Expression auf den unstimulierten Zellen (Kontrolle) von der Expression auf den stimulierten Zellen subtrahiert worden. Diese Spalte verdeutlicht die Zunahme der Expression nach Stimulation der Zellen.

Stimulation	Adulte pDC	Absolute Expression	Kontrolle subtrahiert	Neonatale pDC	Absolute Expression	Kontrolle subtrahiert
CpG A	CD40			CD40		
	CD80			CD80		
	CD86all			CD86all		
	CD83			CD83		
	CD86high			CD86high		
	CD83/CD86			CD83/CD86		
CpG B	CD40			CD40		
	CD80			CD80		
	CD86all			CD86all		
	CD83			CD83		
	CD86high			CD86high		
	CD83/CD86			CD83/CD86		

Die Farbkodierung lässt gut erkennen, dass hinsichtlich der Expression der Kostimulatoren auf den Zellen weder zwischen adulten und neonatalen pDC noch zwischen den Stimuli große Unterschiede detektierbar sind (*Tab. 3.4*). Auffällig ist, dass die Expression der Kostimulatoren CD40 und CD86 auf den unstimulierten pDC konstitutiv exprimiert wird.

3.3. Funktionelle Eigenschaften stimulierter dendritischer Zellen

Nach Aktivierung reifen dendritische Zellen im gesunden Erwachsenen zu hoch effizienten Antigen-präsentierenden Zellen. Dabei präsentieren sie nicht nur das Antigen sondern exprimieren Kostimulatoren und beeinflussen mit ihren sekretierten Zytokinen sowohl die angeborene als auch die adaptive Immunantwort. Diese Eigenschaft macht sie zu Informationsregulatoren (sog. „gatekeepers“), die bestimmen, ob und wie das Immunsystem auf die Präsenz fremder molekularer Muster reagieren soll. Der Nachweis der Zytokinsekretion der neonatalen DC nach Stimulation mit Pathogen-assoziierten Molekülen

war somit ein wichtiger Bestandteil der vorliegenden Arbeit für den Nachweis der Funktionalität der neonatalen DC.

3.3.1. Nachweis inflammatorischer Zytokine stimulierter dendritischer Zellen aus neonatalen hämatopoetischen Stammzellen

Unreife dendritische Zellen aus neonatalen hämatopoetischen Stammzellen wurden nach Amplifikation (Kap. 2.8.) und Kultivierung mit GM-CSF und IL-4 (Kap. 2.9.1.) mit Zymosan, Poly(I:C), LPS, Malp2, Loxoribin, R848, CpG A+B, mit einer Kombination aus allen zur Verfügung stehenden PAMP, hitzeinaktivierten uropathogenen *E.coli* (HKUEC), Interferon γ (IFN γ) und einer Kombination aus LPS und IFN γ stimuliert (Kap. 2.10.). Kontrollkulturen von derselben Zellsuspension ohne Pathogenzusatz dienten als Vergleich. Nach 48 h wurden den Zellkulturen Kulturüberstand entnommen und bis zur Verwendung bei -20°C tiefgefroren. Für die Detektion des Zytokins IL-12p40 wurde die Methode des ELISA verwendet (Kap. 2.14.1.1.), IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 und TNF α wurden mit Hilfe des CBA (Kap. 2.14.2.) nachgewiesen.

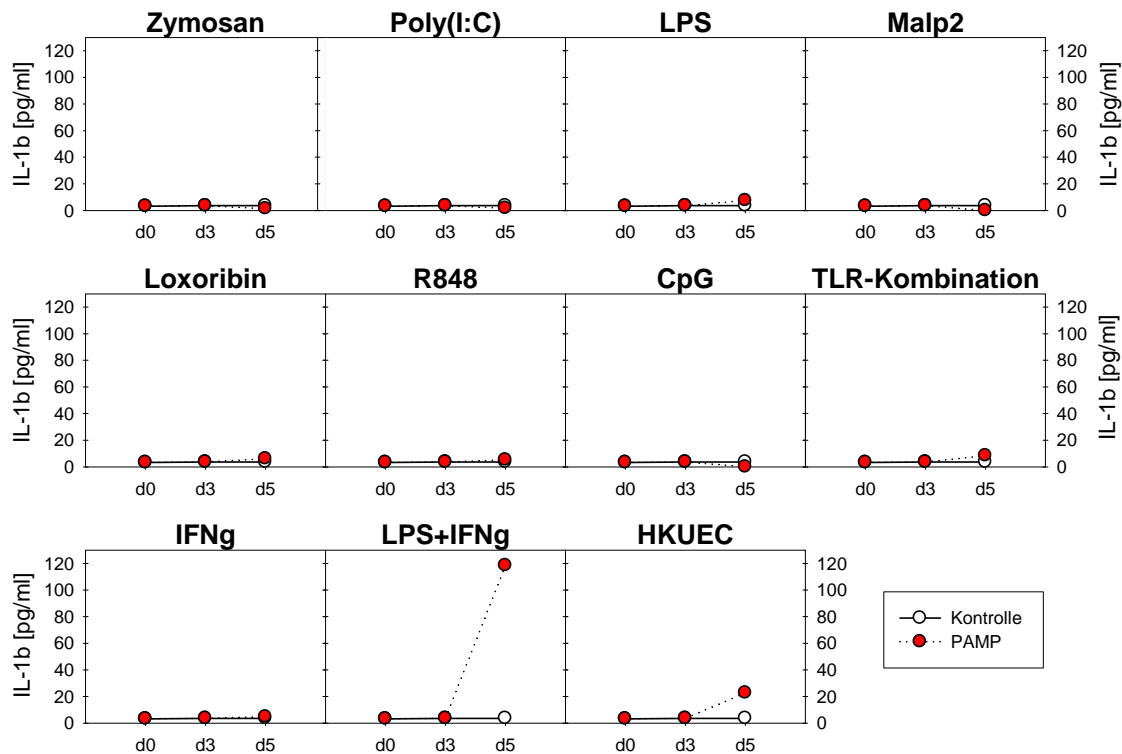
3.3.1.1. Interleukin-1 β (IL-1 β)

Abbildung 3.18: IL-1 β Produktion stimulierter DC, die aus HPC generiert wurden. Die amplifizierten HPC (d0) wurden mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenziert (d3) und für 48 h mit verschiedenen PAMP stimuliert (d5). IL-1 β wurde aus den entnommenen Kulturüberständen mit Hilfe des CBA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-15]

Interleukin β wird weder von amplifizierten HPC noch von unreifen DC sekretiert (Abb. 3.18). Die Inkubation der unreifen DC mit den verschiedenen PAMP konnte ebenfalls keine IL-1 β Produktion induzieren. Nur nach kombinierter Stimulation der TLR wurde eine geringe Menge an IL-1 β (8 pg/ml) nachgewiesen, die hitzeinaktivierten *E.coli* stimulierten die DC zu einer IL-1 β Produktion von 23 pg/ml. In der Abbildung deutlich zu erkennen, ist der große Einfluss der Kombination aus LPS und IFN γ . Wurden diese beiden Mediatoren kombiniert zugegeben, konnte eine Konzentration von über 120 pg/ml IL-1 β in den DC-Kulturüberständen nachgewiesen werden.

3.3.1.2. Interleukin-6 (IL-6)

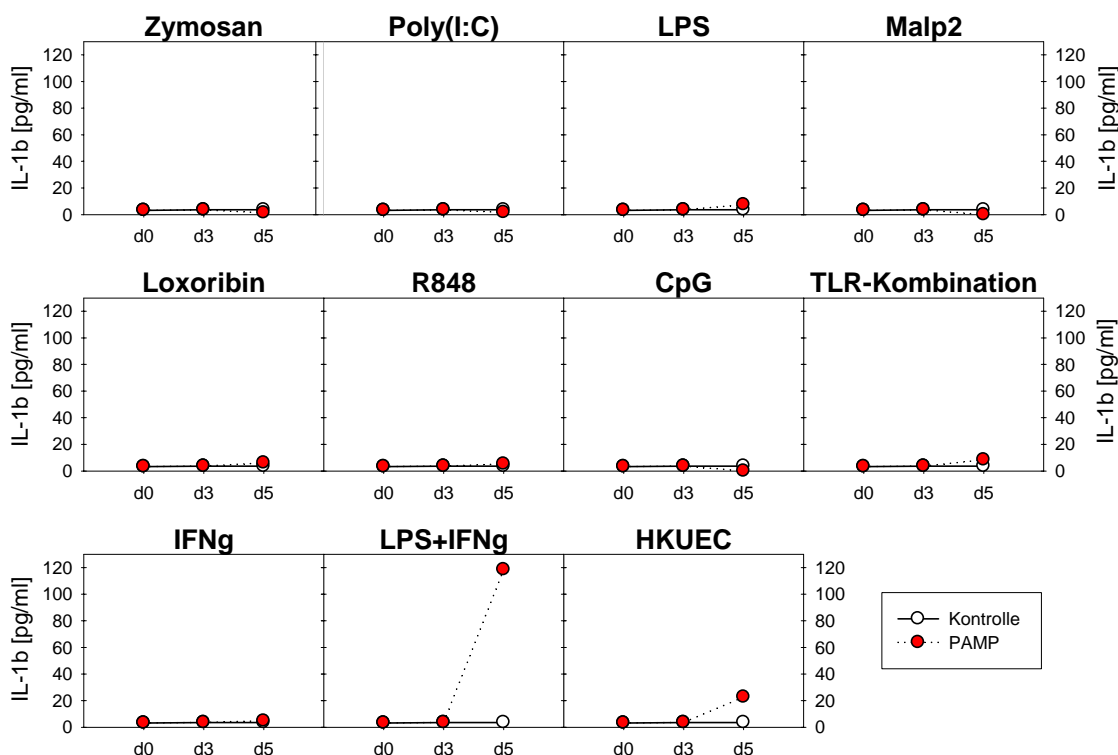


Abbildung 3.19: IL-6 Produktion stimulierter DC, die aus HPC generiert wurden. Die amplifizierten HPC (d0) wurden mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenziert (d3) und für 48 h mit verschiedenen PAMP stimuliert (d5). IL-6 wurde aus den entnommenen Kulturüberständen mit Hilfe des CBA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-15]

Weder die amplifizierten HPC noch die unreifen DC exprimierten Interleukin 6 (Abb. 3.19). Die Stimulation der TLR führte zu einer Produktion von IL-6 in unterschiedlichem Ausmaß. Während Zymosan und Loxoribin nur einen sehr geringen Einfluss auf die IL-6 Produktion hatten, konnte in den Kulturen, welche mit Poly(I:C), LPS, R848, der TLR-Liganden Kombination, IFN γ , der Kombination aus LPS und IFN γ und mit den HKUEC stimuliert wurden, große Mengen an IL-6 gemessen werden. Nach Stimulation der DC mit Poly(I:C), Malp2 und IFN γ wurden 1.000 bis 2.000 pg/ml IL-6 nachgewiesen. LPS, R848, die TLR-Liganden Kombination und die *E.coli* induzierten zwischen 2.000 und 5.000 pg/ml IL-6. Die kombinierte Zugabe von LPS und IFN γ führte in allen Messungen zum Erreichen der oberen Nachweisgrenze des durchgeführten CBA von 5.000 pg/ml.

3.3.1.3. Interleukin-8 (IL-8)

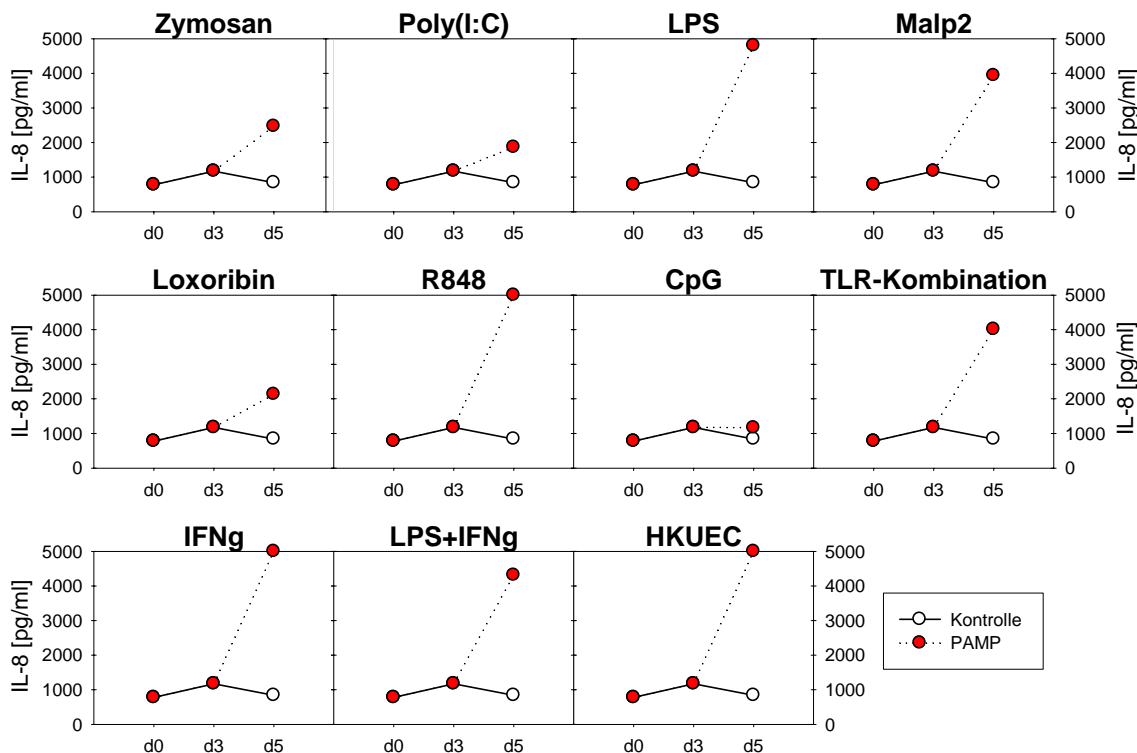


Abbildung 3.20: IL-8 Produktion stimulierter DC, die aus HPC generiert wurden. Die amplifizierten HPC (d0) wurden mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenziert (d3) und für 48 h mit verschiedenen PAMP stimuliert (d5). IL-8 wurde aus den entnommenen Kulturüberständen mit Hilfe des CBA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-15]

Interleukin 8 konnte in allen Kulturüberständen nachgewiesen werden (Abb. 3.20). Die amplifizierten HPC, die unreifen DC und die unstimulierten Vergleichskulturen produzierten zwischen 800 und 1.200 pg/ml IL-8. Bis auf CpG induzierten alle PAMP einen Anstieg der IL-8 Produktion. Dabei wurden nach Stimulation der DC mit Zymosan, Poly(I:C) und Loxoribin annähernd 2.000 pg/ml IL-8 detektiert, nach Stimulation mit LPS, Malp2, der TLR-Liganden Kombination und der Kombination aus LPS und IFN γ etwa 4.000 pg/ml IL-8 induziert. Die Nachweisgrenze des verwendeten CBA wurde in denjenigen Kulturüberständen erreicht, deren DC mit LPS, R848, IFN γ bzw. den hitzeinaktivierten *E.coli* aktiviert wurden.

3.3.1.4. Interleukin-10 (IL-10)

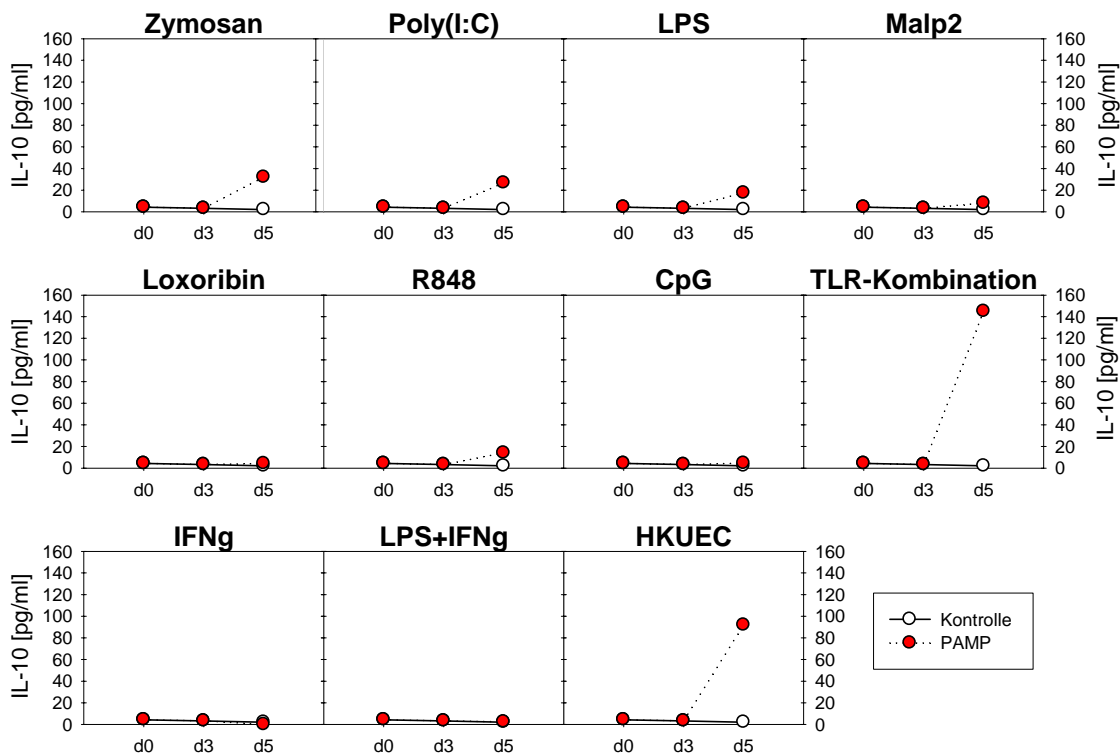


Abbildung 3.21: IL-10 Produktion stimulierter DC, die aus HPC generiert wurden. Die amplifizierten HPC (d0) wurden mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenziert (d3) und für 48 h mit verschiedenen PAMP stimuliert (d5). IL-10 wurde aus den entnommenen Kulturüberständen mit Hilfe des CBA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-15]

Interleukin-10 konnte weder in den Kulturüberständen der amplifizierten hämatopoetischen Stammzellen noch in den Kulturüberständen der unreifen DC bzw. der unstimulierten Vergleichszellen nachgewiesen werden (Abb. 3.21). Die Inkubation der unreifen DC mit Malp2, Loxoribin, den CpG, IFN γ und der Kombination aus LPS und IFN γ konnte keine IL-10 Produktion in den neonatalen DC induzieren. Nach Stimulation der TLR2, TLR3, TLR4 und TLR8 wurden bis zu 40 pg/ml IL-10 detektiert. Die Aktivierung aller TLR mit der TLR-Liganden Kombination und den HKUEC führte zu einem deutlichen Anstieg der IL-10 Konzentration in den Kulturüberständen bis zu 150 pg/ml.

3.3.1.5. Interleukin-12p40 (IL-12p40)

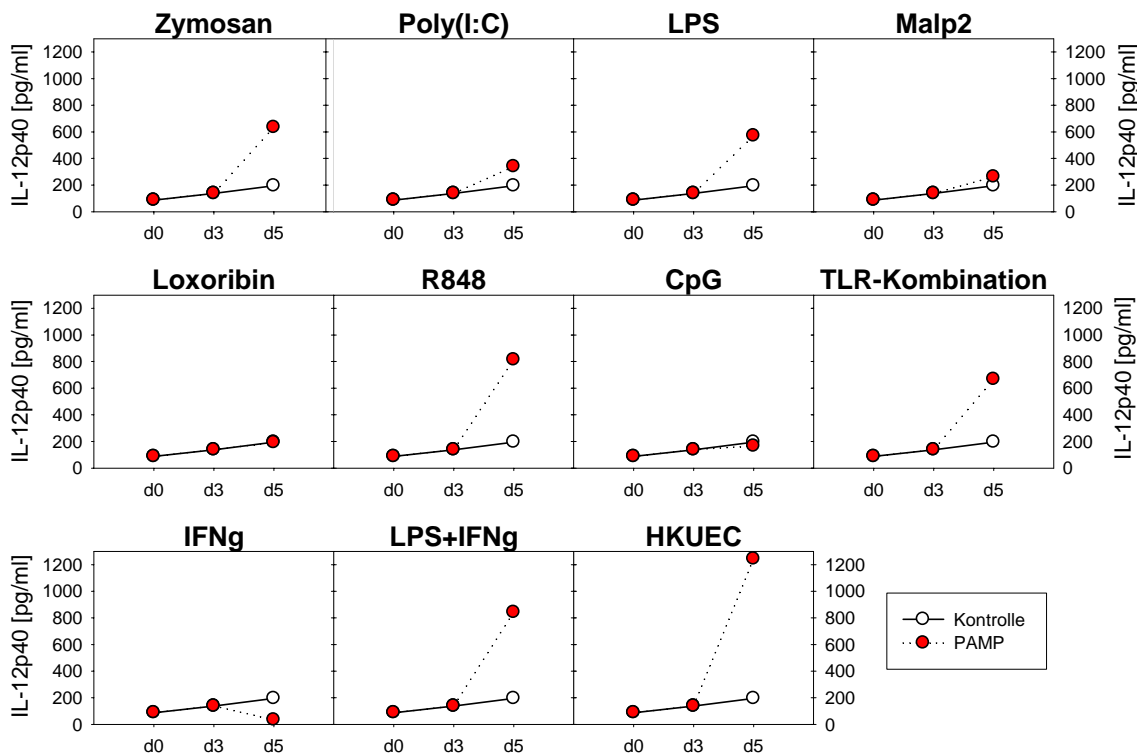


Abbildung 3.22: IL-12p40 Produktion stimulierter DC, die aus HPC generiert wurden. Die amplifizierten HPC (d0) wurden mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenziert (d3) und für 48 h mit verschiedenen PAMP stimuliert (d5). IL-12p40 wurde aus den entnommenen Kulturüberständen mit Hilfe eines ELISA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=2-23]

Die amplifizierten hämatopoetischen Stammzellen sowie die unreifen DC sekretierten nur sehr geringe Mengen der IL-12 Untereinheit IL-12p40 (Abb. 3.22). Die Inkubation der unreifen DC mit Loxoribin und den CpG induzierte keine Produktion von IL-12p40, die Inkubation mit Poly(I:C) und Malp löste nur einen geringen Anstieg der p40 Sekretion aus. Interferon γ bewirkte gar eine reduzierte IL-12p40 Konzentration im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen, in denen die IL-12p40 Produktion während der Kulturdauer von 5 Tagen proportional von 87 pg/ml auf 196 pg/ml anstieg. Die Stimulation der unreifen DC mit Zymosan, LPS, R848, der TLR-Kombination, der Kombination aus LPS und IFN γ und den hitzeinaktivierten *E.coli* führte hingegen zu einer starken Sekretion von IL-12p40. Dabei wurden Konzentrationen von 600 - 800 pg/ml nachgewiesen, die *E.coli* stimulierten die DC zu einer Produktion von über 1.200 pg/ml IL-12p40.

3.3.1.6. Interleukin-12p70 (IL-12p70)

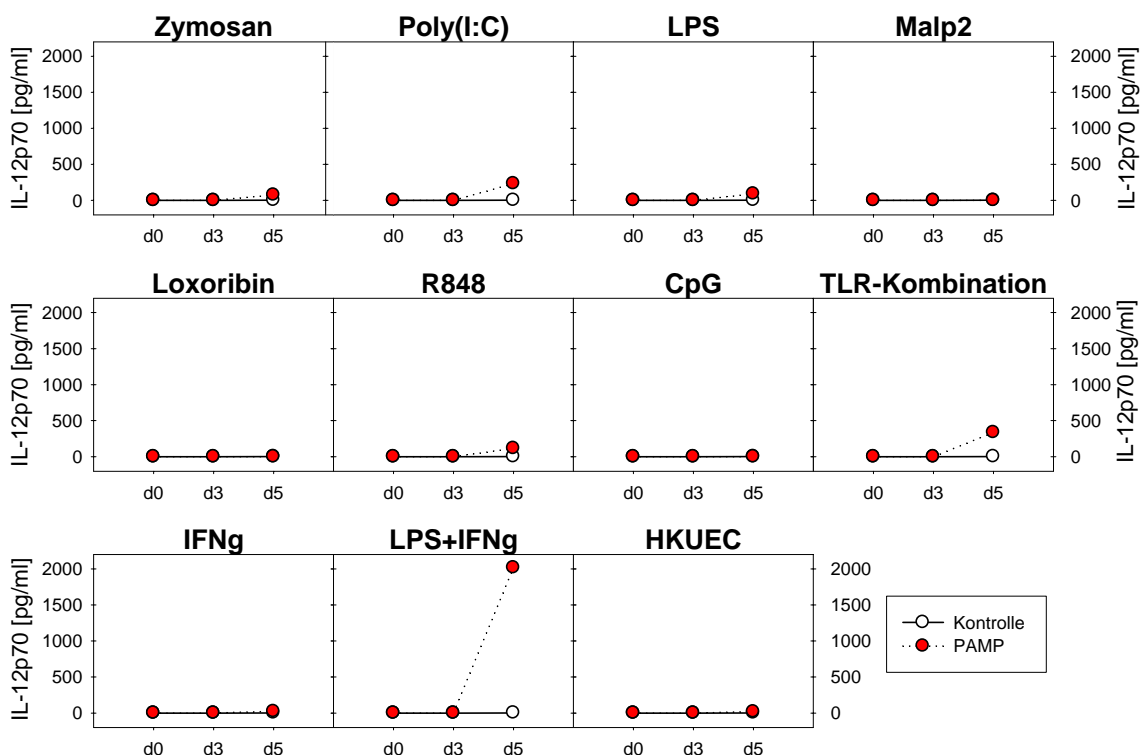


Abbildung 3.23: IL-12p70 Produktion stimulierter DC, die aus HPC generiert wurden. Die amplifizierten HPC (d0) wurden mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenziert (d3) und für 48 h mit verschiedenen PAMP stimuliert (d5). IL-12p70 wurde aus den entnommenen Kulturüberständen mit Hilfe des CBA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=2-25]

Während Malp2, Loxoribin, CpG, IFN γ und die HKUEC keinen Einfluss auf die IL-12p70 Produktion zeigten, konnten nach Inkubation der DC mit Zymosan, LPS und R848 minimale IL-12p70 Konzentrationen detektiert werden (Abb. 3.23). Poly(I:C) und die TLR-Liganden Kombination induzierten zwischen 300 und 500 pg/ml IL-12p70 in den DC-Kulturüberständen. Besonders auffällig war die hohe IL-12p70 Konzentration von über 2.000 pg/ml in den DC-Kulturen, welche mit der Kombination aus LPS und IFN γ stimuliert wurden.

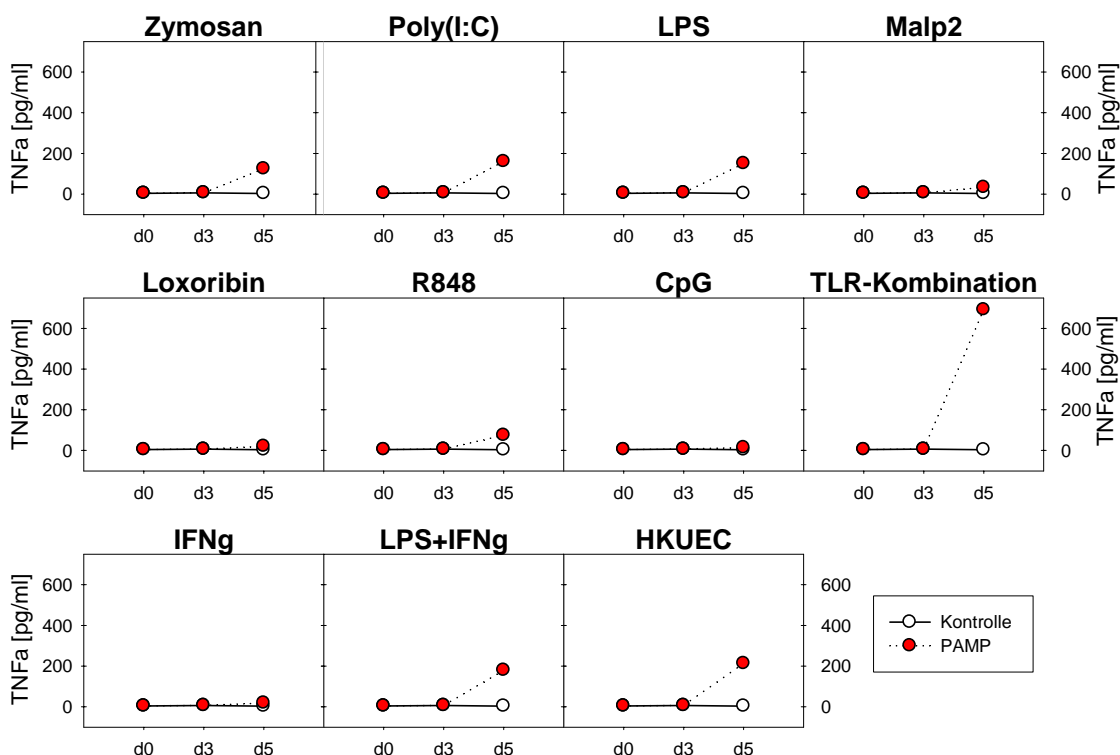
3.3.1.7. Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α)

Abbildung 3.24: TNF α Produktion stimulierter DC, die aus HPC generiert wurden. Die amplifizierten HPC (d0) wurden mit GM-CSF und IL-4 zu unreifen DC differenziert (d3) und für 48 h mit verschiedenen PAMP stimuliert (d5). TNF α wurde aus den entnommenen Kulturüberständen mit Hilfe des CBA gemessen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=2-16]

Der Tumor-Nekrose-Faktor α wird weder von amplifizierten HPC noch von unreifen DC produziert (Abb. 3.24). Loxoribin, CpG und IFN γ hatten keinen Einfluss auf die TNF α Produktion der DC. Mit Malp2 und R848 konnte eine minimale TNF α Sekretion in den DC Kulturen induziert werden. Zymosan, Poly(I:C), LPS, die Kombination aus LPS und IFN γ und die hitzeinaktivierten *E.coli* stimulierten die unreifen DC dazu, zwischen 150 - 200 pg/ml TNF α zu produzieren. Die Bindung aller TLR mit Hilfe der TLR-Liganden Kombination führte zu einer TNF α Sekretion von etwa 700 pg/ml.

Zur besseren Übersicht ist die Zytokinproduktion der stimulierten dendritischen Zellen, die aus hämatopoetischen Stammzellen differenziert wurden, in Tabelle 3.5 zusammengefasst.

Stimulation	Zytokin	Absolut-Werte	Kontrolle subtrahiert
Zymosan	IL-1 β		
	IL-6		
	IL-8		
	IL-10		
	IL-12p40		
	IL-12p70		
	TNF α		
Poly(I:C)	IL-1 β		
	IL-6		
	IL-8		
	IL-10		
	IL-12p40		
	IL-12p70		
	TNF α		
LPS	IL-1 β		
	IL-6		
	IL-8		
	IL-10		
	IL-12p40		
	IL-12p70		
	TNF α		
Malp2	IL-1 β		
	IL-6		
	IL-8		
	IL-10		
	IL-12p40		
	IL-12p70		
	TNF α		
Loxoribin	IL-1 β		
	IL-6		
	IL-8		
	IL-10		
	IL-12p40		
	IL-12p70		
	TNF α		
R848	IL-1 β		
	IL-6		
	IL-8		
	IL-10		
	IL-12p40		
	IL-12p70		
	TNF α		
CpG DNA	IL-1 β		
	IL-6		
	IL-8		
	IL-10		
	IL-12p40		
	IL-12p70		
	TNF α		
TLR-Kombination	IL-1 β		
	IL-6		
	IL-8		
	IL-10		
	IL-12p40		
	IL-12p70		
	TNF α		
IFN γ	IL-1 β		
	IL-6		
	IL-8		
	IL-10		
	IL-12p40		
	IL-12p70		
	TNF α		
LPS+IFN γ	IL-1 β		
	IL-6		
	IL-8		
	IL-10		
	IL-12p40		
	IL-12p70		
	TNF α		
HKUEC	IL-1 β		
	IL-6		
	IL-8		
	IL-10		
	IL-12p40		
	IL-12p70		
	TNF α		

Tabelle 3.5: Zusammenfassung der Zytokinproduktion stimulierter DC, die aus HPC differenziert wurden. Die Farbkodierung zeigt mit zunehmender Farbtintensität die zunehmende Zytokinproduktion. Die erste Farbspalte stellt die Gesamtproduktion der jeweiligen Zytokine dar. In der zweiten Farbspalte ist die Zytokinproduktion der unstimulierten Zellen (Kontrolle) von der Zytokinproduktion der stimulierten Zellen subtrahiert worden. Diese Spalte verdeutlicht somit die Zunahme der Zytokinproduktion nach Stimulation der Zellen.

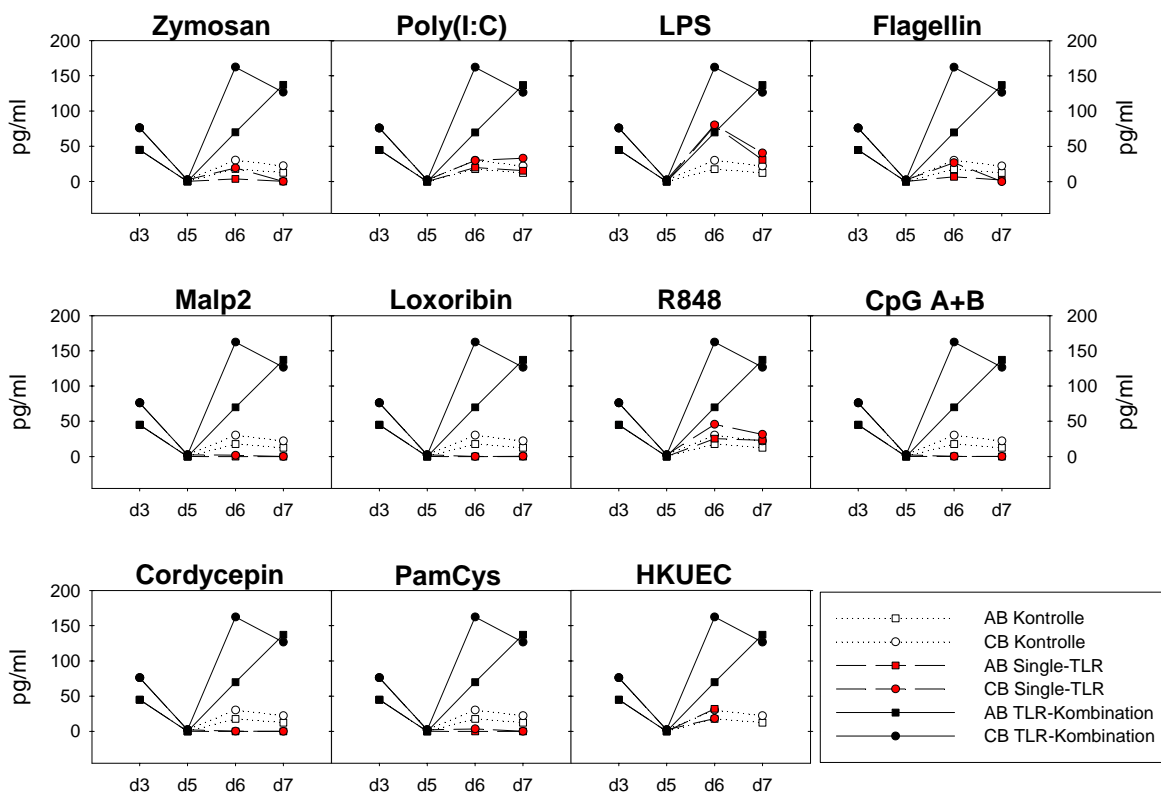
Die Farbkodierung macht den großen Einfluss kombinierter TLR Stimulation auf die Produktion inflammatorischer Zytokine durch die dendritischen Zellen offensichtlich (*Tab. 3.5*). Auch nach Abzug der Zytokinproduktion der unstimulierten Kontrollkulturen konnten große Mengen an inflammatorischen Zytokinen in den stimulierten DC nachgewiesen werden. Im Gegensatz dazu induzieren die TLR-Liganden Malp2, Loxoribin und die CpG DNA nur eine minimale Zytokinsynthese. Die Inkubation der HPC-DC mit Zymosan, Poly(I:C), LPS, R848 und IFN γ führte zu einer nachweisbaren Zytokinproduktion.

3.3.2. Nachweis inflammatorischer Zytokine stimulierter dendritischer Zellen aus Monozyten

Unreife DC aus neonatalen und adulten Monozyten (Kap. 3.1.2.) wurden mit den PAMP Zymosan, Poly(I:C), LPS, Flagellin, Malp2, Loxoribin, R848, CpG A+B, PamCys, Cordycepin und HKUEC bzw. mit einer Kombination aus allen zur Verfügung stehenden PAMP stimuliert (Kap. 2.10.), Vergleichskulturen derselben Zellsuspension ohne Pathogenzusatz dienten als Kontrollen. Die Kulturüberstände wurden nach 24 h bzw. nach 48 h entnommen und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Für den Nachweis der inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 und TNF α wurde der CBA (Kap. 2.14.2.) verwendet, die Detektion von IL-12p40 erfolgte mit Hilfe eines ELISA (Kap. 2.14.1.1.). Die Grafiken (*Abb. 3.25-3.32*) sind nach untersuchtem Zytokin geordnet, wobei in jeder Grafik die unstimulierten Kontrollen und die Kombination aller TLR-Liganden gegen die einzelnen PAMP aufgetragen sind.

3.3.2.1. Interleukin-1 beta (IL-1 β)

A)



B)

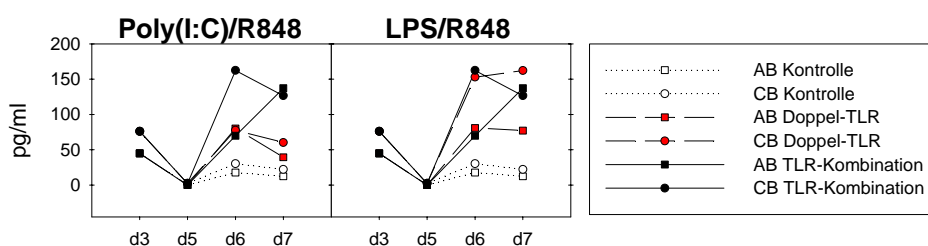


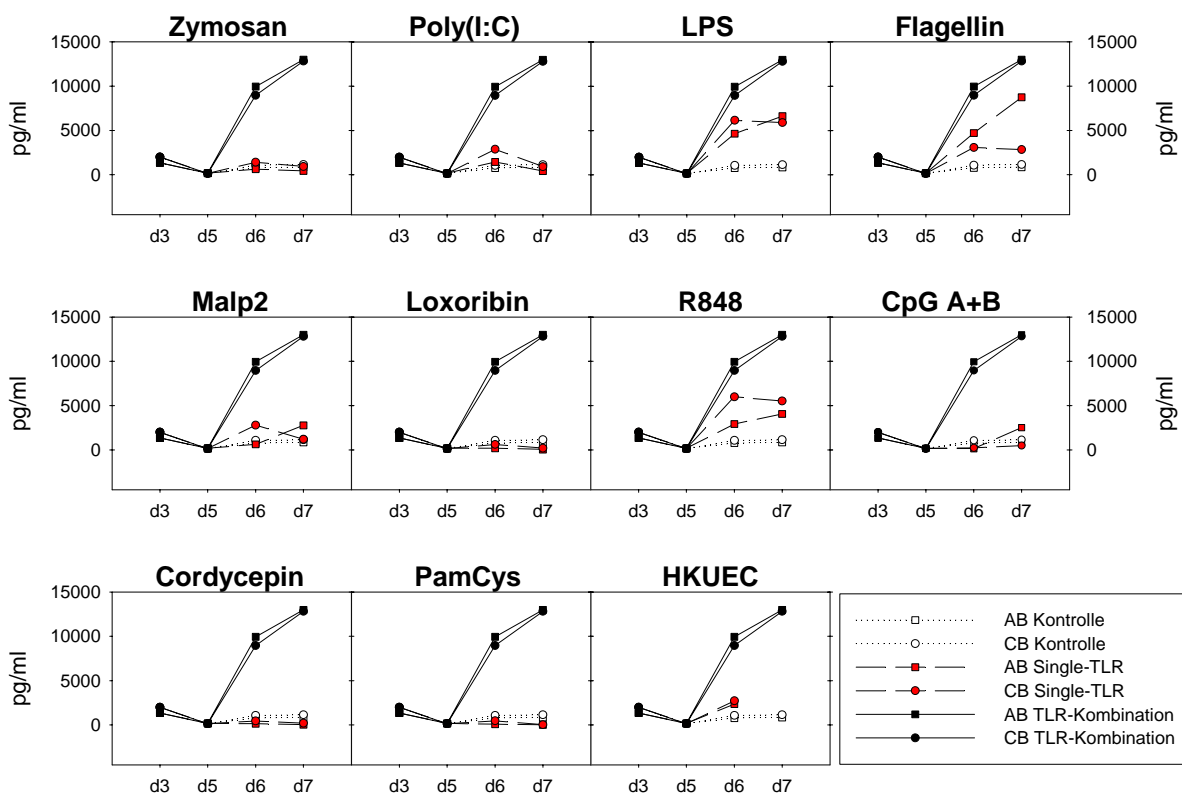
Abbildung 3.25: IL-1 β Produktion stimulierter mDC. Die unreifen DC (d3) wurden nach einem Mediumwechsel an Tag 5 (d5) für 24 h (d6) bzw. für 48 h (d7) mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert. In **A**) wird die Stimulation einzelner TLR-Liganden (Single-TLR) mit der kombinierten TLR Stimulation (TLR-Kombination) zwischen AB (adult) und CB (neonatal) verglichen. In **B**) werden zwei TLR stimuliert (Doppel-TLR) und mit der TLR-Kombination verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-14]

Durch die Stimulation der DC mit allen TLR-Liganden konnte eine bis 170fach höhere IL-1 β Sekretion im Vergleich zu den Kontrollansätzen mit den unstimulierten Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.25). Dabei reagierten die neonatalen DC bereits nach 24 h Stimulation mit einer Produktion von 163 pg/ml IL-1 β , während die adulten DC nach 24 h Stimulation nur 70 pg/ml IL-1 β sezernierten. Nach 48 h Stimulation aller TLR war die Produktion von IL-1 β in beiden Zellpopulationen annähernd gleich (130 pg/ml). Mit Ausnahme von LPS konnten die

einzelnen TLR-Liganden nahezu keine IL-1 β Produktion in adulten und neonatalen DC induzieren. Die Inkubation der Zellen mit LPS führte zu einem Anstieg der IL-1 β Konzentration von 0 auf 80 pg/ml in der adulten sowie in der neonatalen mDC-Kultur. Die Inkubation der DC mit jeweils zwei TLR-Liganden (R848 mit Poly(I) bzw. mit LPS) induzierte bereits nach 24 h einen Anstieg der IL-1 β Konzentration in den adulten auf 50 pg/ml und in den neonatalen DC-Überständen auf über 150 pg/ml. Nach weiteren 24 h Doppelstimulation mit R848/Poly(I:C) sank die IL-1 β Konzentration während sie in der neonatalen DC-Kultur in Gegenwart von R848/LPS auf 160 pg/ml anstieg.

3.3.2.2. Interleukin-6 (IL-6)

A)



B)

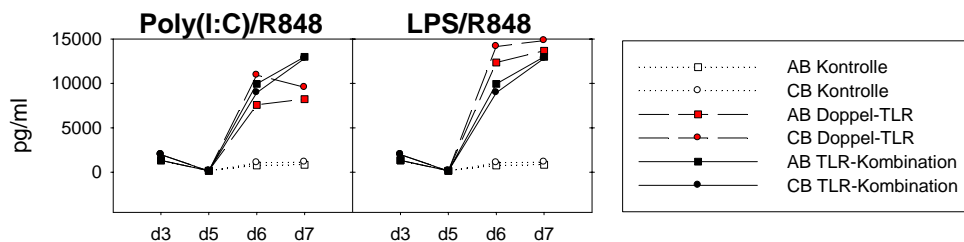


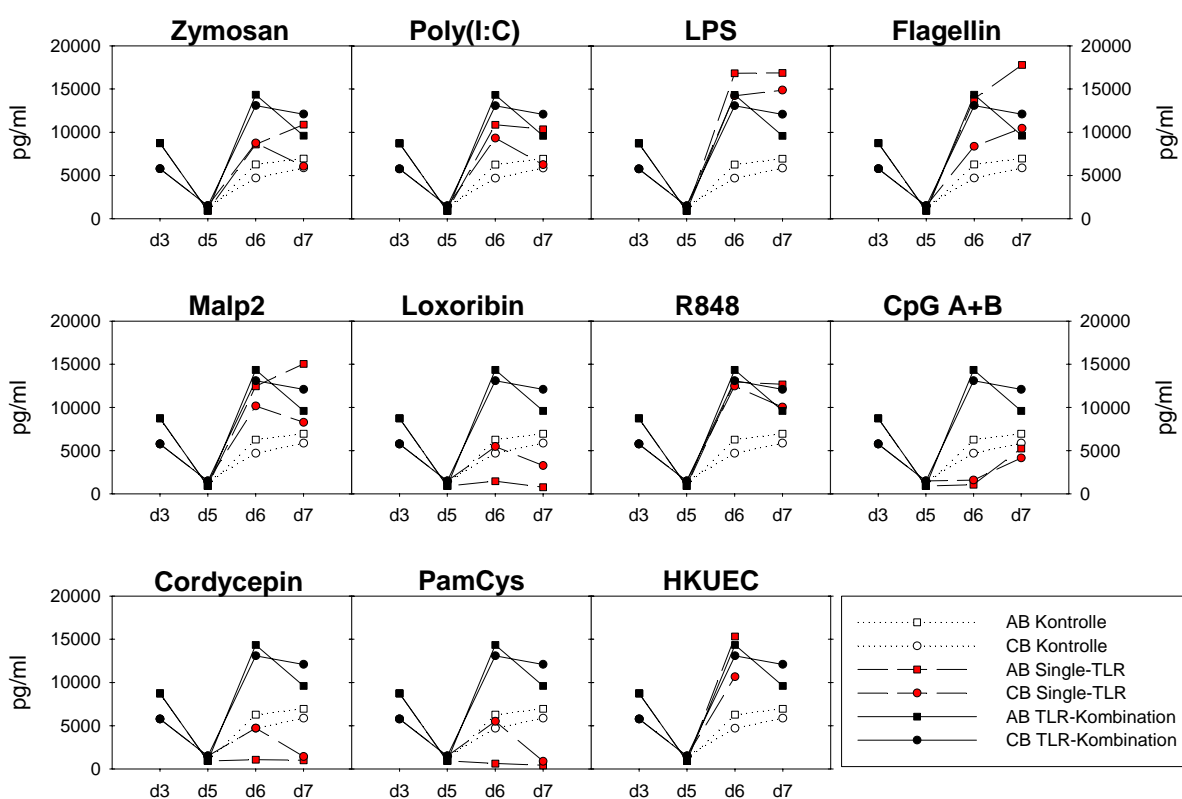
Abbildung 3.26: IL-6 Produktion stimulierter mDC. Die unreifen DC (d3) wurden nach einem Mediumwechsel an Tag 5 (d5) für 24 h (d6) bzw. für 48 h (d7) mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert. In **A**) wird die Stimulation einzelner TLR-Liganden (Single-TLR) mit der kombinierten TLR Stimulation (TLR-Kombination) zwischen AB (adult) und CB (neonatal) verglichen. In **B**) werden zwei TLR stimuliert (Doppel-TLR) und mit der TLR-Kombination verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-14]

Während die unstimulierten adulten und neonatalen Zellen kein IL-6 produzierten, konnte nach Stimulation aller TLR eine sehr deutliche Sekretion von IL-6 in der adulten wie in der neonatalen mDC-Kultur in gleichen Konzentrationen von mehr als 10.000 pg/ml nachgewiesen werden (Abb. 3.26). Die Inkubation der DC mit LPS, Flagellin und R848 induzierte ebenfalls eine deutliche IL-6 Sekretion. Dabei unterschieden sich die adulten und neonatalen Zellen voneinander: Flagellin induzierte in adulten DC mehr IL-6, R848 in den neonatalen DC. Geringe IL-6 Mengen wurden nach Stimulation der adulten und neonatalen

TLR3 und TLR6 detektiert. Die HKUEC stimulierten die adulten wie die neonatalen DC gleichermaßen zur Produktion von etwa 2.500 pg/ml IL-6. Die gleichzeitige Stimulation des TLR8 mit dem TLR3 bzw. TLR4 führte zu einem starken Anstieg der IL-6 Konzentration. In den adulten DC-Kulturen wurden mit Poly/R848 ca. 7.000pg/ml und mit LPS/R848 annähernd 10.000 pg/ml IL-6 nachgewiesen. Die neonatalen DC produzierten über 10.000 pg/ml IL-6.

3.3.2.3. Interleukin-8 (IL-8)

A)



B)

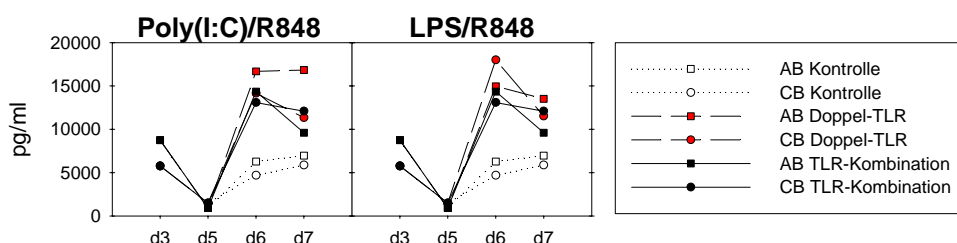
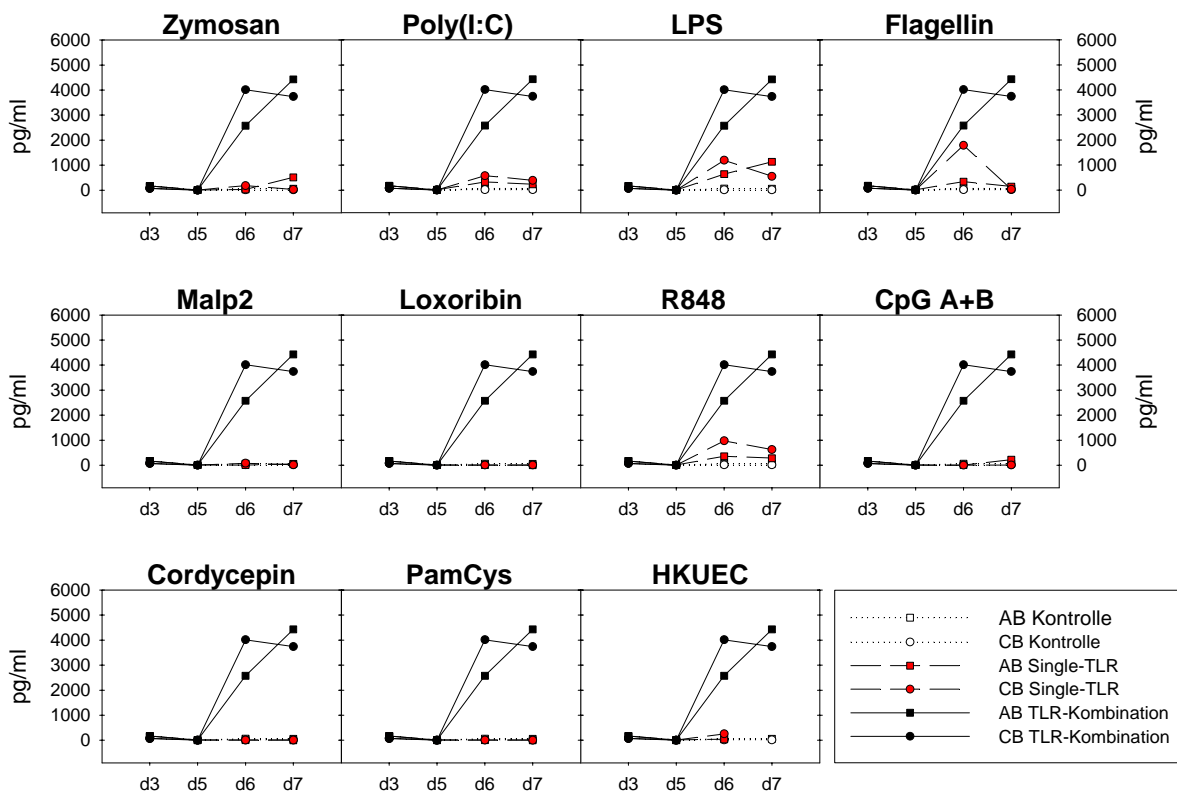


Abbildung 3.27: IL-8 Produktion stimulierter mDC. Die unreifen DC (d3) wurden nach einem Mediumwechsel an Tag 5 (d5) für 24 h (d6) bzw. für 48 h (d7) mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert. In **A**) wird die Stimulation einzelner TLR-Liganden (Single-TLR) mit der kombinierten TLR Stimulation (TLR-Kombination) zwischen AB (adult) und CB (neonatal) verglichen. In **B**) werden zwei TLR stimuliert (Doppel-TLR) und mit der TLR-Kombination verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-14]

In den adulten und neonatalen Kontrollkulturen ohne Pathogenzusatz konnte eine IL-8 Produktion von 5.000 bis 6.000 pg/ml nachgewiesen werden (*Abb. 3.27*). Die Inkubation der DC mit Loxoribin, Cordycepin und PamCys reduzierte die IL-8 Sekretion in den adulten DC nach 24 h, in den neonatalen DC-Kulturen nach 48 h bis zu 0 pg/ml. Keinen Effekt auf die IL-8 Produktion hatte die Stimulation der Zellen mit den CpG Motiven. Die Bindung aller TLR mit der TLR-Liganden-Kombination induzierte einen sehr deutlichen Anstieg der IL-8 Konzentration in den adulten und neonatalen DC-Kulturen auf 10.000 bis 15.000 pg/ml. Ähnlich hohe Zytokinkonzentrationen konnten nach Stimulation der TLR6 und TLR8 und nach Inkubation der DC mit den HKUEC detektiert werden. LPS induzierte in beiden, Flagellin nur in den adulten DC Populationen eine höhere IL-8 Sekretion als die kombinierte TLR Stimulation. Nach Aktivierung der TLR2 und TLR3 mit Zymosan respektive Poly(I:C) wurde nach 24 h etwa 8.500 pg/ml von den adulten und neonatalen DC produziert, nach 48 h sezernierten die adulten DC 11.000 pg/ml, die neonatalen nur noch 6.000 pg/ml Interleukin-8. Die kombinierte Stimulation der TLR3 und TLR8 induzierten in den adulten Zellen ein ähnliches IL-8 Expressionsmuster wie die Stimulation des TLR4 mit LPS. Die neonatalen DC zeigten gleiche IL-8 Konzentrationen nach Poly(I:C)/R848 Inkubation wie nach kombinierter Stimulation aller TLR. Nach kombinierter Stimulation der TLR4 und TLR8 produzierten die neonatalen DC etwas mehr IL-8 als die adulten DC.

3.3.2.4. Interleukin-10 (IL-10)

A)



B)

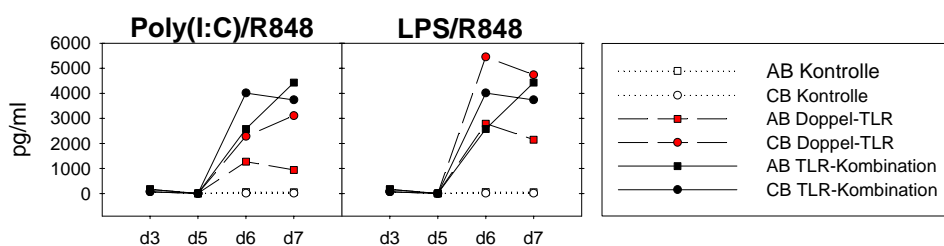


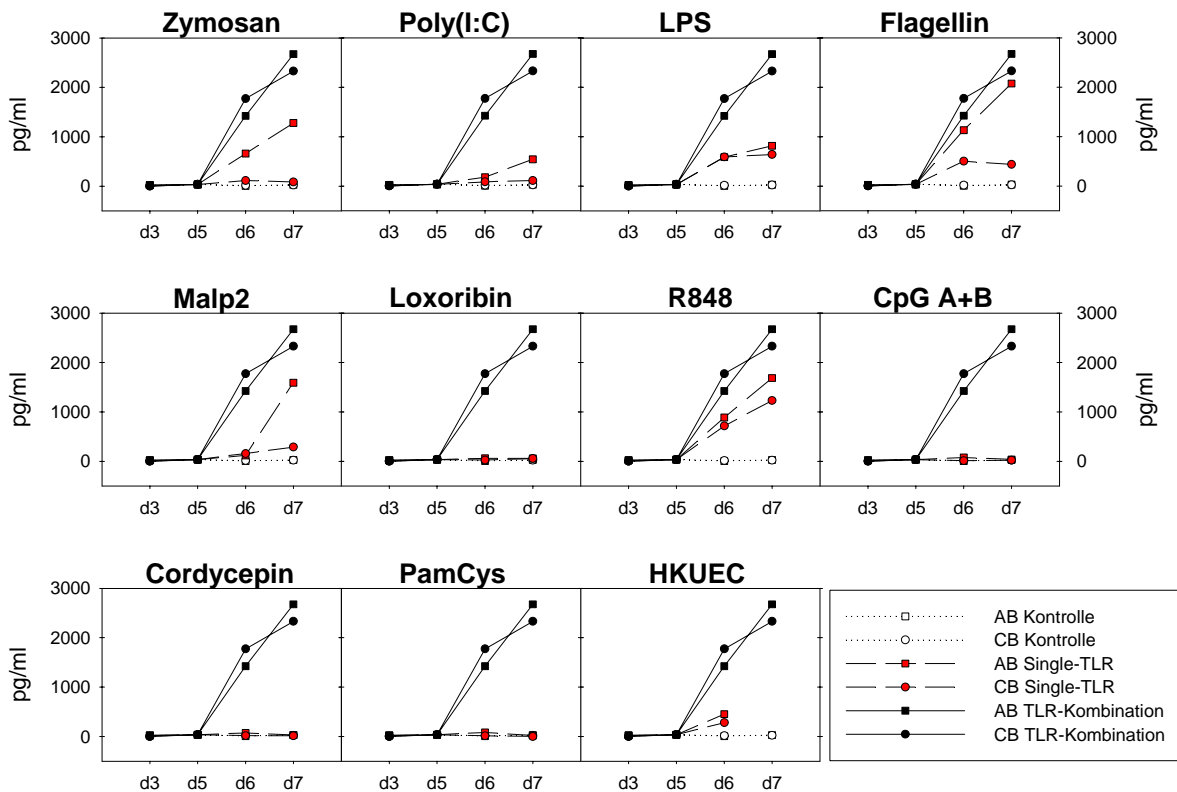
Abbildung 3.28: IL-10 Produktion stimulierter mDC. Die unreifen DC (d3) wurden nach einem Mediumwechsel an Tag 5 (d5) für 24 h (d6) bzw. für 48 h (d7) mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert. In **A**) wird die Stimulation einzelner TLR-Liganden (Single-TLR) mit der kombinierten TLR Stimulation (TLR-Kombination) zwischen AB (adult) und CB (neonatal) verglichen. In **B**) werden zwei TLR stimuliert (Doppel-TLR) und mit der TLR-Kombination verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-14]

Die adulten und neonatalen unstimulierten DC produzierten kein IL-10. Die kombinierte Stimulation der TLR hingegen induzierte in adulten wie auch in neonatalen DC die Sekretion von IL-10 (Abb. 3.28). Dabei konnten nach 24 h in den Kulturüberständen der adulten DC 2.700 pg/ml, in den neonatalen DC-Überständen bereits über 4.000 pg/ml IL-10 nachgewiesen werden. Nach 48 h kombinierter TLR-Stimulation stieg die IL-10 Konzentration in den Überständen adulter DC auf 4.600pg/ml, während sie in den

Überständen der neonatalen DC auf 3.900 pg/ml sank. Nach Inkubation der DC mit LPS, Flagellin bzw. R848 konnte in den neonatalen DC-Kulturen ein 1.000-2.000facher Anstieg der IL-10 Produktion im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollansätzen nachgewiesen werden. Die adulten DC reagierten auf Zymosan mit einer schwachen IL-10 Produktion nach 48 h. LPS konnte in adulten DC eine IL-10 Sekretion von 500 pg/ml nach 24 h und von 1.000 pg/ml nach 48 h hervorrufen. Poly(I:C) hatte auf beide DC-Populationen nur einen schwachen Einfluss. Kombiniert mit R848 induzierte Poly(I:C) in adulten und neonatalen DC eine deutliche IL-10 Produktion, wobei die neonatalen DC zwischen 2.500 und 3.200 pg/ml sekretierten, die adulten DC um die 1.000 pg/ml. Nach Inkubation der DC mit LPS und R848 produzierten die neonatalen DC über 5.000 pg/ml, die adulten DC erhöhten ihre IL-10 Sekretion auf über 2.000 pg/ml.

3.3.2.5. Interleukin-12p40 (IL-12p40)

A)



B)

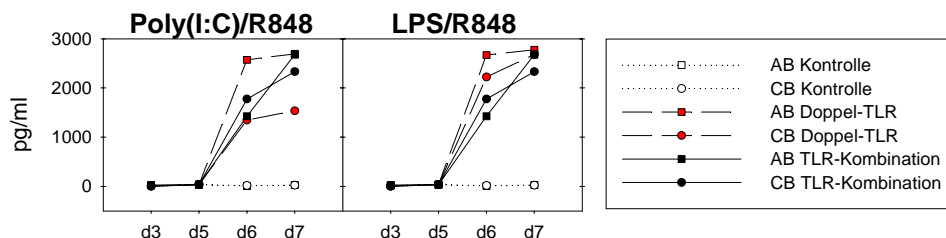


Abbildung 3.29: IL-12p40 Produktion stimulierter mDC. Die unreifen DC (d3) wurden nach einem Mediumwechsel an Tag 5 (d5) für 24 h (d6) bzw. für 48 h (d7) mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert. In **A**) wird die Stimulation einzelner TLR-Liganden (Single-TLR) mit der kombinierten TLR Stimulation (TLR-Kombination) zwischen AB (adult) und CB (neonatal) verglichen. In **B**) werden zwei TLR stimuliert (Doppel-TLR) und mit der TLR-Kombination verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-13]

Die Produktion einer Untereinheit des Heterodimers IL-12 – IL-12p40 - wurde nach Stimulation aller TLR sowohl in adulten wie auch in neonatalen DC gleichermaßen induziert. Nach 24 h wurden etwa 1.600 pg/ml, nach 48 h über 2.000 pg/ml IL-12p40 gemessen (Abb. 3.29). Die Stimulation einzelner TLR führte zu Unterschieden in der p40 Synthese zwischen adulten und neonatalen DC. Zymosan, Poly(I:C), Flagellin und Malp2 induzierten in adulten DC eine IL-12p40 Produktion zwischen 400 und 1.800 pg/ml, während die neonatalen DC

nur bis zu 300 pg/ml IL-12p40 sezernierten. LPS, R848 und die HKUEC hingegen konnten auch die neonatalen DC zur Produktion von IL-12p40 stimulieren. Dabei wurden ähnliche Konzentrationen von IL-12p40 wie in adulten Kulturüberständen nachgewiesen. Loxoribin, CpG Motive, Cordycepin und PamCys konnten weder in adulten noch in neonatalen DC die Produktion von IL-12p40 induzieren. Nachdem die adulten Zellen mit zwei TLR Agonisten gleichzeitig stimuliert wurden, konnte mehr IL-12p40 detektiert werden als nach kombinierter Stimulation mit allen TLR Liganden. In den neonatalen DC führte die zusätzliche Stimulation des TLR3 zu keinem weiteren Anstieg der IL-12p40 Produktion im Vergleich zur TLR8 Stimulation allein. Im Gegensatz dazu induzierte die simultane Stimulation des neonatalen TLR4 und TLR8 Konzentrationen von IL-12p40, die über denen lagen, die mit der kombinierten Stimulation aller TLR gemessen wurden.

3.3.2.6. Interleukin-12p70 (IL-12p70)

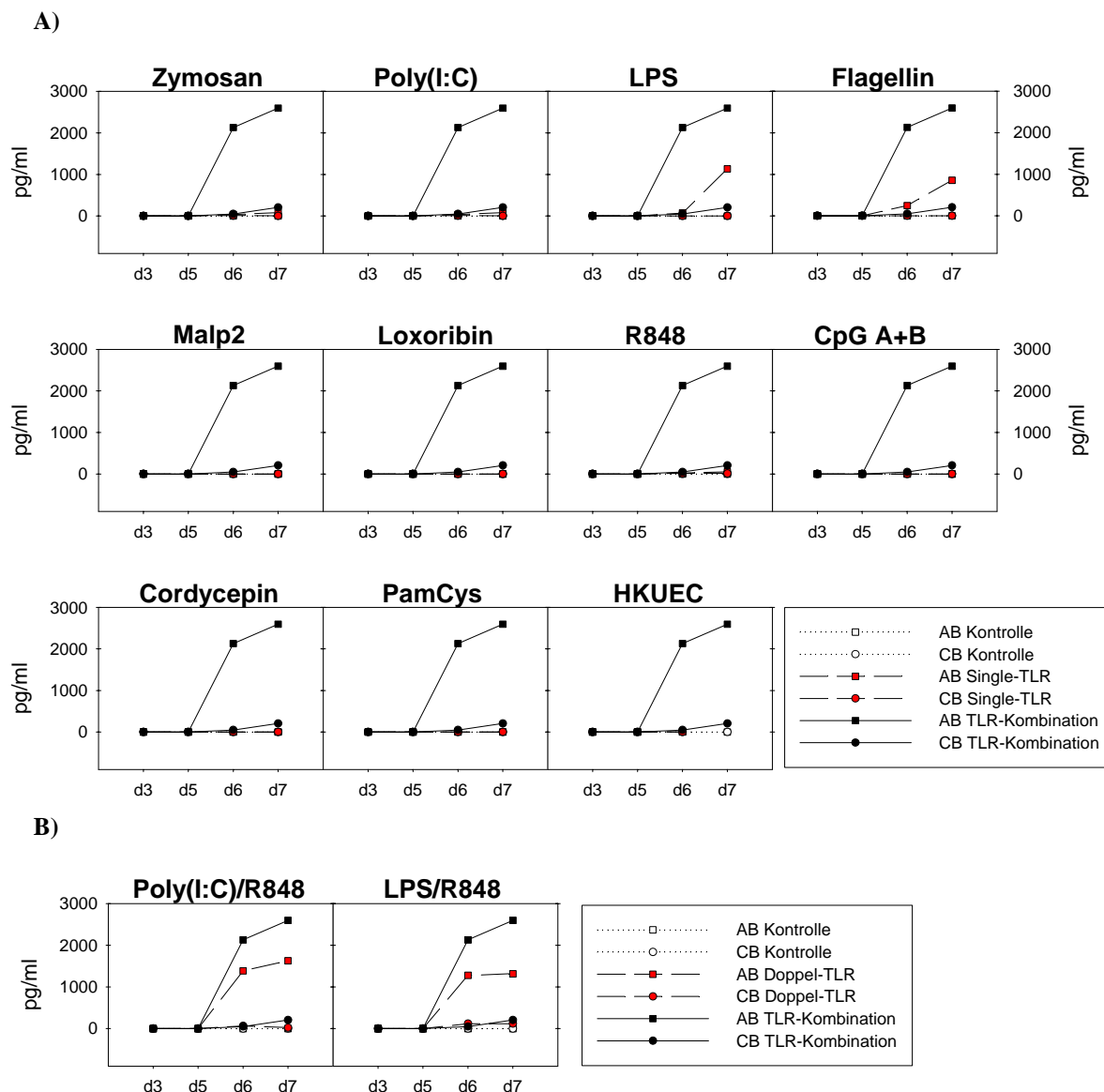


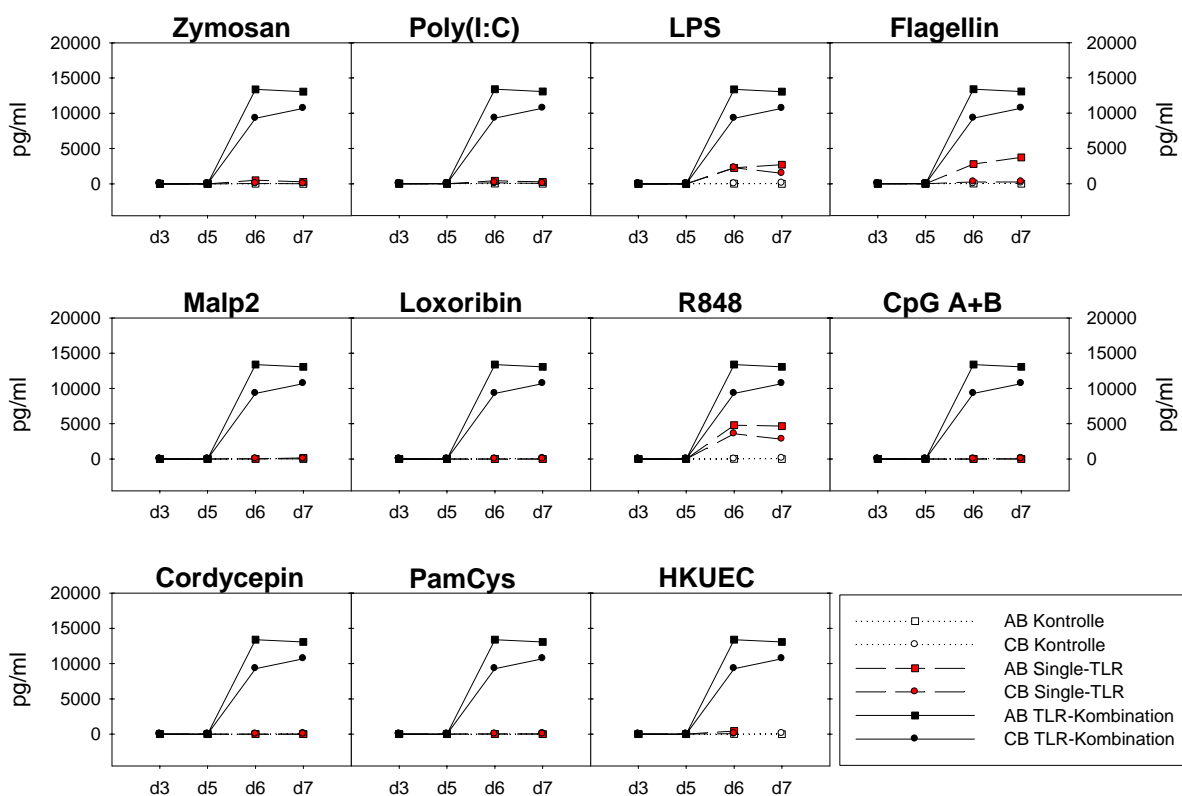
Abbildung 3.30: IL-12p70 Produktion stimulierter mDC. Die unreifen DC (d3) wurden nach einem Mediumwechsel an Tag 5 (d5) für 24 h (d6) bzw. für 48 h (d7) mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert. In **A**) wird die Stimulation einzelner TLR-Liganden (Single-TLR) mit der kombinierten TLR Stimulation (TLR-Kombination) zwischen AB (adult) und CB (neonatal) verglichen. In **B**) werden zwei TLR stimuliert (Doppel-TLR) und mit der TLR-Kombination verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-14]

Die bioaktive Form des Zytokins IL-12 - IL-12p70 - konnte in den unstimulierten adulten und neonatalen DC nicht nachgewiesen werden (*Abb. 3.30*). Nur die Stimulation der TLR4 und TLR5 mit LPS (1.200 pg/ml) respektive Flagellin (900 pg/ml) sowie die kombinierte Stimulation aller TLR führte in den Kulturen der adulten DC zu einer Produktion von IL-12p70. Dabei konnte in den Überständen der kombiniert stimulierten adulten DC eine IL-12p70 Konzentration von 2.600 pg/ml gemessen werden. Im Gegensatz dazu wurde in den Kulturüberständen der neonatalen DC ausschließlich nach kombinierter TLR-Stimulation IL-

IL-12p70 detektiert, und das in deutlich geringerer Konzentration (nur etwa 200 pg/ml) im Vergleich zu den Überständen adulter Zellen. Die Stimulation mit zwei TLR-Liganden induzierte in adulten DC die Produktion von IL-12p70 bereits nach 24 h, wobei über 1.000 pg/ml IL-12p70 gemessen werden konnten.

3.3.2.7. Tumor-Nekrose-Faktor alpha (TNF α)

A)



B)

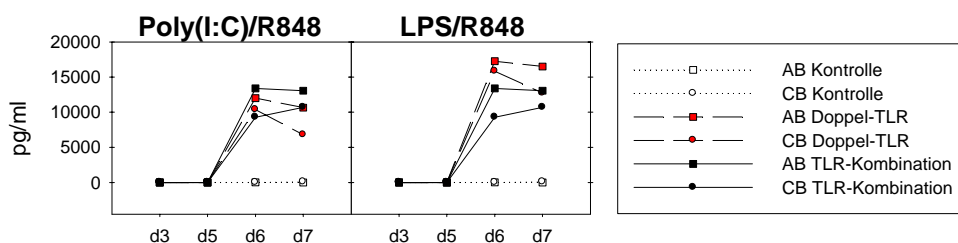


Abbildung 3.31: TNF α Produktion stimulierter mDC. Die unreifen DC (d3) wurden nach einem Mediumwechsel an Tag 5 (d5) für 24 h (d6) bzw. für 48 h (d7) mit den unterschiedlichen TLR-Liganden stimuliert. In **A**) wird die Stimulation einzelner TLR-Liganden (Single-TLR) mit der kombinierten TLR Stimulation (TLR-Kombination) zwischen AB (adult) und CB (neonatal) verglichen. In **B**) werden zwei TLR stimuliert (Doppel-TLR) und mit der TLR-Kombination verglichen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-14]

Die Produktion von TNF α wurde nach Inkubation der adulten und neonatalen unreifen DC mit LPS, Flagellin, R848 und der Kombination der TLR-Liganden bereits nach 24 h induziert (*Abb. 3.31*). Dabei wurde beobachtet, dass die adulten DC nach 24 h Inkubation mit der TLR-Liganden-Kombination 14.000 pg/ml TNF α sezernierten, während in den Kulturüberständen der neonatalen DC nur etwa 9.000 pg/ml TNF α nachgewiesen werden konnten. Nach 48 h kombinierter Stimulation steigerten die neonatalen DC ihre TNF α Produktion auf 11.000 pg/ml wobei die adulten DC die TNF α Sekretion nicht weiter erhöhten. Die Stimulation des TLR5 mit Flagellin führte nur in den adulten DC-Kulturen zu einem Anstieg der TNF α Konzentration. Die restlichen PAMP hatten weder im adulten noch im neonatalen Blut einen Einfluss auf die TNF α Sekretion. Im Gegensatz dazu induzierte die gleichzeitige Bindung der TLR3 und TLR8 sowohl in adulten als auch in neonatalen DC eine TNF α Produktion ähnlich derjenigen, die mit der kombinierten TLR-Stimulation nachgewiesen wurde. Die Inkubation der Zellen mit LPS und R848 führte zu einer höheren TNF α Konzentration in den Überständen adulter und neonataler DC als in den Kulturen, die mit der TLR Liganden Kombination stimuliert worden sind.

Zur besseren Übersicht ist die Zytokinproduktion der stimulierten dendritischen Zellen, die aus Monozyten differenziert wurden, in *Tabelle 3.6* zusammengefasst.

Stimulation	Adulte mDC	Absolut-Werte	Kontrolle subtrahiert	Neonatale mDC	Absolut-Werte	Kontrolle subtrahiert
Zymosan	IL-1b			IL-1b		
	IL-6			IL-6		
	IL-8			IL-8		
	IL-10			IL-10		
	IL-12p40			IL-12p40		
	IL-12p70			IL-12p70		
Poly(I:C)	TNFa			TNFa		
	IL-1b			IL-1b		
	IL-6			IL-6		
	IL-8			IL-8		
	IL-10			IL-10		
	IL-12p40			IL-12p40		
LPS	IL-12p70			IL-12p70		
	TNFa			TNFa		
	IL-1b			IL-1b		
	IL-6			IL-6		
	IL-8			IL-8		
	IL-10			IL-10		
Flagellin	IL-12p40			IL-12p40		
	IL-12p70			IL-12p70		
	TNFa			TNFa		
	IL-1b			IL-1b		
	IL-6			IL-6		
	IL-8			IL-8		
Malp2	IL-10			IL-10		
	IL-12p40			IL-12p40		
	IL-12p70			IL-12p70		
	TNFa			TNFa		
	IL-1b			IL-1b		
	IL-6			IL-6		
Loxoribin	IL-8			IL-8		
	IL-10			IL-10		
	IL-12p40			IL-12p40		
	IL-12p70			IL-12p70		
	TNFa			TNFa		
	IL-1b			IL-1b		
R848/ssRNA	IL-6			IL-6		
	IL-8			IL-8		
	IL-10			IL-10		
	IL-12p40			IL-12p40		
	IL-12p70			IL-12p70		
	TNFa			TNFa		
CpG DNA	IL-1b			IL-1b		
	IL-6			IL-6		
	IL-8			IL-8		
	IL-10			IL-10		
	IL-12p40			IL-12p40		
	IL-12p70			IL-12p70		
Cordycepin	TNFa			TNFa		
	IL-1b			IL-1b		
	IL-6			IL-6		
	IL-8			IL-8		
	IL-10			IL-10		
	IL-12p40			IL-12p40		
PamCys	IL-12p70			IL-12p70		
	TNFa			TNFa		
	IL-1b			IL-1b		
	IL-6			IL-6		
	IL-8			IL-8		
	IL-10			IL-10		
HKUEC	IL-12p40			IL-12p40		
	IL-12p70			IL-12p70		
	TNFa			TNFa		
	IL-1b			IL-1b		
	IL-6			IL-6		
	IL-8			IL-8		
Poly(I:C)/R848	IL-10			IL-10		
	IL-12p40			IL-12p40		
	IL-12p70			IL-12p70		
	TNFa			TNFa		
	IL-1b			IL-1b		
	IL-6			IL-6		
LPS/R848	IL-8			IL-8		
	IL-10			IL-10		
	IL-12p40			IL-12p40		
	IL-12p70			IL-12p70		
	TNFa			TNFa		
	IL-1b			IL-1b		
Kombination aller TLR	IL-6			IL-6		
	IL-8			IL-8		
	IL-10			IL-10		
	IL-12p40			IL-12p40		
	IL-12p70			IL-12p70		
	TNFa			TNFa		

Tabelle 3.6: Zusammenfassung der Zytokinproduktion stimulierter mDC. Die Farbkodierung zeigt mit zunehmender Farbindensität die zunehmende Zytokinproduktion. Die erste Farbspalte stellt die Gesamtproduktion der jeweiligen Zytokine dar. In der zweiten Farbspalte ist die Zytokinproduktion der unstimulierten Zellen (Kontrolle) von der Zytokinproduktion der stimulierten Zellen subtrahiert worden. Diese Spalte verdeutlicht somit die Zunahme der Zytokinproduktion nach Stimulation der Zellen.

Die Farbkodierung macht erneut den enormen Einfluss der kombinierten TLR-Stimulation auf die dendritischen Zellen deutlich (Tab. 3.6). Die Bindung der TLR7 und TLR9 und die Aktivierung mit Cordycepin bzw. PamCys konnte hingegen keinerlei Zytokinproduktion in den mDC induzieren. Im Gegensatz zu der Expression der Kostimulatoren (Kap. 3.2.2.) hat der Abzug der Kontrollwerte keinen großen Effekt auf die Werte der stimulierten Zellen.

3.3.3. Zytokinproduktion stimulierter plasmazytoider dendritischer Zellen

Die isolierten plasmazytoiden DC (Kap. 2.7.1.) wurden mit den Oligonukleotiden CpG A und CpG B stimuliert (Kap. 2.10.). Zellen der gleichen Population, die nur mit Kulturmedium inkubiert wurden, dienten als Kontrollen. Nach 24 h wurden die Kulturüberstände abgenommen und bei -20°C bis zur Verwendung gelagert. Der Nachweis von $\text{IFN}\alpha$ erfolgte mit Hilfe eines ELISA (Kap. 2.14.1.2.). Die inflammatorischen Zytokine IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, IL-12p70 und $\text{TNF}\alpha$ wurden mit dem inflammatorischen CBA (Kap. 2.14.2.) gemessen.

3.3.3.1. Interferon alpha ($\text{IFN}\alpha$)

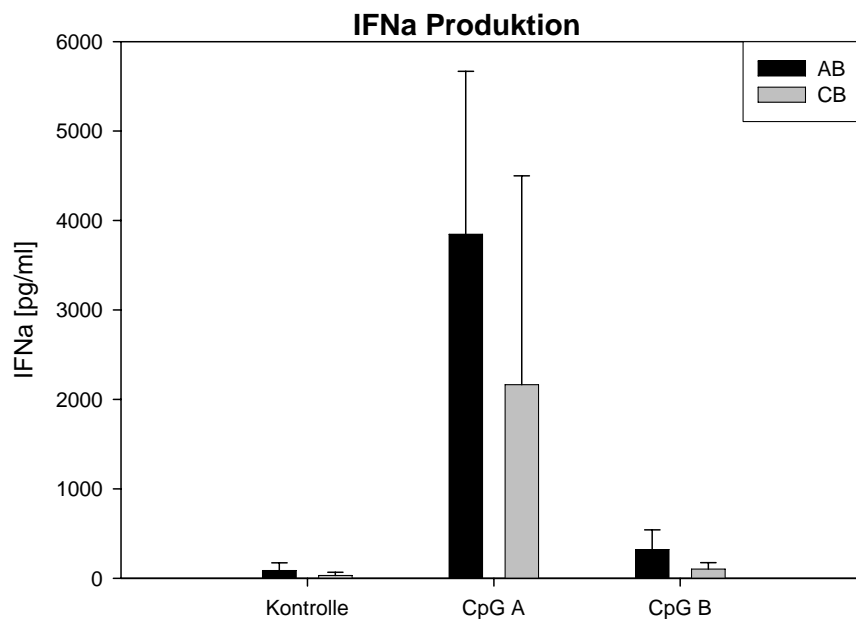


Abbildung 3.32: $\text{IFN}\alpha$ Produktion stimulierter pDC. Die pDC wurden für 24 h mit den TLR9-Liganden CpG A und CpG B stimuliert und die Kulturüberstände analysiert. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen (s. Anhang). [n=5]

Wie in der *Abbildung 3.32* zu erkennen ist, produzierten sowohl die adulten als auch die neonatalen CpG A-stimulierten pDC große Mengen Interferon α . Dabei konnte in den neonatalen pDC-Kulturüberständen im Vergleich zu den adulten Überständen tendenziell weniger $\text{IFN}\alpha$ nachgewiesen werden. Die Zugabe von CpG B konnte weder in den adulten noch in den neonatalen pDC eine deutliche Sekretion von $\text{IFN}\alpha$ induzieren. In den unstimulierten Kontrollen wurde kein $\text{IFN}\alpha$ detektiert.

3.3.3.2. Inflammatorische Zytokine in plasmazytoiden DC

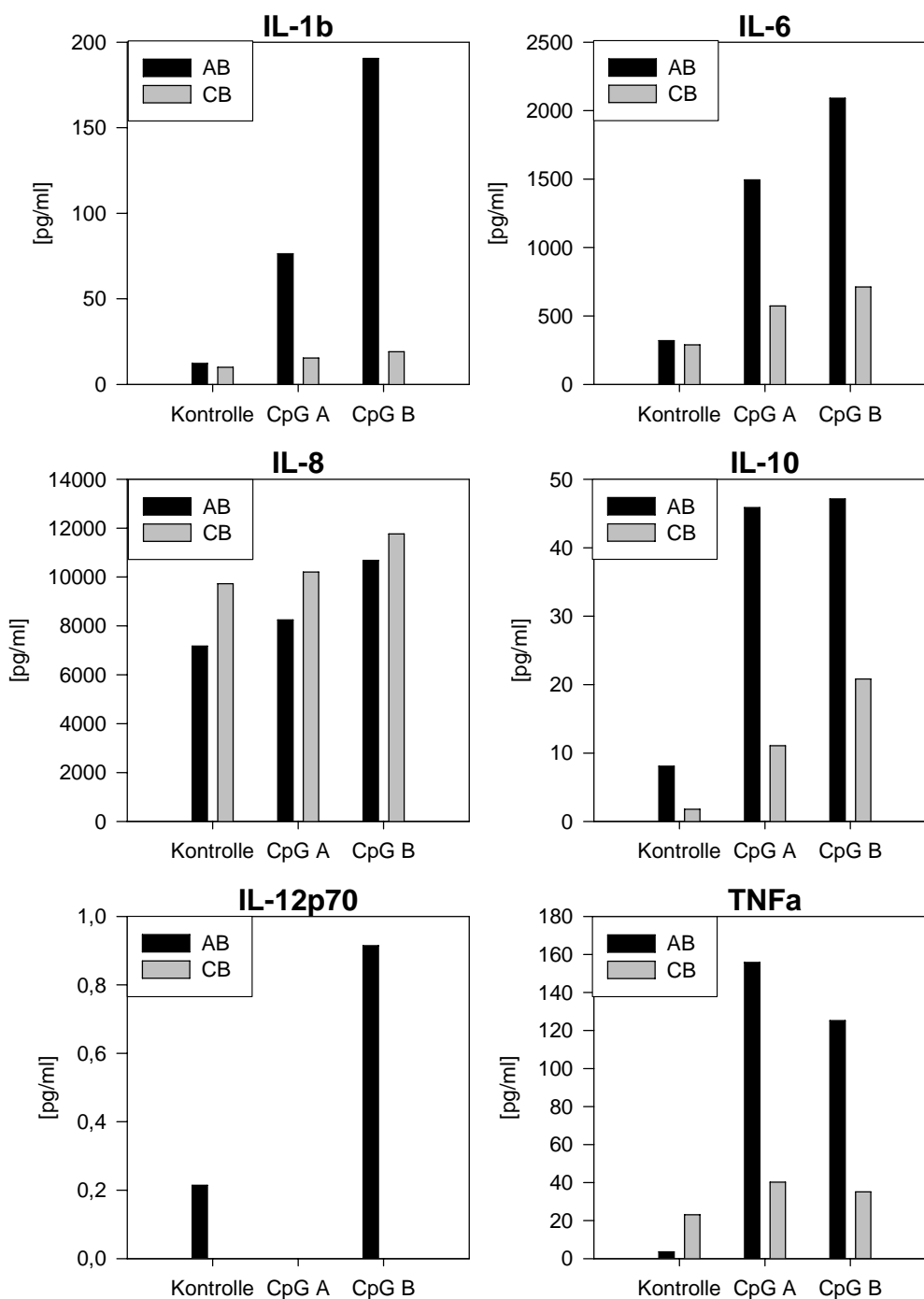


Abbildung 3.33: Inflammatorische Zytokine in stimulierten pDC. Die pDC wurden für 24 h mit den TLR9-Liganden CpG A und CpG B stimuliert und die Kulturüberstände analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=6-7]

Mit der Ausnahme von Interleukin 8 wurden alle untersuchten inflammatorischen Zytokine vermehrt von adulten als von neonatalen pDC produziert (Abb. 3.33). Die unstimulierten pDC sekretierten nur minimale Zytokinmengen. Auch hier bildet IL-8 die Ausnahme: in den Kulturüberständen der neonatalen pDC konnten höhere IL-8 Konzentrationen detektiert

werden als in den Überständen der adulten Zellen. Die Inkubation adulter pDC induzierte eine deutlich erhöhte IL-1 β , IL-6, IL-10 und TNF α Produktion. Bei den neonatalen pDC steigerte die Stimulation mit CpG A und B die Sekretion von IL-6, IL-10 und TNF α . Außer auf die Induktion von TNF α , hatte CpG B eine stärkere Wirkung auf die Zytokinproduktion der adulten und neonatalen pDC als CpG A. Interleukin-12 wurde in den neonatalen pDC nicht produziert.

Auch hier soll die Übersicht der gesamten Zytokinproduktion der pDC die Unterschiede zwischen neonatalen und adulten DC veranschaulichen (Tab. 3.7).

Tabelle 3.7: Zusammenfassung der Zytokinproduktion adulter und neonataler stimulierter pDC. Die Farbkodierung zeigt mit zunehmender Farbtintensität die zunehmende Zytokinproduktion. Die erste Farbspalte stellt die Gesamtproduktion der jeweiligen Zytokine dar. In der zweiten Farbspalte ist die Zytokinproduktion der unstimulierten Zellen (Kontrolle) von der Zytokinproduktion der stimulierten Zellen subtrahiert worden. Diese Spalte verdeutlicht somit die Zunahme der Zytokinproduktion nach Stimulation der Zellen.

Stimulation	Adulte pDC	Absolut-Werte	Kontrolle subtrahiert	Neonatale pDC	Absolut-Werte	Kontrolle subtrahiert
CpG A	IFN γ			IFN γ		
	IL-1 β			IL-1 β		
	IL-6			IL-6		
	IL-8			IL-8		
	IL-10			IL-10		
	IL-12p70			IL-12p70		
	TNF α			TNF α		
CpG B	IFN γ			IFN γ		
	IL-1 β			IL-1 β		
	IL-6			IL-6		
	IL-8			IL-8		
	IL-10			IL-10		
	IL-12p70			IL-12p70		
	TNF α			TNF α		

Die *Tabelle 3.7* veranschaulicht die Unterschiede in der Zytokinproduktion zwischen adulten und neonatalen pDC. Die adulten pDC exprimieren vor allem mehr IL-8 und TNF α als die neonatalen pDC. Ebenso deutlich wird, dass bereits die unstimulierten Kontrollzellen inflammatorische Zytokine ausschütten: nach Abzug der Werte der Zytokinkonzentrationen der Kontrollen, sind vor allem in den neonatalen pDC Kulturen kaum noch Zytokine nachweisbar.

3.3.4. Signaltransduktion in stimulierten dendritischer Zellen

Der Nachweis der Phosphorylierung von Kinasen, die an der Signaltransduktion beteiligt sind, sollte Aufschluss darüber geben, inwieweit die Bindung der TLR mit den TLR-Liganden

in die dendritische Zelle weitergeleitet wird. Der Phosphorylierungsstatus der stimulierten DC wurde mit Fluorochrom-konjugierten Antikörpern gegen p38 MAPK, ERK1/2 und STAT1 detektiert (Kap. 2.15.). Dazu wurden die aus Monozyten generierten unreifen DC (Kap. 2.9.1.) für 10, 30, 60, 120 bzw. 240 min mit LPS, ssRNA40 und einer Kombination aus LPS und ssRNA40 stimuliert und am FACS analysiert (Kap. 2.12.).

3.3.4.1. Phosphorylierung der p38 MAP Kinase

Die Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 wird im Zuge der Aktivierung der dendritischen Zellen phosphoryliert und induziert die Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B.

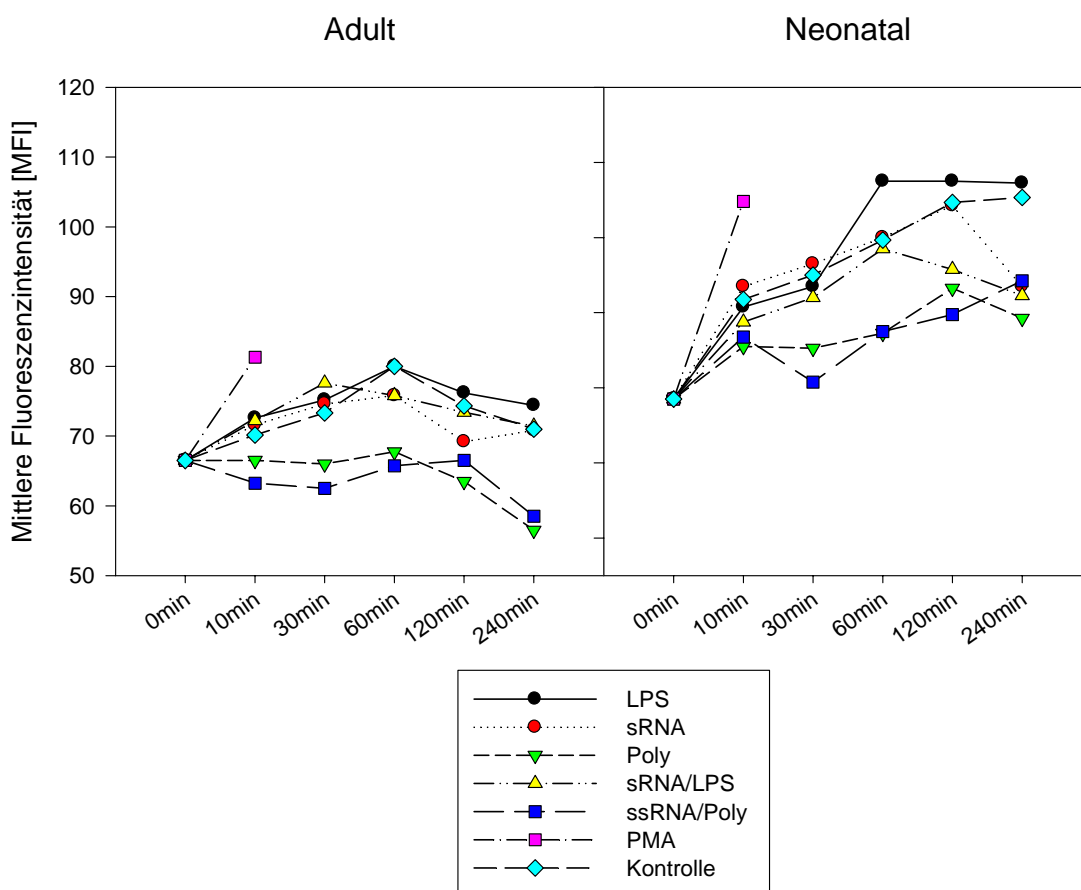


Abbildung 3.34: Phosphorylierung der p38 MAPK. Die aus Monozyten generierten DC wurden mit Poly(I:C), LPS, ssRNA und den Kombinationen aus Poly(I:C)/ssRNA bzw. LPS/ssRNA stimuliert. Unstimulierte DC dienten als Kontrollen, PMA wurde als Positivkontrolle genutzt. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen phosphorylierte p38 MAPK gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität, MFI (s. Anhang). [n=2-5]

Die Phosphorylierungszustände der p38 MAP Kinase der adulten und neonatalen DC unterschieden sich deutlich voneinander (Abb. 3.34). In den neonatalen DC war die Phosphorylierung stärker ausgeprägt als in den adulten DC. Übereinstimmend in beiden Populationen war der hohe Phosphorylierungszustand der unstimulierten Zellen. Dabei konnte

jedoch eine leichte Tendenz detektiert werden, wobei LPS nach 60minütiger Stimulation einen Anstieg der Phosphorylierung in den neonatalen DC induzierte. Zusätzlich war sowohl in adulten als auch in den neonatalen Zellen ein unterdrückender Effekt von Poly(I:C) zu beobachten.

3.3.4.2. Phosphorylierung von ERK1/2

Nach Stimulation der TLR auf bzw. in den dendritischen Zellen führt die Phosphorylierung der Kinase ERK1/2 zur Aktivierung und Translokation von NF- κ B.

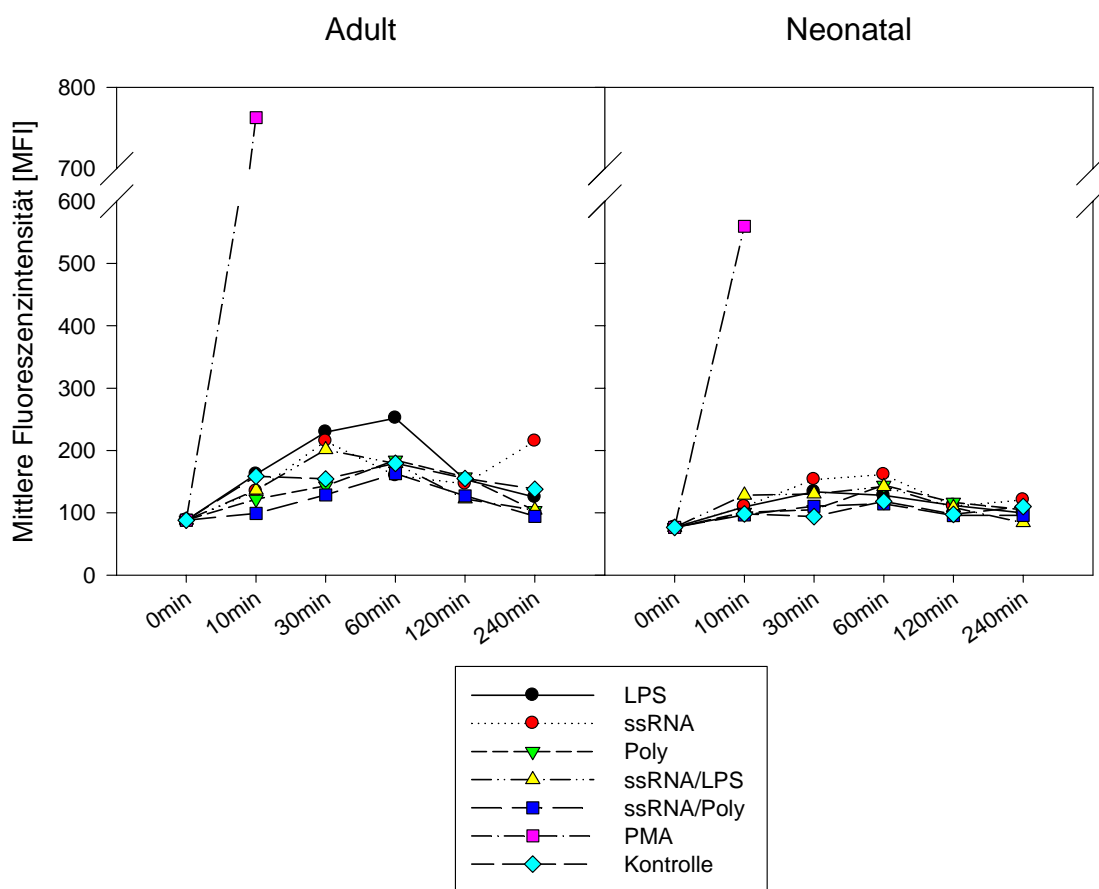


Abbildung 3.35: Phosphorylierung von ERK 1/2. Die aus Monozyten generierten DC wurden mit Poly(I:C), LPS, ssRNA und den Kombinationen aus Poly(I:C)/ssRNA bzw. LPS/ssRNA stimuliert. Unstimulierte DC dienten als Kontrollen, PMA wurde als Positivkontrolle genutzt. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen phosphoryliertes ERK 1/2 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität, MFI (s. Anhang). [n=2-5]

Als Positivkontrolle konnte PMA sowohl in adulten als auch in neonatalen DC eine sehr starke Phosphorylierung von ERK 1/2 induzieren (Abb. 3.35). In den adulten DC zeigte auch die unstimulierte Kontrolle, dass ERK 1/2 phosphoryliert wurde. Nach 30minütiger Stimulation konnte in den mit LPS bzw. ssRNA stimulierten adulten DC ein Anstieg der Phosphorylierung im Vergleich zu den unstimulierten Zellen beobachtet werden. Poly(I:C)

hatte in den adulten DC einen leicht unterdrückenden Einfluss. Die unstimulierten neonatalen DC zeigten keine Phosphorylierung von ERK 1/2. In allen stimulierten neonatalen DC konnte ein leichter Anstieg der ERK Phosphorylierung detektiert werden, der nach 120minütiger Stimulation wieder sank.

3.3.4.3. Phosphorylierung von STAT1

Der mit der MAPK p38 assoziierte Aktivator STAT 1 wird zusätzlich zur Translokation des Transkriptionsfaktors NF- κ B benötigt.

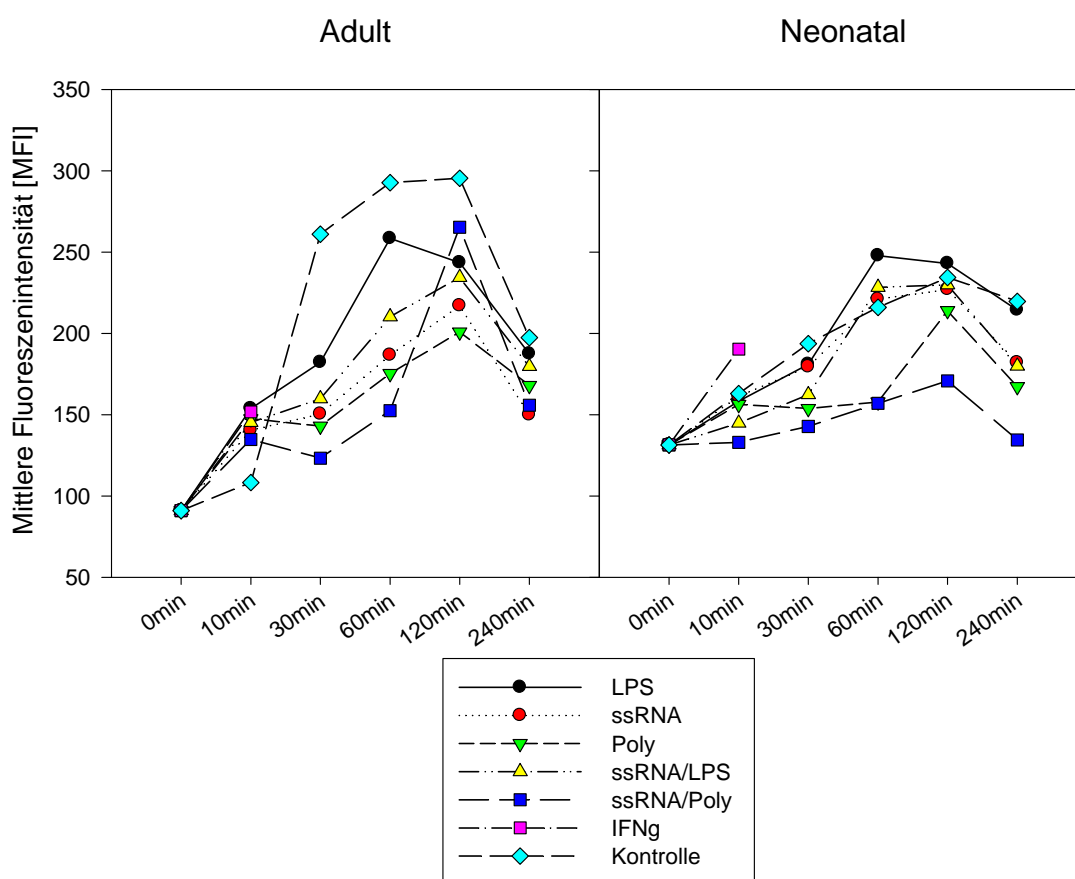


Abbildung 3.36: Phosphorylierung von STAT1. Die aus Monozyten generierten DC wurden mit Poly(I:C), LPS, ssRNA und den Kombinationen aus Poly(I:C)/ssRNA bzw. LPS/ssRNA stimuliert. Unstimulierte DC dienten als Kontrollen. IFN γ diente als Positivkontrolle. Die Zellen wurden mit Antikörpern gegen phosphoryliertes STAT1 gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenzintensität, MFI (s. Anhang). [n=2-5]

Die adulten DC zeigten eine deutliche STAT1-Phosphorylierung bereits nach 10 min Stimulation, im Vergleich zu der unstimulierten Kontrolle (Abb. 3.36). Die Phosphorylierung von STAT1 in den neonatalen Zellen entsprach hingegen der Phosphorylierung in den unstimulierten Zellen. Ähnlich der p38 Phosphorylierung konnte in den neonatalen DC ein Anstieg der STAT1 Phosphorylierung nach 60minütiger Stimulation mit LPS im Vergleich

zur Kontrolle detektiert werden. Poly(I:C) hatte einen unterdrückenden Einfluss auf die STAT1 Phosphorylierung sowohl in adulten als auch in neonatalen DC. Nach 240minütiger Stimulation sank der Phosphorylierungszustand in allen DC deutlich ab.

3.3.5. Kombinierte Zellkultur

3.3.5.1. Allogene dendritische Zell : T-Zellkultur

Bei der sog. kombinierten Lymphozytenkultur *Mixed-lymphocyte reaction* (MLR) wurden adulte und neonatale DC aus Monozyten generiert (Kap. 2.9.1.) und mit verschiedenen TLR Liganden stimuliert (Kap. 2.10.). Die stimulierten DC wurden mit adulten allo genen naiven CD4/CD45RA-positiven T-Zellen kokultiviert (Kap. 2.11.1.). Zur Überprüfung der Proliferation wurden den Kokulturen ³H-Thymidin zugegeben und die Proliferationsrate im Flüssigszintillationszähler gemessen (Kap.2.13.).

Die kombinierten Zellkulturen wurden in verschiedenen Zusammensetzungen inkubiert. Zum einen wurden adulte DC mit adulten T-Zellen kombiniert und zum anderen neonatale DC mit adulten T-Zellen. Das Verhältnis von DC zu T-Zellen wurde variiert. Dabei wurde im ersten Ansatz ein Verhältnis von 1:10 (*Abb. 3.37*) eingesetzt, im zweiten Kulturansatz ein Verhältnis von 1:100 (*Abb. 3.38*).

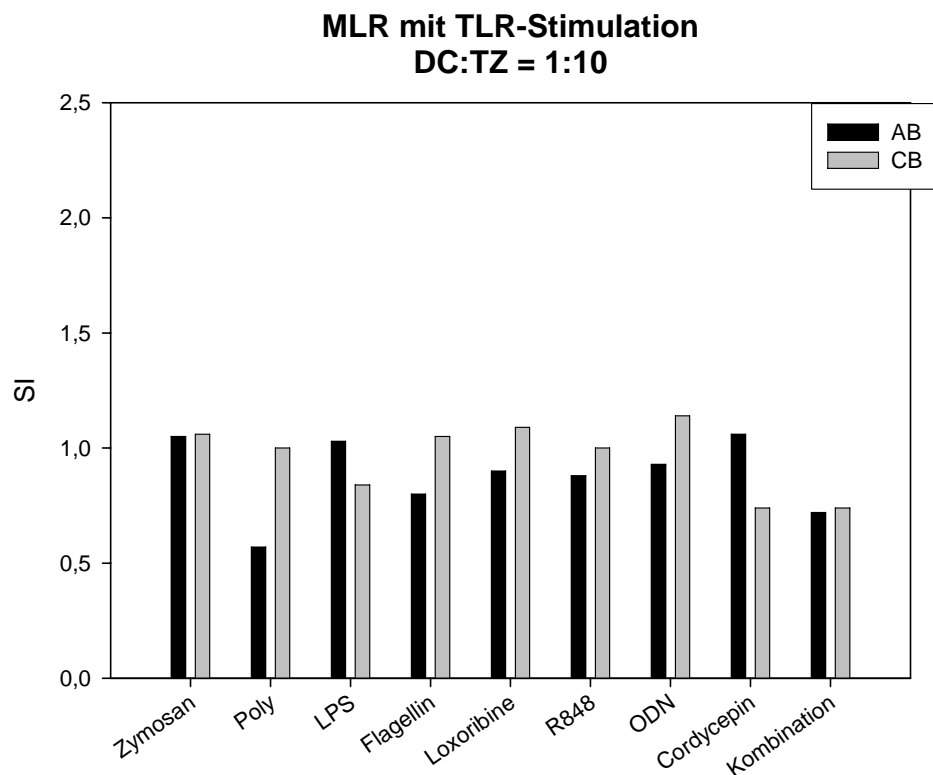


Abbildung 3.37: Stimulationsindex (SI) der MLR. Die aus adulten und neonatalen Monozyten generierten DC wurden mit den unterschiedlichen TLR Agonisten stimuliert und mit adulten CD4/CD45RA-positiven Zellen 3 Tage im Verhältnis von 1:10 kokultiviert. Im Anschluss daran wurde den Kulturen ^3H -Thymidin für 16 h zugesetzt und die Proliferation nach 16 h durch Tiefrieren gestoppt. Im Flüssigszintillationszähler wurden die radioaktiven Ereignisse in *counts per minute* [cpm] erfasst. Für den Stimulationsindex wurden alle stimulierten Proben durch die unstimulierten Kontrollen dividiert. Dargestellt sind die SI aus den Mittelwerten (s. Anhang). [n=3-4]

Die Proliferationsrate der allogenen stimulierten naiven T-Zellen war bei einem Verhältnis DC zu T-Zelle von 1:10 stimulationsunabhängig (*Abb. 3.38*). Zwischen den adulten und neonatalen dendritischen Zellen bezüglich ihrer allogenen stimulatorischen Fähigkeit konnte kein Unterschied festgestellt werden.

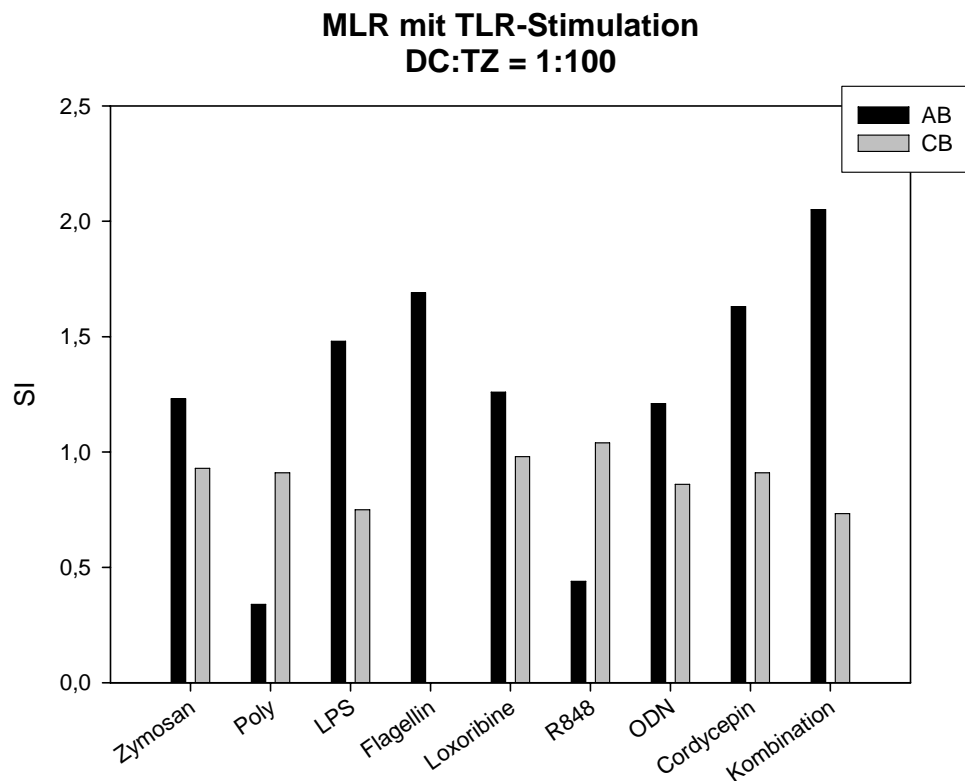


Abbildung 3.38 Stimationsindex (SI) der MLR. Die aus adulten und neonatalen Monozyten generierten DC wurden mit den unterschiedlichen TLR Agonisten stimuliert und mit adulten CD4/CD45RA-positiven Zellen 3 Tage im Verhältnis von 1:100 kokultiviert. Im Anschluss daran wurde den Kulturen ^3H -Thymidin für 16 h zugesetzt und die Proliferation nach 16 h durch Tieffrieren gestoppt. Im Flüssigszintillationszähler wurden die radioaktiven Ereignisse in *counts per minute* [cpm] erfasst. Für den Stimationsindex wurden alle stimulierten Proben durch die unstimulierten Kontrollen dividiert. Dargestellt sind die SI aus den Mittelwerten (s. Anhang). [n=3-4]

In den Kokulturen die in einem Verhältnis von 1 zu 100 inkubiert wurden, konnte ein erhöhter Stimationsindex in den Kulturen mit adulten DC im Vergleich zu den Kulturen mit neonatalen DC nachgewiesen werden (*Abb. 3.38*). Die Stimulation der adulten DC mit Poly(I:C) und R848 führte zu einer schwächeren Proliferation der T-Zellen als in den unstimulierten Vergleichskulturen, der SI lag deutlich unter 1. Ferner wurde in den Kulturen, bei denen die adulten T-Zellen mit kombiniert stimulierten adulten DC kultiviert wurden, der höchste SI-Wert von 2 gemessen. Die Proliferation der adulten T-Zellen, welche mit neonatalen DC inkubiert wurden, war stimulationsunabhängig.

Tabelle 3.8: Gezählte Ereignisse (cpm) der Kontrollzellen im Vergleich zur MLR (hier 1:10 als Beispiel). Für die Kontrollzellen wurden die Versuche nur einmal durchgeführt, die Werte der MLR zeigen die Mittelwerte der obigen Versuche. Es wurde auch die Proliferation des eingesetzten Kulturmediums (KM) gemessen.

	DC neonatal	DC adult	TZ	KM	MLR neonatal	MLR adult
ohne	18	158	648	4	97934,7	87830,25
Zymosan	14	0	689	0	104100,5	91957
Poly(I:C)	0	0	752	0	97800,0	49997
LPS		54	1171	4	82233,3	90200
Flagellin		8	1807	0	103278,0	70119
Loxoribin	10	162	789	3	106784,7	79313,75
R848	2	4	786	3	98118,5	77124
CpG-ODN		75			111425,0	81603,25
Cordycepin		415			72357,7	92845,5
Kombi		3407			72107,7	63470,25

Die Analyse des ^3H -Thymidineinbaus zeigte, dass sowohl einzeln kultivierte DC als auch einzeln kultivierte T-Zellen keine proliferativen Eigenschaften aufwiesen (*Tab. 3.8*).

3.3.5.2. T-Zellkulturen mit Überständen von autologen stimulierten dendritischen Zellkulturen aus Monozyten

Adulte und neonatale dendritische Zellen wurden aus Monozyten generiert (Kap. 2.9.1.) und mit Poly(I:C), LPS, ssRNA bzw. einer Kombination aus Poly(I:C) und ssRNA respektive einer Kombination aus LPS und ssRNA stimuliert (Kap. 2.10.). Diese Stimuli wurden gewählt, da sowohl extrazelluläre als auch intrazelluläre TLR gleichzeitig gebunden werden sollten. Nach 24 h wurde der Kulturüberstand entnommen und auf CD4/CD45RA-positive autologe naive T-Zellen gegeben (Kap. 2.11.2.). Diese kombinierten Zellkulturen wurden 3 Tage inkubiert und der Kulturüberstand bis zur Verwendung im Th1/Th2-CBA (Kap. 2.14.2.) bei -20°C gelagert.

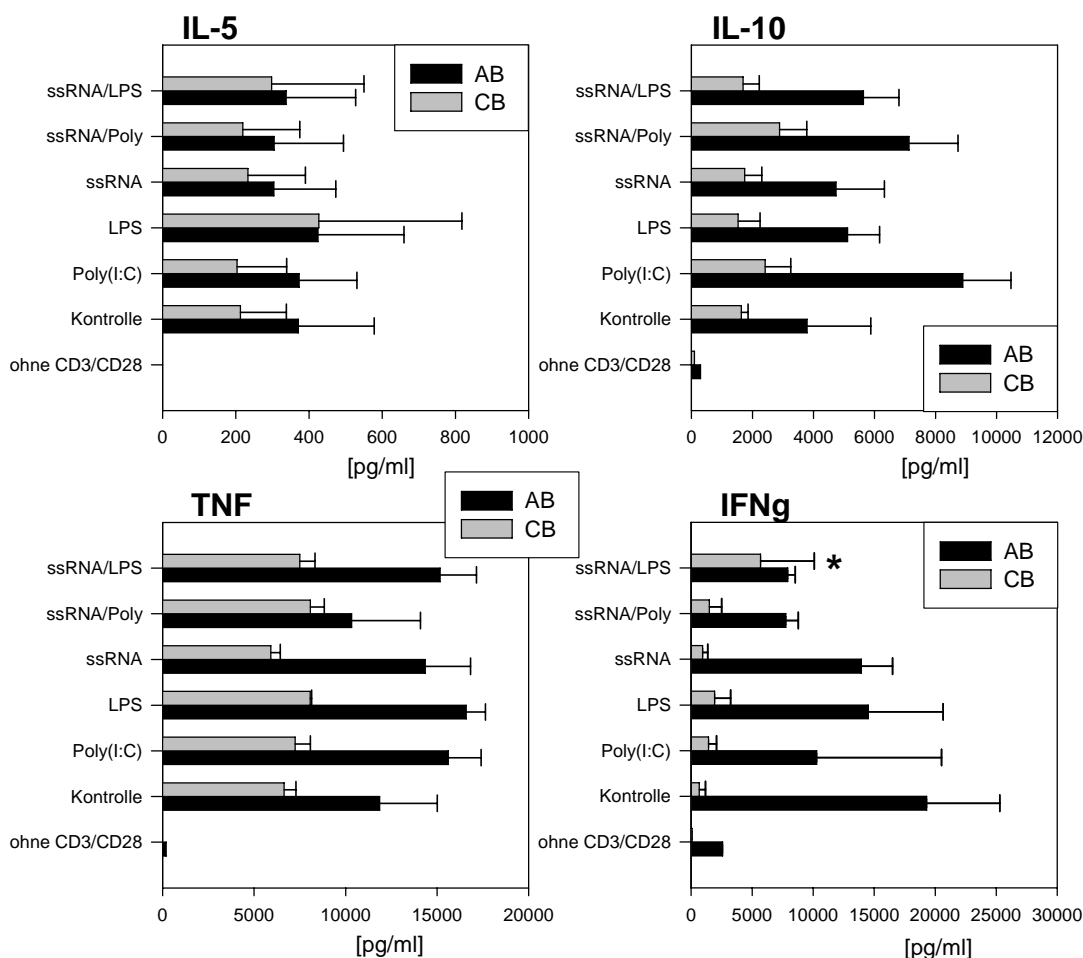


Abbildung 3.39: Zytokinproduktion der T-Zellen nach Inkubation mit DC-Überständen. Dargestellt sind die Mittelwerte (s. Anhang). [n=3-12] * Vergleich unstimulierte Kontrolle gegen ssRNA/LPS stimulierte DC ($p=0,00105$), *students t-test*

Der Nachweis von Interleukin-2 und Interleukin-4 wurde nicht dargestellt. Alle gemessenen Werte für IL-2, einschließlich der unstimulierten Kontrollen, lagen über 10.000 pg/ml, die Werte für IL-4 lagen über 30.000 pg/ml. Bezüglich IL-5 war nur eine leichte Tendenz zu erkennen, die zeigte, dass adulte T-Zellen ein wenig mehr IL-5 produzierten als neonatale DC (Abb. 3.39). Die adulten T-Zellen sekretierten hingegen deutlich mehr IL-10, TNF α und IFN γ - unabhängig davon, wie die DC stimuliert wurden. Dabei wurde eine Ausnahme festgestellt: die neonatalen T-Zellen, welche mit den ssRNA/LPS-stimulierten neonatalen DC-Überständen kultiviert worden sind, zeigten eine signifikante Steigerung der IFN γ Produktion gegenüber der unstimulierten Kontrollkultur.

3.3.5.3. T-Zellkulturen mit autologen plasmazytoiden dendritischen Zellen

Bei der kombinierten T-Zell/pDC Kultur wurden adulte und neonatale pDC isoliert (Kap. 2.7.1.), mit IL-3 vorinkubiert (Kap. 2.9.2.) und mit CpG A, bzw. CpG B und CD40L stimuliert (Kap. 2.10.). Die stimulierten pDC wurden mit autologen naiven CD4/CD45RA-positiven Zellen kokultiviert (Kap. 2.11.3.), nach 3 Tagen Kulturüberstand entnommen und bis zur Verwendung im Th1/Th2 CBA (Kap. 2.14.2.) bei -20°C tiefgefroren.

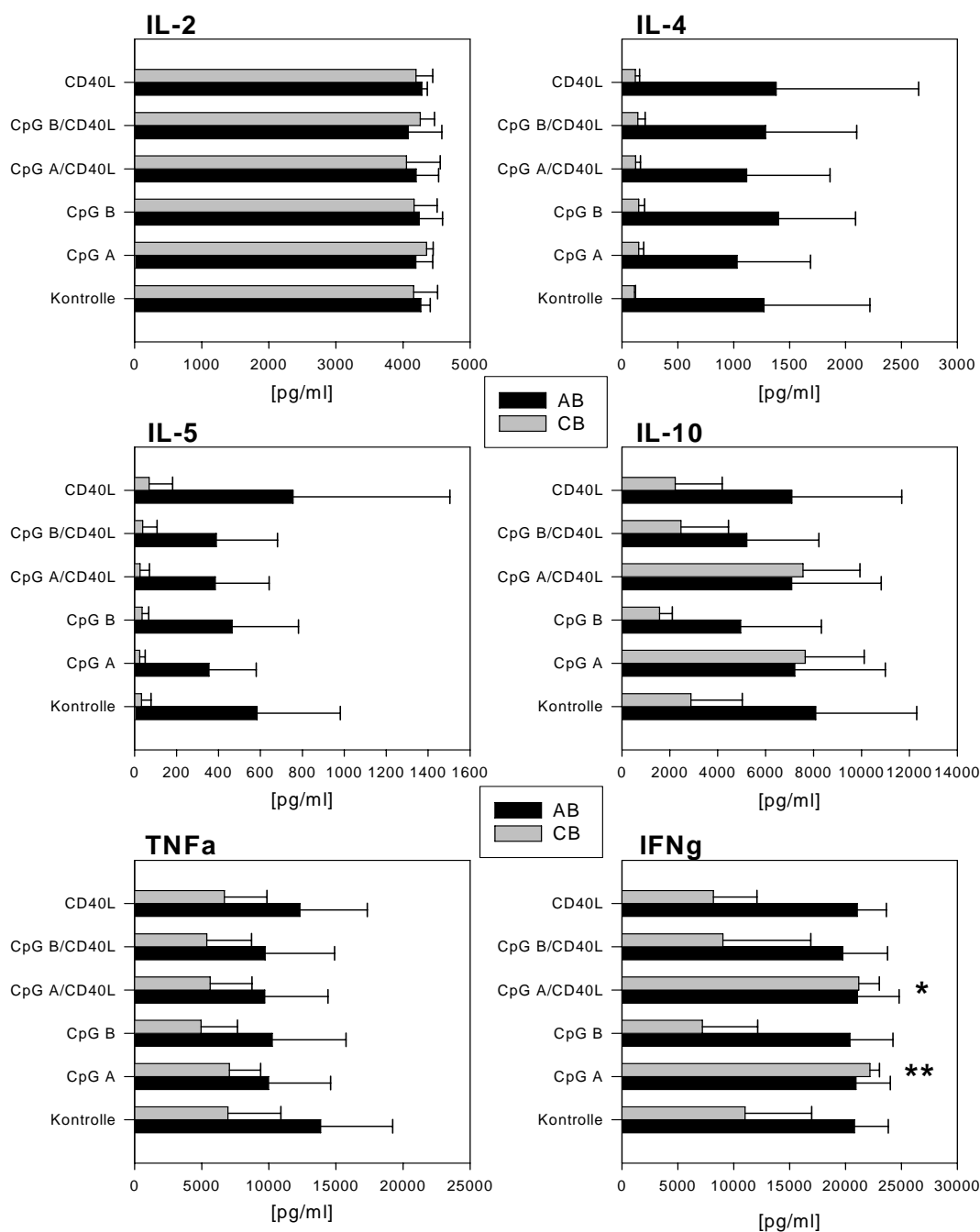


Abbildung 3.40: Zytokinproduktion der T-Zellen nach Inkubation mit pDC. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (s. Anhang). [n=5-11] * Vergleich unstimulierte Kontrolle gegen CpG A/CD40L stimulierte pDC ($p=0,00101$), ** Vergleich unstimulierte Kontrolle gegen CpG A stimulierte pDC ($p=0,0008$); students t-test

Die Stimulation der T-Zellen mit anti-CD3/CD28 Antikörpern führte zu einer deutlichen IL-2 Produktion in adulten und neonatalen T-Zellen, unabhängig zugeführter pDC (Abb. 3.40). Die Stimulation der pDC hatte auch keinen Einfluss auf die Synthese von IL-4 und IL-5, wobei die adulten Zellen auffallend mehr IL-4 und IL-5 sekretierten als die neonatalen Zellen. Hinsichtlich der IL-10 Synthese konnte nachgewiesen werden, dass die Stimulation der adulten T-Zellen mit anti-CD3/CD28 Antikörpern eine deutliche IL-10 Produktion hervorrief, die sich wiederum unabhängig von der Stimulation der pDC darstellte. Im Gegensatz dazu produzierten die neonatalen T-Zellen, welche mit unstimulierten bzw. CpG B und/oder CD40L stimulierten neonatalen pDC inkubierten etwa die Hälfte der adulten IL-10 Konzentration. Die Aktivierung der neonatalen pDC mit CpG A hingegen induzierte IL-10 Konzentrationen in den kombinierten Zellkulturüberständen, die denen der adulten Zellen entsprachen. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigte sich beim Nachweis von IFN γ . Die neonatalen T-Zellen, welche mit CpG A-stimulierten pDC inkubierten, synthetisierten signifikant mehr IFN γ als die T-Zellen, die mit unstimulierten neonatalen pDC kokultiviert wurden. Die gemessene Konzentration von IFN γ entsprach denen, die in den adulten Zellkulturen detektiert wurden.

3.4. Molekularbiologischer Nachweis der Toll-like Rezeptoren

Für das adulte humane Immunsystem sind zehn verschiedene Toll-like Rezeptoren (TLR) beschrieben. Die Verteilung der TLR auf humanen neonatalen Zellen ist bislang noch ungeklärt. Aus diesem Grund wurde die Expression der TLR mRNA vor und nach PAMP-Bindung in neonatalen DC im Vergleich zu adulten DC charakterisiert. Die Amplifizierung der TLR mRNA erfolgte mit dem LightCycler™ (Kap. 2.16.1.) wobei für jeden TLR eine spezifische PCR etabliert werden musste. Dazu wurden unreife neonatale und adulte mDC (Kap. 3.1.2.) mit den PAMP Zymosan, Poly(I:C), LPS, Flagellin, Malp2, Loxoribin, R848, CpG A+B bzw. mit einer Kombination aus allen zur Verfügung stehenden PAMP für 24 h stimuliert (Kap. 2.10.) und geerntet. Vergleichskulturen derselben Zellsuspension ohne Pathogenzusatz dienten als Kontrollen. Monozyten, unreife und stimulierte DC wurden mit PBS gewaschen, deren RNA isoliert (Kap. 2.16.2.), mittels Reverser Transkription cDNA hergestellt (Kap. 2.16.3.) und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Kalibrierung der Quantifizierung der TLR-spezifischen mRNA folgte eine Aktin-PCR. Dazu wurde die Konzentration der Menge des TLR-Produkts durch die Aktin-Konzentration der Proben dividiert. Aufgrund der deutlich geringeren TLR mRNA Expression im Vergleich zu Aktin wurde dabei der Quotient aus fg (für die TLR) und μ g (für Aktin) gebildet.

Die Kriterien einer optimalen PCR, d.h. eine möglichst große Produktausbeute bei geringer Entstehung von Primer-Dimeren oder Nebenprodukten, konnten nicht für alle spezifischen

TLR-PCR erfüllt werden. Trotz Einsatz kommerzieller TLR5- und TLR6-Primer konnte keine optimale TLR5 respektive TLR6 PCR etabliert werden. Die PCR für den Nachweis der TLR9 mRNA erbrachte nur schwach detektierbare Produkte. Für TLR2, TLR3, TLR4, TLR7, TLR8 und TLR10 wurden spezifische PCR-Protokolle erarbeitet, spezifische Standardreihen produziert und die TLR mRNA in Monozyten, unreifen und stimulierten adulten und neonatalen mDC analysiert.

TLR: **L** **1** **2** **3** **4** **L** **7** **8** **9** **10** **L**

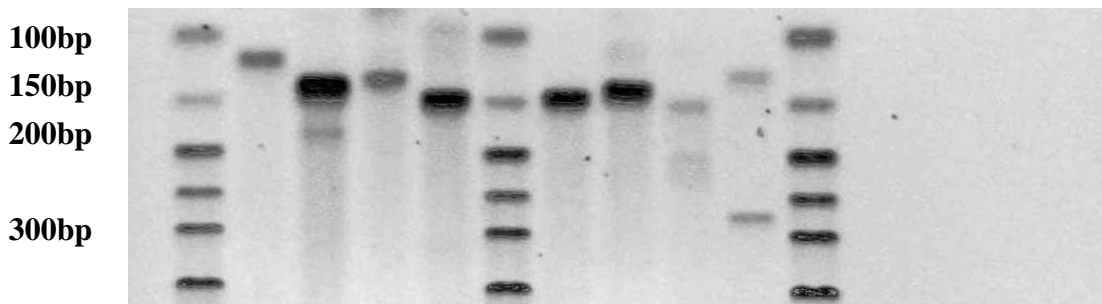


Abbildung 3.41: Gelbild der amplifizierten Produkte aus den spezifischen TLR-PCR. Eine 50bp Leiter (L) diente zur Überprüfung der Produktlängen. Die mRNA aus amplifizierten Monozyten und unreifen DC und der einzelnen TLR sind TLR-gemäß nummeriert.

3.4.1. Nachweis der Toll-*like* Rezeptor mRNA in Monozyten und unreifen dendritischen Zellen

Um Veränderungen der Expression der TLR während der DC Reifung überprüfen zu können, wurden die isolierten adulten und neonatalen Monozyten als Ausgangspopulation und die unreifen DC als intermediäre Population auf ihre TLR mRNA Expression untersucht. Um die individuelle Streubreite der TLR mRNA Expression darzustellen, wurden in *Abbildung 3.42* alle gemessenen Proben einbezogen. Die waagerechten Marker lassen den Medianwert erkennen.

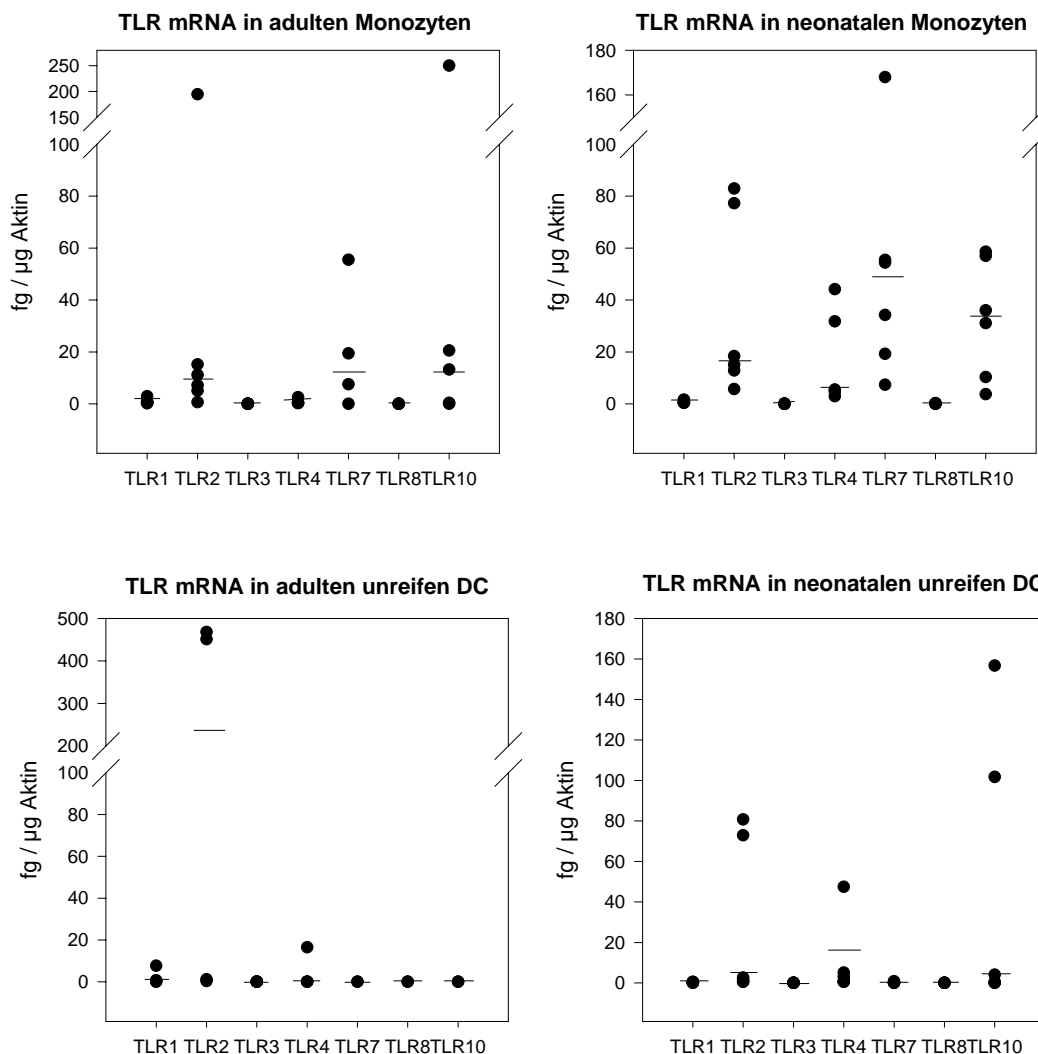


Abbildung 3.42: Nachweis der TLR mRNA in Monozyten und unreifen DC (imDC). Aus den isolierten adulten und neonatalen Monozyten und den mit GM-CSF und IL-4 kultivierten imDC wurde RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und den spezifischen TLR-PCR Protokollen für TLR1, -2, -3, -4, -7, -8 und -10 unterzogen. Dargestellt sind alle Proben (s. Anhang), die Striche verdeutlichen den jeweiligen Medianwert (je n=6).

Während sowohl in adulten wie in neonatalen Monozyten keine TLR1, TLR3 und TLR8 mRNA Expression zu erkennen war, konnte die mRNA für die TLR2, TLR4, TLR7 und TLR10 detektiert werden. Dabei exprimierten die neonatalen Monozyten deutlich mehr TLR4, TLR7 und TLR10 mRNA als die adulten Monozyten. Auch die TLR2 mRNA zeigte in den neonatalen Monozyten eine tendenziell höhere Expression mit einem Median von 16,7 fg/µg Aktin im Vergleich zu den adulten Monozyten mit einem Median von 9,1 fg/µg Aktin. Besonders auffällig war die Reduktion der TLR mRNA Expression, wenn Monozyten zu unreifen DC differenzieren. In den adulten imDC zeigten die Medianwerte nur minimale mRNA Level an, mit einer Ausnahme, TLR2. Die Expression der TLR2 mRNA in adulten imDC stieg auf über 200 fg/µg Aktin an, während sie in neonatalen imDC auf 2 fg/µg Aktin sank. Die Synthese von TLR7 und TLR10 mRNA reduzierte sich in den adulten wie in den

neonatalen Proben. Bei neonatalen imDC konnte ausschließlich für die TLR4 mRNA Expression ein leichter Anstieg im Vergleich zu den Monozyten festgestellt werden.

3.4.2. Nachweis der Toll-like Rezeptor mRNA in stimulierten dendritischen Zellen

Die unreifen DC wurden mit TLR-Liganden stimuliert (Kap. 2.10.), RNA isoliert (Kap. 2.16.2.) und in cDNA kopiert (Kap. 2.16.3.). Für jede spezifische Stimulation wurde die jeweilige spezifische PCR durchgeführt. Zusätzlich wurden die unstimulierten Kontrollzellen und Zellen, die mit einer Kombination aus mehreren TLR-Liganden inkubiert wurden, auf den Gehalt der entsprechenden mRNA kontrolliert (Abb. 3.43).

Für den Nachweis der TLR mRNA in den spezifischen PCR erfolgte die Stimulation der DC nach folgendem Schema (Tab. 3.9):

Tabelle 3.9: Übersicht der TLR-Liganden und deren Kombinationen mit denen die unreifen DC 24 h stimuliert wurden.

	TLR Ligand	1. Kombination	2. Kombination	Bemerkung
TLR1 PCR				Bis dato keine Liganden bekannt
TLR2 PCR	Zymosan	+ LPS		
TLR3 PCR	Poly(I:C)	+ LPS		
TLR4 PCR	LPS	+ IFN γ	+ ssRNA	
TLR5 PCR	Flagellin			Kein spezifisches PCR-Produkt
TLR6 PCR	Malp2			Kein spezifisches PCR-Produkt
TLR7 PCR	Loxoribin			
TLR8 PCR	ssRNA	+ LPS		
TLR9 PCR	CpG A	CpG B		
TLR10 PCR				Bis dato keine Liganden bekannt

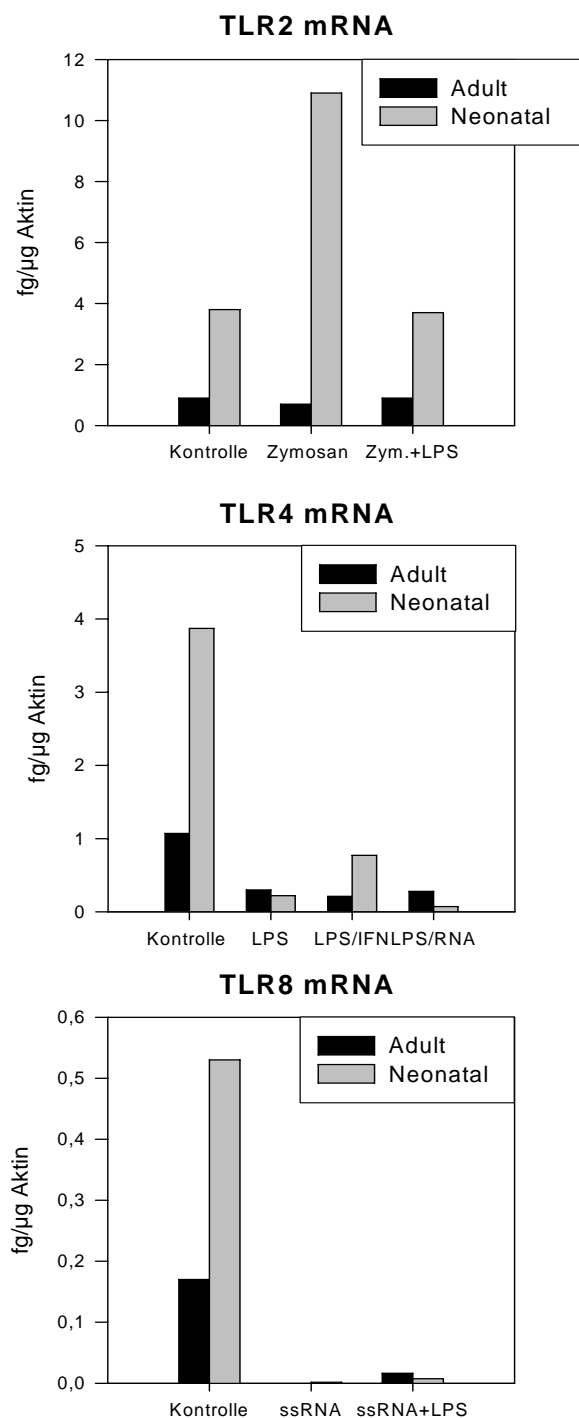


Abbildung 3.43: Nachweis der TLR mRNA in stimulierten DC. Die unreifen DC wurden mit den in Tab. 3.9 beschriebenen TLR-Liganden und -kombinationen für 24 h stimuliert, die Zellen geerntet, die RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und den spezifischen TLR-PCR Protokollen für TLR1, -2, -3, -4, -7, -8 und -10 unterzogen. Dargestellt sind die Medianwerte (s. Anhang). [n=6]

Weder in adulten noch in neonatalen unstimulierten Kontrollzellen bzw. stimulierten DC konnte die mRNA für die Toll-like Rezeptoren 3, 7 und 10 detektiert werden. Im Gegensatz dazu wurden große Mengen TLR2 mRNA in neonatalen DC nachgewiesen, während die adulten unstimulierten und stimulierten DC nur wenig TLR2 mRNA exprimierten. Die Inkubation der DC mit dem TLR2-Ligand Zymosan konnte einen Anstieg der TLR2 mRNA von 3,9 fg/ μ g Aktin auf 11 fg/ μ g Aktin in neonatalen DC induzieren.

Ähnlich den unreifen DC wurde auch in neonatalen unstimulierten DC eine dreifache Menge an TLR4 mRNA im Vergleich zu den adulten unstimulierten DC nachgewiesen. Die Stimulation der DC reduzierte die Synthese an TLR4 mRNA in adulten wie in neonatalen Zellen.

Mit Hilfe der TLR8-spezifischen PCR konnte ebenfalls eine deutlich höhere Syntheserate an TLR8 mRNA in neonatalen unstimulierten DC im Vergleich zu adulten unstimulierten DC gemessen werden. Die Inkubation der

Zellen mit den TLR Agonisten reduzierte die TLR8 mRNA Expression auf nahezu 0 fg/ μ g Aktin.

3.5. Molekularbiologischer Nachweis des Interleukins 27 (IL-27)

Interleukin-27 ist ein Heterodimer, bestehend aus einer sog. p28 Untereinheit und dem *Epstein-Barr virus-induced gene 3* (EBI3) und gilt als ein frühes Produkt aktivierter dendritischer Zellen. Die Bindung von IL-27 an den WSX-1 Rezeptor auf T-Zellen initiiert eine Th1-gerichtete Immunantwort. Da in der vorliegenden Arbeit u.a. die Fähigkeit der neonatalen Immunzellen, Th1- gerichtete Immunantworten zu generieren, untersucht werden sollte und da über die Expression von IL-27 im neonatalen Immunsystem bis *dato* keine Daten existierten, wurde die Expression der IL-27p28 mRNA, der EBI3 mRNA und der WSX-1 mRNA auf neonatalen mDC bzw. T-Zellen analysiert. Adulte mDC und T-Zellen dienten als Vergleichspopulationen. Die Amplifizierung der mRNA erfolgte im LightCycler™ (Kap. 2.16.1.) wobei für p28, EBI-3 und WSX-1 jeweils eine spezifische PCR etabliert werden musste. Die Monozyten, unreifen und stimulierten DC und T-Zellen wurden mit PBS gewaschen, deren RNA isoliert (Kap. 2.16.2.), mittels Reverser Transkription in cDNA umgeschrieben (Kap. 2.16.3.) und bis zur Verwendung bei -20°C gelagert. Zur Kalibrierung der Quantifizierung der TLR-spezifischen mRNA folgte eine Aktin-PCR. Dazu wurde die Konzentration der Menge des TLR-Produkts durch die Aktin-Konzentration der Proben dividiert. Aufgrund der deutlich geringeren TLR mRNA Expression im Vergleich zu Aktin wurde dabei der Quotient aus fg (spezifisches Produkt) und µg (für Aktin) gebildet. Für IL-27p28, EBI3 und WSX-1 wurden spezifische PCR-Protokolle (Kap. 2.17.) erarbeitet, spezifische Standardreihen produziert (Kap. 2.16.8.) und die mRNA in Monozyten, unreifen und stimulierten adulten und neonatalen mDC analysiert. Die Expression der WSX-1 mRNA wurde auch in adulten und neonatalen T-Zellen nachgewiesen.

3.5.1. Expression der Interleukin-27 mRNA in dendritischen Zellen

Die adulten und neonatalen unreifen DC welche aus Monozyten generiert worden waren (Kap. 2.9.), wurden mit den TLR-Liganden LPS, ssRNA und IFN γ 48 h stimuliert (Kap. 2.10.). Unstimulierte Zellen dienten als Kontrollen. Für die dendritischen Zellen wurden die spezifischen PCR-Protokolle für den Nachweis von IL-27p28 und EBI-3 durchgeführt (Abb. 3.44).

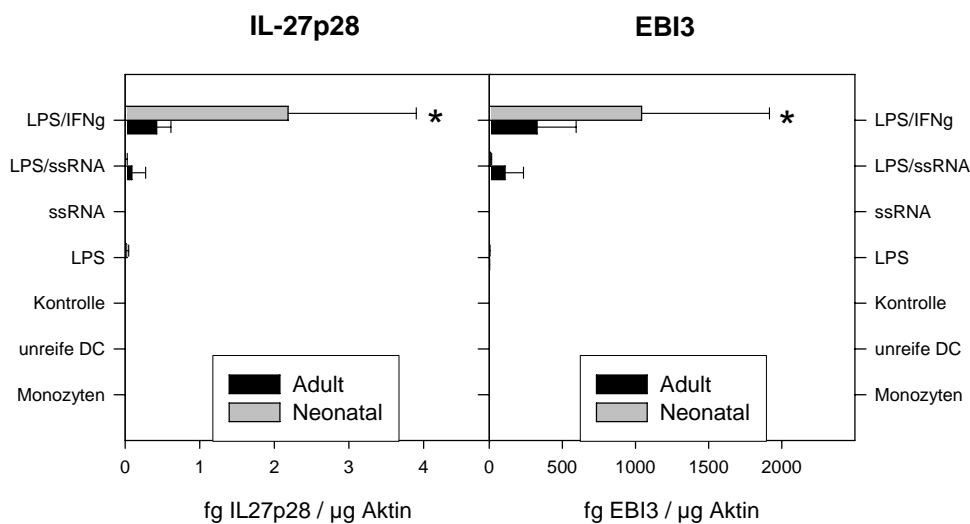


Abbildung 3.44: Nachweis der IL-27 mRNA in dendritischen Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (s. Anhang). [n=5-11] Vergleich adult versus neonatal * $p < 0,05$; students t-test

Die Produktion von IL-27p28 in neonatalen dendritischen Zellen wurde ausschließlich nach Inkubation der Zellen mit der Kombination aus LPS und IFN γ induziert. Dabei sekretierten die neonatalen DC signifikant mehr IL-27p28 mRNA als die adulten DC. Ein ähnliches Expressionsmuster zeigte sich für den Nachweis der zweiten IL-27 Untereinheit EBI-3. Nur die kombinierte Stimulation mit LPS und IFN γ führte zur Sekretion der EBI-3 mRNA in neonatalen DC, die signifikant höher war als in der adulten Vergleichspopulation. Die Kombination aus LPS und ssRNA induzierte in adulten DC eine minimale Produktion von IL-27p28 und EBI-3 mRNA.

3.5.2. Expression der Interleukin-27 Rezeptor mRNA in dendritischen Zellen und T-Zellen

Für den Nachweis der mRNA des IL-27 Rezeptors WSX-1 wurde die WSX-1 spezifische PCR (Kap. 2.17.) durchgeführt und die WSX-1 mRNA in den Proben anhand einer IL-27 Verdünnungsreihe quantifiziert.

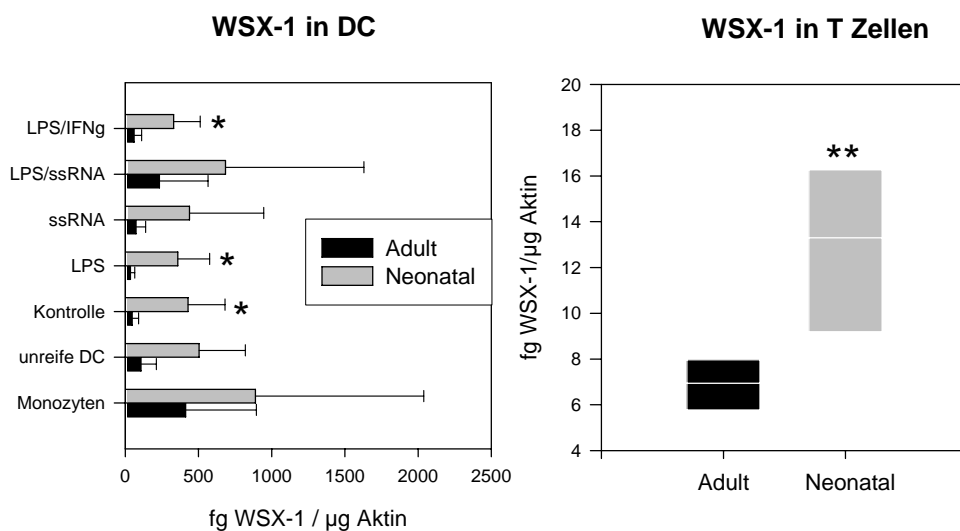


Abbildung 3.45: Nachweis der WSX-1 mRNA in DC und T Zellen. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen (s. Anhang). [n=5-11] Vergleich adult versus neonatal **p<0,01; *p<0,05; students t-test

Die mRNA des Rezeptors für IL-27, WSX-1, konnte sowohl in adulten und neonatalen DC als auch in adulten und neonatalen T-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 3.45). Es war sehr auffällig, dass die neonatalen DC und die neonatalen T-Zellen signifikant mehr WSX-1 mRNA exprimierten als die adulten DC und T-Zellen. Die adulten und neonatalen Monozyten zeigen den IL-27 Rezeptor, wobei die neonatalen Monozyten etwa doppelt soviel WSX-1 mRNA produzierten als die adulten Monozyten.

4. Diskussion

Die Morbidität und Mortalität im Säuglingsalter wird dem unreifen neonatalen Immunsystem zugeschrieben. Es wurde vermutet, dass die neonatalen T-Zellen für die Immunschwäche Neugeborener verantwortlich sind⁷⁰⁻⁷³. Im Laufe der intensiven Untersuchungen des neonatalen Immunsystems der letzten Jahre wurde jedoch immer deutlicher, dass die neonatalen Antigen-präsentierenden Zellen – im Besonderen die dendritischen Zellen (DC) - entscheidende Defizite aufweisen^{37,38,74,75}. In der vorliegenden Arbeit wurden neonatale DC untersucht, phänotypisch charakterisiert und hinsichtlich ihrer Funktion analysiert und mit adulten DC verglichen.

Aufgrund der geringen Zellzahl können dendritische Zellen nicht direkt aus Vollblut isoliert werden. Demzufolge wurden in der vorliegenden Arbeit verschiedene Protokolle getestet, unreife DC zu generieren. Mit Hilfe der Methode der magnetischen Zellsortierung (MACS®) war es möglich aus Nabelschnurblut und peripherem Blut Erwachsener hochreine hämatopoetische Stammzellen (HPC), Monozyten und plasmazytoide DC zu isolieren. Hämatopoetische Stammzellen wurden als Vorläuferzellen genutzt, da diese *in vitro* unbegrenzt amplifiziert werden konnten, ohne deren Differenzierung zu beeinflussen⁷⁶⁻⁷⁸, so dass viele Versuche mit der Probe eines Individuums durchführbar waren. Es stellte sich heraus, dass adulte HPC sich nicht amplifizieren lassen. Möglicherweise sind adulte HPC im peripheren Blut bereits mit Mediatoren in Berührung gekommen, die deren Funktionen beeinflussen, so dass diese nicht mehr so „naiv“ sind wie neonatale HPC. Somit wurden alle Versuche mit DC aus neonatalen HPC (HPC-DC) durchgeführt. Im Gegensatz dazu zeigten adulte und neonatale Monozyten kaum phänotypische und funktionelle Unterschiede, so dass adulte als auch neonatale aus Monozyten generierte DC (mDC) für alle Versuche verwendet werden konnten. Adulte und neonatale plasmazytoide DC (pDC) wurden direkt aus Vollblut isoliert. Eine Amplifikation oder Generierung plasmazytoider DC aus anderen Zellpopulationen war nicht möglich.

Für alle unreifen DC konnte bezüglich der Aktivierungsmarker CD80, CD83 und CD86 durchflusszytometrisch nachgewiesen werden, dass die Isolation bzw. Differenzierungskultur mit GM-CSF und IL-4 zu keiner unspezifischen Aktivierung der DC führte. Somit wurden diese Zellen als Modellzellen für unreife DC genutzt. Das Expressionsmuster der Oberflächenmoleküle auf unreifen DC aus unterschiedlichen Vorläuferzellen konnten in gleicher Weise auch Dilioglou *et al.* (2003) zeigen⁷⁹.

Die unreifen dendritischen Zellen wurden in FCS-haltigem Medium differenziert. Diese Vorgehensweise beinhaltet das Risiko einer unspezifischen Aktivierung der DC durch Fremdantigene und Mediatoren. Es wurde beobachtet, dass DC, welche in FCS-haltigem

Medium kultiviert wurden, mehr IL-12 produzierten, als DC, welche in autologem Plasma inkubierten⁸⁰. Da autologes Plasma nicht in ausreichenden Mengen zur Verfügung stand, wurden als Alternative in der vorliegenden Arbeit für die Amplifikation der HPC AB-Serum und sog. ES-FCS als Einfriermedium aller PBMC und für die DC-Kulturen verwendet. ES-FCS ist ein Serum welches ursprünglich für die Kultivierung embryonaler Stammzellen angeboten wird. Für die kombinierten Zellkulturen diente autologes Plasma als Kulturmediumzusatz.

Mit Hilfe der vorliegenden Arbeit wurden Unterschiede zwischen adulten und neonatalen DC analysiert, um Hinweise zu erhalten, inwieweit die neonatale Anfälligkeit für Infektionserkrankungen auf einer mangelnden Fähigkeit dendritischer Zellen zur Reifung beruht. Dazu wurden unreife DC mit verschiedenen Pathogen-assoziierten Molekülen und Mediatoren stimuliert und durchflusszytometrisch charakterisiert.

Die amplifizierten hämatopoetischen Stammzellen zeichneten sich durch eine sehr geringe Expression der als Reifungsmarker bekannten Oberflächenmoleküle CD80, CD83 und CD86*high* aus. Die Inkubation der Zellen mit GM-CSF und IL-4 induzierte keine Erhöhung der CD80, CD83 und CD86*high* Expression, was für ein unreifes Stadium der HPC-DC sprach. Die Expression des MHC Klasse II Moleküls HLA-DR und CD86*all* wird - analog zu mehreren Veröffentlichungen - unreifen DC zugeschrieben^{78,81,82}. Während ihrer Reifung, verlieren dendritische Zellen ihre Fähigkeit zur Antigenaufnahme zugunsten einer starken Antigenpräsentation und Aktivierungspotenz für T-Zellen⁸³. Aus diesem Grund wurde die Aktivierungspotenz und somit der Reifungszustand der HPC-DC anhand der Reifungsmarker CD80, CD83, CD86*high*, HLA-DR und CD86*all* nach Stimulation der DC analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass die einzelnen PAMP nur einen schwachen Einfluss auf die Reifung der HPC-DC hatten. Besonders auffällig hingegen war der Anstieg der Expression der Oberflächenmarker nach Inkubation der HPC-DC mit LPS in Kombination mit IFN γ bzw. nach Stimulation aller TLR durch die Kombination der TLR-Liganden. Dabei war die synergistische Wirkung von LPS mit IFN γ deutlich ausgeprägter, als die Synergie zwischen den TLR-Liganden. Die Inkubation der HPC-DC mit IFN γ alleine, unterdrückte die Expression der Kostimulatoren. Diese Beobachtungen stimmen mit denen von Rongcun *et al.* (1998) überein, die die Hypothese aufstellten, dass IFN γ die Differenzierung und Funktion dendritischer Zellen negativ beeinflusst⁸⁴: Interferon γ erhöht das Potential der Antigenpräsentation (durch Erhöhung der MHC Klasse I und MHC Klasse II Expression) und der Adhäsion zwischen DC und T-Zelle. Zur gleichen Zeit unterdrückt IFN γ die Expression von Kostimulatoren (CD80), welche für die Aktivierung von Th1-Zellen benötigt werden. Somit ist ein immunregulatorischer Mechanismus zwischen T-Zelle und DC gewährleistet. Aufgrund der mangelnden Amplifizierbarkeit der adulten HPC konnten keine vergleichenden Beobachtungen mit adulten HPC-DC protokolliert werden.

Ähnlich den aus HPC differenzierten unreifen DC zeigten die DC, welche aus Monozyten generiert wurden, einen CD80⁽⁺⁾, CD83⁻, CD86^{all+}, CD86^{high} und HLA-DR⁺ Phänotyp, welcher unreifen DC zugeschrieben wird^{78,81,82}. Die Expression von MHC Klasse II Molekülen war während der gesamten mDC Reifung deutlich nachweisbar, da die Zellen die MHC Klasse II Moleküle ständig von den intrazellulären vesikulären Kompartimenten auf die Oberfläche reorganisieren⁸⁵. Die Differenzierung der unreifen DC aus Monozyten lies sich besonders gut am Auftreten des Oberflächenmarkers CD209 erkennen, der auf Monozyten komplett fehlte, jedoch auf den mit GM-CSF und IL-4 inkubierten Zellen zu über 90% nachweisbar war. CD209 (DC-SIGN) ist ein DC-spezifischer Adhäsions-Rezeptor u.a. für *Candida albicans*, welcher Antigene internalisiert^{86,87}. Aufgrund der Tatsache, dass DC-SIGN neben den TLR einer der wichtigsten Pathogenerkennungszusatzrezeptoren (*pathogen-recognition receptor* – PRR) ist, welcher sowohl Viren⁸⁸ als auch Parasiten⁸⁹ und Pilze⁸⁶ erkennt und phagozytiert, könnten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit darauf hinweisen, dass neonatale mDC bezüglich dieses PRR - Mechanismus keine Defizite aufweisen.

Ähnlich den aus HPC generierten DC, induzierte die Stimulation aller TLR unter Kombination der TLR-Liganden die stärkste Reifung der mDC. Bemerkenswerterweise konnte die alleinige Stimulation einiger TLR ebenfalls die Reifung der adulten und neonatalen mDC induzieren. Dabei war die Aktivierung der mDC mit Zymosan, Poly(I:C), LPS und R848 besonders effektiv. Dilioglou *et al.* (2003) stimulierten ebenfalls neonatale DC aus HPC bzw. Monozyten mit dem TLR Liganden LPS und fanden gleiche Expressionsmuster der Reifungsmarker CD80 und CD86⁹⁰. De Wit *et al.* (2003) beobachteten in Vollblutkulturen, dass neonatale Zellen auf die Stimulation mit Poly(I:C) bzw. LPS gleiche Level an CD86 und HLA-DR zeigten wie adulte DC, die neonatalen DC jedoch mit einer signifikant niedrigeren CD80 Expression reagierten⁹¹. Gold *et al.* (2006)⁹² wiesen auf große individuelle Schwankungen in Vollblutkulturen hin und De Wit *et al.* untersuchten nur je fünf Individuen. In den Stimulationskulturen mit LPS der DC, welche aus Monozyten generiert wurden, konnte nachgewiesen werden, dass adulte mDC jeweils mehr Reifungsmarker exprimierten als die neonatalen mDC. Auch Langrish *et al.* (2002) beobachteten, dass neonatale DC im Vergleich zu adulten DC phänotypisch unreif bleiben, wenn sie nur mit LPS stimuliert werden⁷⁴. Möglicherweise benötigen neonatale DC zur effizienten Expression von Reifungsmarkern und Kostimulatoren entweder höhere Stimulanzkonzentrationen oder eine kombinierte Aktivierung. Die simultane Stimulation von TLR3 und TLR8 bzw. TLR4 und TLR8 übertraf die stimulatorische Kapazität der TLR-Liganden-Kombination um ein Vielfaches. Die synergistische Wirkung von TLR-Agonisten wurden für adulte DC bereits beschrieben⁴⁸. Napolitani *et al.* (2005) entdeckten zudem, dass humane und murine DC, welche mit Poly(I:C) und LPS in Kombination mit R848/ssRNA und CpG stimuliert wurden, immunmodulierende Gene um ein Vielfaches mehr hochregulieren, als DC, welche mit nur einem Liganden aktiviert wurden⁹³. Einzelstrang-RNA (*single strand RNA*; ssRNA) ist der natürliche Ligand für TLR8 (bei Mäusen TLR7) der, reich an Uracil und Guanin, in verschiedenen Viren zu finden ist^{94,95}. Aus diesem Grund ist es möglich,

dass während viraler Infektionen die virale RNA in endosomal infizierten DC simultan sowohl TLR3 als auch TLR8 innerhalb endosomaler Kompartimente bindet. Andererseits ist eine kaskadierte Stimulationssituation vorstellbar, in der die TLR3-Stimulation eine vorangehende Voraussetzung für die Ansprechbarkeit des TLR8 darstellt. Darüber hinaus haben mehrere Publikationen gezeigt, dass auch endogene TLR4 Liganden an der Immunantwort gegen virale Infektionen beteiligt sein können⁹⁶⁻⁹⁸. Somit wurden in der vorliegenden Arbeit lebensnahe physiologische Bedingungen, bei denen mehrere verschiedene TLR gleichzeitig gebunden werden, simuliert und folglich optimale Immunantworten hervorgerufen. Unterstützt wird diese Hypothese durch die Beobachtung, dass die hitzeinaktivierten uropathogenen *E.coli* (HKUEC), ebenfalls eine Steigerung der Expression der Kostimulatoren hervorriefen. Bei diesem „kompletten“ Pathogen kann man davon ausgehen, dass verschiedene TLR gebunden und aktiviert werden und somit synergistisch zusammenarbeiten.

Die größten Unterschiede in der Expression der Reifungsmarker und Kostimulatoren zwischen adulten und neonatalen mDC fanden sich nach Stimulation der Zellen mit Flagellin. Die neonatalen mDC reagierten deutlich weniger als ihre adulten Pendanten. Dass humane adulte mDC nach Bindung des TLR5 durch Flagellin effizient reifen können, bewiesen Means *et al.* bereits 2003⁹⁹. Sie stimulierten adulte DC, welche aus Monozyten generiert worden waren, mit Flagellin und beobachteten, dass die dendritischen Zellen CD83, CD80, CD86, MHC Klasse II und CCR7 hochregulierten. Auffallend war, dass murine DC durch Flagellin nicht aktiviert wurden. Auch Agrawal *et al.* (2003) detektierten die Hochregulation von CD80, CD83 und CD86 auf Flagellin-stimulierten adulten mDC¹⁰⁰. Übereinstimmend mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit war die Wirkung auf die Reifung der mDC von Flagellin deutlich ausgeprägter als die von PamCys und vergleichbar mit der Wirkung von LPS. Über den Einfluss von Flagellin in neonatalen Zellen ist bislang nur eine Arbeit publiziert. Angelone *et al.* (2006) beobachteten eine signifikant höhere IL-6- bei niedrigerer TNF α -Produktion in neonatalen im Vergleich zu adulten Flagellin-stimulierten Monozyten¹⁰¹. Die biologische Signifikanz der murinen und humanen neonatalen Unfähigkeit auf Flagellin die Reifungsmarker hoch zu regulieren, ist unklar. Möglicherweise sind sowohl Mäuse als auch Neugeborene anfälliger für begeißelte Bakterien. Andererseits können bei einer Infektion mehrere TLR stimuliert werden und die Aktivierung des TLR durch Flagellin ist nur eine von möglichen Interaktionen⁴⁸: Zum Beispiel binden die Bestandteile des *Mycobacterium tuberculosis* die TLR2, TLR4 sowie TLR9 und die Bestandteile des *Influenza virus* TLR3, TLR4 und TLR8. Ein weiterer Hinweis auf die unterschiedliche Immunantwort nach TLR-Stimulation von Mäusen und Menschen zeigte sich in der Reaktion auf den TLR6 Liganden Malp2. In DC, welche aus humanen hämatopoetischen Stammzellen generiert wurden, konnte nach Stimulation mit Malp2 keine Reifung, d.h. keine Hochregulierung der Expression der Reifungsmarker und Kostimulatoren festgestellt werden. Im Gegensatz dazu

beschreiben Link *et al.* (2004) Malp2 als einen potenten DC Reifungsliganden bei DC, die aus murinen HPC generiert wurden ¹⁰².

Während De Wit *et al.* (2004) nach Stimulation plasmazytoider DC mit CpG B deutlich niedrigere Level an CD40, CD80, CD83 und CD86 auf neonatalen pDC detektierten als auf adulten pDC ⁷⁵, exprimierten die neonatalen pDC in der Publikation von Gold *et al.* (2006) mehr CD80 und CD86 als die adulten pDC ⁹². Allerdings stimulierten De Wit *et al.* die Zellen in Vollblutkulturen, während die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit und die von Gold *et al.* aus Versuchen mit isolierten pDC hervorgegangen sind. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass es keine signifikanten Unterschiede in der Expression der Reifungsmarker und Kostimulatoren zwischen neonatalen und adulten pDC gibt.

Neben den Oberflächenmolekülen, die an der Antigenpräsentation bzw. Kostimulation beteiligt sind, wurden Pathogenerkennungrezeptoren, die sog. Toll-like Rezeptoren (TLR), nachgewiesen. Da der Nachweis der TLR aufgrund ihrer schwachen Expression auf der Oberfläche, der Expression einiger TLR in endosomalen Kompartimenten ¹⁰³ und mangelnder verfügbarer Antikörper sehr schwierig war, erfolgte die Analyse der TLR-Expression molekulargenetisch durch den Nachweis der mRNA. Die Dichte der TLR-Oberflächenexpression konnte auch von anderen Arbeitsgruppen nur für wenige TLR quantitativ geschätzt werden. Visintin *et al.* (2001) bestimmten die TLR1 und TLR4 Oberflächenexpression mit Hilfe von *Northern Blots*, da auch sie durchflusszytometrisch keine eindeutige Beobachtungen machen konnten ⁴⁴. Sie schätzten den TLR1 auf humanen Monozyten auf 2.100 Moleküle pro Zelle, auf unreifen DC auf 230 Moleküle pro Zelle und auf reifen DC auf nur 180 Moleküle pro Zelle. Den TLR 4 konnten sie nur auf Monozyten mit 1.300 Molekülen pro Zelle bestimmen, da die Expression auf unreifen DC auf unter 75 Moleküle pro Zelle sank. Du *et al.* (1999) postulierten gar, dass die Anzahl der TLR4-Moleküle auf Immunzellen nicht ausreichen, um eine Antwort auf LPS zu induzieren ¹⁰⁴. Die extrem niedrige Expression der TLR1 und TLR4 ist wahrscheinlich ein wichtiger Aspekt in der Regulation der TLR Funktion, die darauf zielt, eine zu starke Reaktionen auf geringe Konzentrationen verschiedener PAMP zu verhindern. Bei kompetenter Stimulation, d.h. wenn hohe Pathogenkonzentrationen vorliegen und dadurch gleichzeitig unterschiedliche TLR stimuliert werden, arbeiten die TLR synergistisch zusammen und leiten eine Immunantwort ein, so dass jeweils nur wenige Rezeptoren nötig sind. Diese Hypothese entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, bei denen die kombinierte TLR Stimulation in jedweder Hinsicht zur Reifung der DC führte. Dementsprechend konnte der TLR1, welcher mit TLR2 nach Stimulation der Zellen Heterodimere bildet ¹⁰⁵, in Monozyten, unreifen mDC und stimulierten mDC nur in minimalen Mengen detektiert werden, wobei sich keine Unterschiede zwischen adulten und neonatalen mDC ergaben. Ähnlich verhielt es sich mit der Expression der TLR3 und TLR8, deren mRNA weder von Monozyten noch von unreifen mDC exprimiert wurde. Während der mDC-Kultur konnte allerdings in den unstimulierten mDC TLR8 mRNA nachgewiesen werden, wobei die neonatalen mDC deutlich mehr

exprimierten. Die Stimulation der Zellen mit einem TLR8 Liganden unterdrückte die TLR8 mRNA Synthese. Diese Ergebnisse stehen in Einklang mit denen von Kokkinopoulos *et al.* (2005), die ebenfalls keine TLR8 mRNA nach Stimulation der DC nachweisen konnten⁴³. Im Gegensatz dazu konnten sowohl TLR2, TLR4, TLR7 und TLR10 mRNA nach Stimulation detektiert werden. Während die TLR Expression in adulten und neonatalen mDC kaum variierte, exprimierten die adulten unreifen mDC TLR2, jedoch kein TLR4, die neonatalen mDC *vice versa*. Nachdem die mDC stimuliert wurden, konnte in den neonatalen mDC auffallend mehr TLR2 nachgewiesen werden als in den adulten mDC. Der TLR4 wurde vor allem, ähnlich dem TLR8, in unstimulierten neonatalen mDC exprimiert. Zur Expression der TLR in neonatalen mDC gibt es bislang keine Publikationen. Aus diesem Grund konnten nur Veröffentlichungen zu adulten mDC als Vergleich herangezogen werden. Neben einigen Übereinstimmungen sind einige Diskrepanzen in den Ergebnissen zwischen der vorliegenden Arbeit aber auch zwischen den Ergebnissen anderer Veröffentlichungen auffallend^{44,68,106}, was zum Teil daher rührt, dass viele Beobachtungen ausschließlich bei adulten Zellen gemacht wurden. Zum Beispiel konnten einige Arbeitsgruppen in adulten Monozyten TLR4 mRNA und die Expression von TLR3 mRNA in unreifen DC nachweisen. Dafür fanden Muzio *et al.* (2000) im Gegensatz zu Visintin *et al.* (2001) TLR5 in unreifen DC statt in Monozyten^{106,44}. Zudem beobachteten Visintin *et al.* eine exzeptionell hohe Variabilität in der TLR Expression unter „normalen“ Probanden. Dies weist darauf hin, dass die interindividuelle Variabilität in der Immunantwort auf die verschiedenen PAMP einen entscheidenden Einflussfaktor darstellt⁴⁴. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen auch, dass neonatale mDC die mRNA verschiedener TLR synthetisieren können und somit die Grundvoraussetzung haben, auf die entsprechenden Pathogene zu reagieren. Inwieweit die Proteine tatsächlich exprimiert werden, bedarf weiterer Forschung. Mit der Expression des TLR2 können Neugeborene Immunantworten gegen bestimmte Lipoproteine, Glykolipide, Hefepilze, Protozoen, gegen *Mycobacterium tuberculosis* (Tuberkulose), *Borrelia burgdorferi* (Borreliose) und *Treponema pallidum* (Syphilis) generieren^{46,47,54,107-112}. Die Expression des TLR 4 befähigt neonatale mDC Lipopolysaccharide von *E.coli* zu binden⁵⁴ und mit den TLR7 und TLR8 virale RNA zu eliminieren⁴⁶. Für den TLR10 ist bislang kein Ligand bekannt, obwohl es Hinweise gibt, dass er mit TLR6 heterodimerisieren kann und somit zur „bakteriellen LPS“-TLR Gruppe gezählt wird¹¹³. Demzufolge ist mit der Expression der TLR die Grundvoraussetzung für Neugeborene gegeben, sowohl bakterielle als auch virale Pathogenstrukturen zu erkennen und notwendige Signale für die Einleitung der angeborenen und spezifischen Immunantwort zu senden.

Neben den phänotypischen Eigenschaften neonataler DC wurden in der vorliegenden Arbeit auch die funktionellen Charakteristika untersucht und mit adulten DC verglichen. Dazu gehörten die Expression von Zytokinen, die Kapazität, T-Zellen zu stimulieren bzw. zu differenzieren und die Phosphorylierung intrazellulärer Signalkinasen zu initiieren.

Obwohl phänotypisch sehr ähnlich, konnten in der Sekretion inflammatorischer Zytokine zwischen den unterschiedlichen Zellpopulationen Unterschiede detektiert werden. Die HPC-generierten bzw. adulten und neonatalen mDC produzierten IL-1 β ausschließlich nach kombinierter Stimulation (TLR-Kombination oder LPS mit IFN γ oder HKUEC), wobei die neonatalen mDC mehr IL-1 β sekretierten, als die adulten mDC. Die stimulierten adulten plasmazytoiden DC sekretierten im Gegensatz zu neonatalen pDC hohe Konzentrationen an IL-1 β . Interleukin-1 β , ein inflammatorisches Zytokin, wird *in vivo* am Infektionsherd von Makrophagen, Epithelzellen und dendritischen Zellen ausgeschüttet, um autokrin auf Makrophagen und DC zu wirken sowie T-Zellen zu aktivieren¹¹⁴. Luft *et al.* (2002) beobachteten *in vitro*, dass IL-1 β auf adulte DC allein keinen Einfluss hat. In Kombination mit CD40L induziert IL-1 β jedoch in adulten mDC die Produktion von IL-6, IL-10 und IL-12p70, in adulten HPC-DC die Produktion von IL-6 und IL-12p70 und in adulten Blut-DC die Produktion von IL-6 und IL-10¹¹⁴.

Hinsichtlich der Produktion von IL-6 konnte bei HPC-DC und mDC ein identisches Expressionsmuster festgestellt werden, bei dem vor allem die Stimulation mit LPS, R848 und die jeweiligen kombinierten Stimulationen zur IL-6 Sekretion führten. Die Bindung des TLR2 durch Zymosan führte zu keiner IL-6 Produktion, was den Beobachtungen von Sadeghi *et al.* (2007) bei der Stimulation von Vollblutkulturen mit Lipoteichon Säure (LTA) entspricht¹¹⁵. Bezüglich Flagellin wurde mit den vorliegenden Ergebnissen gezeigt, dass adulte mDC durch Flagellin zur IL-6 Produktion stimuliert wurden, neonatale mDC jedoch nicht, was die phänotypischen Beobachtungen bestätigt. Interleukin-6, ein Zytokin der großen Familie der Hämatoetine, wird von Makrophagen, Endothelzellen, T-Zellen und DC produziert, fördert das Wachstum und die Differenzierung von B- und T-Zellen, induziert die Produktion von Akute-Phase Proteinen in der Leber, aktiviert Lymphozyten und erhöht die Sekretion von Antikörpern¹¹⁶. Ein Anstieg der IL-6 Produktion nach kombinierter TLR-Stimulation wurde für adulte DC kürzlich publiziert¹¹⁷. Das entspricht den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, in der ebenfalls die DC mit einer Kombination aus Poly(I:C) und R848 bzw. aus LPS und R848 stimuliert wurden. Somit konnte festgestellt werden, dass hinsichtlich der IL-6 Produktion die neonatalen mDC keinen funktionellen Defekt haben. Im Gegensatz dazu produzierten die neonatalen plasmazytoiden DC deutlich weniger IL-6 als die adulten pDC.

Interleukin-8 konnte bis auf wenige Ausnahmen in allen DC-Kulturen nachgewiesen werden. Dabei zeigten sich weder Unterschiede zwischen adulten und neonatalen DC noch zwischen den DC-Populationen. Im Gegensatz dazu konnten Sadeghi *et al.* (2007) in Vollblutkulturen beobachten, dass die mit LPS stimulierten neonatalen Zellen weniger IL-8 sezernieren als die adulten Zellen¹¹⁵. Der Vorteil der Vollblutkultur – die Zellen bleiben in ihrer natürlichen Mikroumgebung, mit allen Faktoren und Kofaktoren, welche in die angeborene Immunantwort involviert sind – birgt den Nachteil, dass nicht festgestellt werden kann, welche Zellen die Produzenten des jeweiligen Zytokins sind. Ferner könnten die sezernierten inflammatorischen Zytokine von anderen Zellen gebunden werden, so dass sie im

Überstand nicht mehr detektierbar sind. Interleukin-8, auch als CXCL8 bezeichnet, gehört zu der Gruppe der Chemokine und wird von nahezu allen Immunzellen sezerniert. Es wird am Entzündungsort produziert, um Monozyten, Neutrophile und T-Zellen zum Entzündungsherd zu rekrutieren¹¹⁸. Der in der vorliegenden Arbeit erbrachte Nachweis von IL-8 in allen DC-Kulturen spricht für eine funktionierende Chemoattraktivität. Dies ist ein Hinweis darauf, dass diese Komponenten des unspezifischen Immunsystems der Neugeborenen funktionieren.

Die Ergebnisse der vorliegenden Promotionsschrift zeigen, dass mit Ausnahme der pDC, Interleukin-10 verstärkt von neonatalen DC im Vergleich zu adulten DC produziert wurde. Die IL-10 Konzentrationen in den HPC-Kulturen unterschieden sich beträchtlich von denen in den mDC- bzw. pDC-Kulturen. Plasmazytoide DC sekretierten sehr wenig IL-10, in den HPC-Kulturen konnte IL-10 nachgewiesen werden, während mDC wesentlich mehr IL-10 synthetisierten. Boonstra *et al.* (2006) analysierten die IL-10 Produktion in, mit TLR-Liganden stimulierten, murinen mDC und pDC und fanden heraus, dass mDC IL-10 produzierten, pDC hingegen nicht. Übereinstimmend mit Thoma-Uszynski *et al.* (2000) führte die Aktivierung des TLR4 mit LPS zur Produktion von IL-10, während der TLR2 Ligand Zymosan keine IL-10 Sekretion induzieren konnte¹⁰⁷. Die erhöhte Sekretion von IL-10 in neonatalen DC wurde auch von anderen Arbeitsgruppen beobachtet^{37,39,91}. Interleukin-10 ist ein immunregulatorisches Zytokin, welches viele immunologische Funktionen u.a. von Monozyten und Makrophagen inhibiert. Dazu gehören die Phagozytose, die Synthese inflammatorischer Zytokine, die Freisetzung von Sauerstoffradikalen (*oxidative burst*) und die Stickoxid Produktion^{119,120}. Es wurde festgestellt, dass IL-10 die Differenzierung von Monozyten in Richtung dendritische Zellen verhindert und die DC Reifung stark inhibiert^{121,122}. Frühere Studien haben gezeigt, dass IL-10 die LPS-stimulierte Produktion inflammatorischer Zytokine von humanen Monozyten und PBMC durch Blockieren der Gen-Transkription inhibiert¹²³. Aste-Amezaga *et al.* (1998) identifizierten IL-10 als Suppressor von IL-12p40 und p35¹⁹. Somit unterdrückt IL-10 eine Th1-gerichtete Immunantwort. Die beeinträchtigte IL-12 Produktion von Neugeborenen (s.u.) könnte folglich der erhöhten IL-10 Sekretion zugeschrieben werden⁹¹. Allerdings kann IL-10 nicht die alleinige Ursache für die mangelnde IL-12 Produktion neonataler DC sein, da die erhöhte IL-10 Synthese schnell nach der Geburt verschwindet, derweil die beeinträchtigte IL-12 Produktion bis etwa zum zwölften Lebensjahr anhält³⁹. Während reife DC keine Sensitivität für IL-10 besitzen^{121,124}, hat IL-10 einen sehr großen Einfluss auf unreife DC¹²⁵. Die erhöhte IL-10 Sekretion der neonatalen DC könnte somit in autokriner Wirkung die Reifung der DC inhibieren und für die limitierte Th1-Immunantwort im Neugeborenen mit verantwortlich sein. Interleukin-10 wird vor allem von den DC produziert, welche *in vitro* aus Monozyten generiert wurden und jenen DC entsprechen, welche *in vivo* vor allem an chronischen Entzündungsstellen akkumulieren¹²⁶. Möglicherweise sind gerade letztere DC damit ausgestattet, übertriebene oder falsche Immunreaktionen mit Hilfe ihrer starken IL-10 Sekretion zu verhindern. Im Gegensatz dazu gibt es DC, welche *in vivo* in den Geweben patrouillieren und kein IL-10 produzieren, um potente Signale zur Induktion einer Immunantwort zu senden. Ferner gibt es Hinweise, dass

Interleukin-10 auch an der maternalen Toleranz dem Fetus gegenüber beteiligt ist, um Frühgeburten zu verhindern. Sowohl das uterine Epithel als auch der Trophoblast sekretieren u.a. TGF- β , IL-4 und IL-10, ein Zytokinmuster, welches Th1-Immunantworten unterdrückt¹²⁷. So wurden bei humanen Frühgeburten im maternalen Blut entgegen den Müttern mit termgeborenen Kindern erhöhte Konzentrationen an IFN γ und IL-2 und reduzierte Konzentrationen an IL-10 und IL-4 nachgewiesen¹²⁸. Überdies zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der synergistischen Wirkung kombinierter TLR Agonisten, dass IL-10 bevorzugt nach multipler Pathogenbindung produziert wird. Das könnte der Immunreaktion dendritischer Zellen *in vivo* entsprechen, denn IL-10 wird dann sekretiert, wenn eine überschießende inflammatorische Immunantwort, u.a. bei schweren Infektionen, droht^{55,120,122,129}. Daher schützt sich die Mutter mit der IL-10 Produktion durch Epithel- und T-Zellen ihrerseits vor Abstoßungsreaktionen. Das Kind schützt sich seinerseits durch Unterdrückung der Th1-Immunantworten vor Überreaktionen gegen Selbstantigen und/oder maternale Strukturen. Darüber hinaus hat Interleukin-10 regulatorische Funktionen bezüglich der TNF α Produktion. Mit Hilfe IL-10-neutralisierender Antikörper konnte die Synthese von TNF α in adulten mit LPS stimulierten mDC erheblich gesteigert werden¹²⁵. Trotz deutlich erhöhter IL-10 Produktion neonataler mDC konnte in der vorliegenden Arbeit mit Ausnahme der Flagellin-stimulierten DC kein wesentlicher Unterschied in der TNF α Produktion zwischen adulten und neonatalen mDC beobachtet werden. Diese Ergebnisse stimmen mit Untersuchungen von Langrish *et al.* (2002) überein, welche vergleichbare TNF α Konzentrationen mit ähnlichen Kinetiken in LPS-stimulierten adulten und neonatalen mDC nachweisen konnten⁷⁴. Demgegenüber hatten Burchett *et al.* (1988) beschrieben, dass neonatale LPS-stimulierte Monozyten weniger TNF α produzieren als adulte Monozyten¹³⁰.

Interleukin-12 ist ein heterodimeres Glykoprotein, bestehend aus zwei Untereinheiten: p40, welches die Funktion der Bindung an den IL-12 Rezeptor übernimmt und p35, das für die Signaltransduktion verantwortlich ist¹⁷. Die Untereinheiten werden von zwei auf verschiedenen Chromosomen liegenden Genen kodiert¹³¹ und müssen zusammen als IL-12p70 Heterodimer exprimiert werden, um die volle biologische Wirkung zu erzielen¹³¹. Interleukin-12 wird von Antigen-präsentierenden Zellen produziert und beeinflusst immunregulatorische Effekte von T- und NK-Zellen²¹. Dabei induziert es in T-Zellen die Produktion von IFN γ und folglich eine Th1-gerichtete Immunantwort⁵⁵. Es wurde publiziert, dass neonatale und adulte PBMC als Antwort auf mikrobielle Stimuli ähnliche Mengen an IL-12p40 synthetisieren¹³². Hingegen gelten neonatale DC bezüglich der Sekretion des bioaktiven IL-12p70 generell als defekt^{37,38,133}. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstreichen diese Hypothese nur teilweise. Es konnte gezeigt werden, dass neonatale mDC, auf einige mikrobielle Stimuli mit der ähnlichen IL-12p40 Produktion reagierten wie adulte mDC. Die Aktivierung der mDC über die TLR2, TLR5 und TLR8 induzierte indessen in adulten mDC eine deutlich stärkere IL-12p40 Produktion als in neonatalen mDC. Die DC, welche aus HPC generiert wurden, zeigten ein anderes IL-12p40 Expressionsmuster. Die

Stimulation der TLR2, TLR4 und TLR8 führte zur Produktion von IL-12p40, welche durch eine kombinierte Stimulation der TLR deutlich gesteigert werden konnte. Ein überaus deutliches Ergebnis erbrachte der Nachweis der Synthese des bioaktiven IL-12p70 sowohl in HPC-DC als auch in mDC. Vor allem die Kombination aus LPS und IFN γ induzierte in HPC-DC die Produktion von IL-12p70. Neonatale dendritische Zellen, welche aus Monozyten generiert wurden, konnten ebenfalls nur durch kombinierte Stimulation mehrerer TLR zur IL-12p70 Synthese aktiviert werden. Dabei produzierten neonatale mDC auffallend weniger IL-12p70 als die adulten mDC, welche durch die synergistische Wirkung der TLR Liganden die IL-12p70 Produktion steigerten. In neonatalen pDC konnte, im Gegensatz zu adulten pDC, durch Stimulation des TLR9 kein IL-12p70 induziert werden. Die teilweise geringere Konzentration an IL-12p40 in stimulierten neonatalen DC-Kulturen könnte mit einer sinkenden p40 mRNA Stabilität zusammenzuhängen ¹³⁴. Der Defekt in der IL-12p70 Synthese neonataler DC war jedoch viel deutlicher als der von IL-12p40, was darauf hinweist, dass IL-12p35 ein kritischer Faktor für die Synthese des bioaktiven IL-12 in neonatalen DC darstellt. Goriely *et al.* (2003) identifizierten in der IL-12p35 Promoter Region ein modulierbares Nukleosom (nuc-2), welches durch Chromatinstrukturierung im p35 Locus nach Stimulation adulter DC mit LPS und IFN γ die IL-12p35 mRNA Synthese induziert ¹³⁵. Im Jahr 2004 konnten Goriely *et al.* den Nachweis erbringen, dass die Modulierbarkeit von nuc-2 und somit die IL-12p35 Gentranskription in stimulierten neonatalen DC deutlich beeinträchtigt, aber durch Zugabe von IFN γ beeinflussbar ist ³⁸. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit könnten darauf hinweisen, dass durch synergistische Wirkungen zwischen LPS und IFN γ bzw. LPS und R848/ssRNA das nuc-2 Nukleosom in neonatalen DC ebenfalls modulierbar ist. Doch das ist eine reine Hypothese. Es ist jedoch nicht nur das nuc-2 an der p35 mRNA Synthese beteiligt. Im Mausmodell konnte nachgewiesen werden, dass der Interferon-Regulations-Faktor 3 (IRF3) an kritische Elemente in der p35 Promoter Region bindet und ebenfalls für die Induktion der IL-12p70 Synthese in DC verantwortlich ist ¹³⁶. Jedoch fehlen dazu Versuche zu humanen DC, denn bereits in der Umstrukturierung des Chromatins im p35 Promoter konnten Unterschiede zwischen murinen und humanen Zellen festgestellt werden ^{135,137}. Darüber hinaus bestehen weitere Unterschiede zwischen dem Mausmodell und humanen Zellen. Bezüglich der TLR Expression und der TLR Bindungseigenschaften konnte festgestellt werden, dass der murine TLR7 dem humanen TLR8 entspricht. Einzelstrang RNA bindet speziesspezifisch an TLR7 in Mäusen und an TLR8 in humanen Zellen ⁹⁴. Ferner konnte in murinen Zellen die Existenz des TLR11 beschrieben werden, welcher uropathogene *E.coli* erkennt und bindet ¹³⁸. In humanen Zellen gibt es bislang kein Pendant dazu ¹³⁹. Folglich wurde die vorliegende Arbeit mit humanen Zellen durchgeführt, um eine möglichst lebensnahe Situation analysieren zu können.

Interferon α wird von Monozyten, Makrophagen aber vor allem in großen Mengen von plasmazytoiden DC als Antwort auf virale Angriffe, wie HSV oder CpG beinhaltende DNA produziert ⁶⁷. Dabei zeigt IFN α antivirale, antiparasitische aber auch antiproliferative

Eigenschaften¹⁴⁰. Die pDC exprimieren den TLR9, welcher für die Erkennung von CpG (*unmethylated cytosine-phosphate-guanosine*) Motiven in bakterieller DNA oder Oligonukleotiden (ODN) verantwortlich ist⁶⁷. Während der Durchführung der vorliegenden Arbeit waren zwei verschiedene CpG Klassen verfügbar. Für adulte pDC konnte nachgewiesen werden, dass CpG A ODN die Produktion erheblicher Mengen von IFN α auslösen, wobei CpG B ODN durch Hochregulierung von Reifungs- und Kostimulationsmolekülen die effiziente pDC Reifung induzieren^{141,142}. Zur Produktion von IFN α in neonatalen pDC gibt es unterschiedliche Beobachtungen. Während De Wit *et al.* (2004) in mit CpG A stimulierten neonatalen Vollblutkulturen deutlich niedrigere Konzentrationen an IFN α nachwies, konnten Gold *et al.* (2006) in stimulierten Vollblutkulturen keine Unterschiede zwischen neonataler und adulter IFN α Produktion feststellen^{75,92}. Darüber hinaus isolierten Gold *et al.* plasmazytoide DC und stimulierten diese mit IL-3 und CpG A. Obwohl in den adulten und neonatalen Vollblutkulturen identische IFN α Konzentrationen gemessen wurden, beobachteten sie, dass isolierte neonatale pDC weniger IFN α synthetisierten als adulte pDC. Diese Ergebnisse stimmen mit denen der vorliegenden Arbeit überein. Allerdings sind die Unterschiede sowohl bei Gold als auch in der vorliegenden Arbeit so gering, dass es vorstellbar ist, dass diese Differenz nicht als biologisch relevante Schwäche neonataler pDC verglichen mit adulten pDC zu verstehen ist. Schließlich darf auch nicht vergessen werden, dass die Bestimmung von Zytokinen aus den Zellkulturüberständen zu Werten führt, die sich aus der Differenz: Produktion minus autokriner Eigenverbrauch ergibt. Gold *et al.* (2006) zeigten, dass die Kombination aus IL-3 und CpG die Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle in neonatalen pDC auf adult-ähnliche Level induziert. Allerdings weisen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit bezüglich der Produktion inflammatorischer Zytokine seitens der pDC darauf hin, dass die neonatalen pDC sich von den adulten pDC unterscheiden, da mit Ausnahme von IL-8 alle analysierten Zytokine (IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12p70 und TNF α) in deutlich geringeren Mengen von neonatalen pDC im Vergleich zu adulten pDC synthetisiert wurden. Somit kann gefolgert werden, dass neben der beeinträchtigten IL-12p70 Produktion der mDC, der verminderten Expression kostimulatorischer Moleküle auf HPC-DC und mDC auch die schwächere inflammatorische Reaktion der pDC zur Unreife des Immunsystems bei Neugeborenen beiträgt.

Ein wichtiges Ziel der vorliegenden Arbeit lag darin, die Beeinflussung der neonatalen Immunantwort hinsichtlich der Th1-polarisierenden Kapazität zu untersuchen. Es scheint unumstritten, dass Neugeborene vor allem Th2-gerichtete Immunantworten generieren^{72,143,144}. Bezüglich der neonatalen T-Zellen konnte gezeigt werden, dass sie, nach entsprechender Stimulation, zu Th-1 T-Zellen differenzieren können und IFN γ produzieren^{3,4,145}. Folglich wurden in der vorliegenden Promotionsschrift neonatale mDC mit mikrobiellen Produkten stimuliert und die Kulturüberstände inklusive der sezernierten

Zytokine mit autologen naiven T-Zellen kultiviert. Da Pathogene ebenfalls aus mehreren TLR Agonisten bestehen⁴⁸, wurden einige TLR Liganden kombiniert. Übereinstimmend mit Ergebnissen aus Versuchen mit adulten DC⁹³, induzierten die kombinierten TLR Liganden die Produktion von IL-12p70 in adulten und neonatalen mDC. Während die adulten T-Zellen nach Kultivierung mit allen DC-Kulturüberständen IFN γ produzierten, konnten ausschließlich in den neonatalen T-Zellkulturen IFN γ nachgewiesen werden, welche mit LPS/ssRNA-stimulierten DC-Überständen inkubierten. Möglicherweise benötigen neonatale DC die Stimulation in unterschiedlichen Zellkompartimenten, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde: einerseits die Stimulation an der Zelloberfläche durch den TLR4 und andererseits im endosomalen Kompartiment durch den TLR8, um kraftvolle Effektorfunktionen induzieren zu können. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass neonatale Zellen eine erhöhte Aktivierungsschwelle besitzen. Dennoch entspricht die synergistische TLR Stimulation eher einer lebensnahen Situation. Denkbar wäre, dass der Pathogenkontakt an der Zelloberfläche ein zeitliches Fenster öffnet, andere TLR stimulieren zu können. Athie-Morales *et al.* (2004) zeigten, dass eine dauerhafte IL-12 Konzentration für die Induktion von Th-1 Immunantworten nötig ist²³. Die Integration multipler Stimuli könnte so die effektiven polarisierenden Signale der DC erst möglich machen.

Ein definiertes Zeitfenster für die extra- und intrazelluläre Stimulation der dendritischen Zellen durch unterschiedliche PAMP ist möglicherweise auch für die Produktion anderer IL-12-verwandter Zytokine durch die DC verantwortlich. Interleukin-27, ein Mitglied der IL-6/IL-12 Familie, besteht aus dem IL-12p40-nahen *Epstein-Barr Virus induced gene 3* (EBI3) und dem IL-12p35-verwandten p28 Protein und spielt eine wichtige Rolle in der frühen Th-1 Immunregulierung^{146,147}. Als ein Produkt aktivierter DC induziert IL-27 eine schnelle klonale Expansion naiver T-Zellen, wobei es die Expression des Th2 Differenzierungs-Transkriptionsfaktor GATA-3 unterdrückt²⁹. Mit dem Ziel, neonatale Th-1 Immunantworten zu charakterisieren, wurden in der vorliegenden Arbeit die Produktion der EBI3 und p28 mRNA als Reaktion auf die Stimulation neonataler DC mit TLR Liganden analysiert und mit der IL-27 Produktion adulter DC verglichen. Die Ergebnisse zeigen, dass nur die kombinierte Stimulation der DC mit LPS und ssRNA respektive IFN γ die Produktion der beiden IL-27 Untereinheiten induzieren konnte. Besonders auffällig ist die signifikant erhöhte IL-27 mRNA Produktion in neonatalen Zellen. Bis *dato* existieren keine Berichte zur IL-27 Sekretion in neonatalen DC. Für adulte DC wurde beschrieben, dass IL-27 divergierende Funktionen hat, einerseits fördert es Th1 Immunantworten^{25,147}, andererseits inhibiert es inflammatorische Prozesse^{31,33}. Dabei wurde postuliert, dass IL-27 die Rolle von IL-12 übernimmt, bis genügend IL-12 produziert wird und somit eine Th1-gerichtete Immunantwort garantiert ist¹⁴⁷. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die neonatalen DC mit der Expression der IL-27 mRNA zumindest gerüstet sind, Th1-Immunantworten zu generieren um das Fehlen von IL-12 eventuell teilweise zu kompensieren. Ein funktionierender IL-23/IL-17 Weg zur Kompensierung des suboptimalen IL-12/IFN γ Pfades ist bereits für neonatale DC

vorgeschlagen worden⁴⁰. Interleukin-23, ein weiteres IL-12 verwandtes Zytokin, welches von DC als Antwort auf mikrobielle Stimuli sezerniert wird, teilt sich mit IL-12 die p40 Untereinheit und bildet mit p19 einen Heterodimer^{21,24,148}. Ferner reguliert IL-23 die IFN γ Produktion in aktivierten neonatalen CD4- und CD8-positiven T-Zellen¹⁴⁹. Vanden Eijnden *et al.* (2006) verglichen die Transkription von IL-23p19 mRNA in TLR-stimulierten adulten und neonatalen DC⁴⁰. Dabei produzierten neonatale und adulte DC vergleichbare Mengen von IL-23 als Reaktion auf TLR2 und TLR3 Liganden. Nach Stimulation der DC mit TLR4 und TLR8 Liganden konnte in neonatalen DC im Vergleich zu adulten DC eine erhöhte IL-23 mRNA Konzentration nachgewiesen werden. Dies entspricht der TLR-Liganden Kombination, wie sie auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde und welche die höchsten IL-27 mRNA Konzentrationen induzierte. Die Bioaktivität der von Vanden Eijnden gemessenen IL-23 mRNA wurde detektiert, indem die Überstände der stimulierten DC mit neonatalen CD8-positiven Zellen inkubiert und eine erhöhte IL-17 Sekretion detektiert wurde. Neben IL-10 könnte die gesteigerte Produktion von IL-27 die Funktion der Regulierung von Immunantworten durch Unterdrückung der Synthese proinflammatorischer Zytokine übernehmen. Die immunsupprimierende Wirkung von IL-27 konnte jedoch bislang nur in murinen Zellen nachgewiesen werden und der Wirkungsmechanismus ist noch unbekannt^{150,151}. Ein inhibierender Effekt von IL-27 auf Th17 Zellen wurde durch Experimente mit chronisch infizierten Mäusen demonstriert, bei denen IL-27 die Produktion von IL-17 inhibierte³⁴. Die Th17 Lymphozyten sind inflammatorische Mediatoren, welche an verschiedenen Autoimmunkrankheiten beteiligt sind¹⁵². Überdies spielt im murinen Modell Interleukin-2 in der Beziehung zwischen IL-27 und der Proliferation von T-Zellen möglicherweise eine Rolle. Das T-Zellwachstum wird nur dann induziert, wenn kein IL-2 in der Umgebung vorhanden ist, und es wurde beobachtet, dass große Mengen IL-2 die Expression des IL-27 Rezeptors WSX-1 auf T-Zellen unterdrücken^{153,154}. Des Weiteren hat IL-27 einen großen supprimierenden Einfluss auf die IL-2 Produktion der murinen T-Zellen¹⁵⁵. Unumstritten ist die weitreichende Doppel-Wirkung von IL-27^{31,33,34,156}. Möglicherweise werden die divergierenden Eigenschaften von IL-27 dadurch beeinflusst, dass die Untereinheiten von IL-27 p28 und EBI3 nicht zwingenderweise auf der gleichen Zelle zur gleichen Zeit exprimiert werden müssen. Schnurr *et al.* (2005) beschrieben, dass die Bindung über die TLR hauptsächlich für die IL-27 Produktion verantwortlich ist. Die Expression der IL-27 Untereinheiten p28 und EBI3 folgt dabei aber unterschiedlichen Kinetiken: Die p28 mRNA ist 6-12 h nach Stimulation bereits nachweisbar, während die Expression der mRNA von EBI3 erst nach 18-24 h ansteigt²⁷. Diese Beobachtungen lassen spekulieren, dass, bislang unidentifizierte IL-27 Untereinheiten, oder Varianten von p28 und EBI3, existieren, die das breite Einsatzfeld von IL-27 erklären.

Im Gegensatz zu o.g. Ergebnissen mit murinen Zellen konnte in der vorliegenden Schrift in allen humanen T-Zellkulturen die Expression von WSX-1 mRNA und die gleichzeitige Produktion von IL-2 nachgewiesen werden. Doch auch schon Stumhofer *et al.* (2006)

bezweifelten, dass eine reduzierte IL-2 Konzentration die antiinflammatorische Fähigkeit von IL-27 beeinflussen kann, wie es postuliert wurde³⁴. Überraschenderweise exprimierten die neonatalen DC und T-Zellen in der vorliegenden Arbeit signifikant mehr WSX-1 mRNA als die adulten DC und T-Zellen. Obwohl die Produktion von IL-27 nur in Endothelzellen, DC und Monozyten beschrieben wird, ist die Expression von WSX-1 auf einer Vielzahl Immunzellen detektiert worden¹⁵⁶. Bislang ist IL-27 der einzig bekannte Ligand für WSX-1. Denkbar wäre jedoch, dass die Effekte, die durch die Bindung an WSX-1 ausgelöst werden, auch durch die Interaktion mit anderen pro- oder antiinflammatorischen Zytokinen hervorgerufen werden. Ein Hinweis dafür liefert gp130, die zweite IL-27 Rezeptoruntereinheit, welche von vielen anderen Zytokinen, wie IL-6 und IL-11, ebenfalls als Rezeptor genutzt wird²⁶. Die gp130 Kette wird von vielen Zellen exprimiert, so dass die Analyse der gp130 Expression nicht notwendigerweise informativ über die IL-27 Bindung und deren Effekte ist. Aus diesem Grund wird die Sensitivität für IL-27 in der Regel – und so auch in der vorliegenden Arbeit – an der Expression von WSX-1 bemessen. Somit könnte die verstärkte Expression der WSX-1 mRNA in neonatalen DC deren Sensitivität für IL-27 repräsentieren und das sowohl für die pro- als auch für die antiinflammatorischen Fähigkeiten des Interleukins. In Monozyten wurde z.B. beobachtet, dass IL-27 die Produktion inflammatorischer Zytokine autokrin stimulieren kann²⁶.

Ebenso auffällig war die Tatsache, dass auch die neonatalen T-Zellen signifikant mehr WSX-1 mRNA exprimierten als die adulten T-Zellen. Somit konnte widerlegt werden, dass die reduzierte IFN γ Produktion neonataler T-Zellen ein Resultat defizienter WSX-1 Expression auf T-Zellen ist, wie es von Yoshimura *et al.* (2006) für Mäuse publiziert wurde³¹. Andererseits ist es möglich, dass mit der erhöhten WSX-1 Expression die neonatalen T-Zellen für die inhibitorischen Effekte von IL-27 anfälliger sind, was wiederum zu einer defizienten Th1 Differenzierung führen würde. Denn obwohl IL-27 Th1 Immunantworten induziert, scheint zumindest im Mausmodell die immunsupprimierende Aufgabe zu überwiegen¹⁵⁷. Mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit konnte gleichwohl gezeigt werden, dass neonatale DC die Fähigkeit besitzen, IL-27 zu synthetisieren und dass neonatale DC und T-Zellen mit der Expression von WSX-1 die Fähigkeit besitzen, auf IL-27 zu reagieren.

Bei dem Nachweis der Expression von IL-27 war erneut der Einfluss von IFN γ besonders auffällig. Diese Ergebnisse stimmen mit Publikationen überein, welche darlegen, dass IFN γ in Kombination mit z.B. LPS ein Hauptverstärkersignal für alle IL-12 Familienmitglieder darstellt^{18,24,25,37}. Wie bereits beschrieben, konnte nur die Kombination aus LPS und IFN γ eine effiziente Reifung der DC aus hämatopoetischen Stammzellen induzieren. Einzelmediatoren hatten weder auf den Phänotyp noch auf die funktionellen Fähigkeiten einen stimulatorischen Einfluss. Goriely *et al.* konnten bereits 2001 nachweisen, dass der Signalweg von IFN γ in neonatalen Zellen funktionsfähig ist, da die Zugabe von rekombinantem Interferon γ zu einer Produktion von IL-12p35 führt³⁷. Ein Zusammenhang zwischen IFN γ und IL-27 wurde jedoch erst kürzlich beschrieben¹⁵⁸. Hierin wird postuliert,

dass IL-27 in adulten humanen dendritischen Zellen, welche aus Monozyten generiert wurden, die Produktion von IFN γ induziert, welches wichtig sei für eine optimale IL-12p70 Synthese. Obwohl für adulte mDC der Mechanismus identifiziert wurde, bei dem IL-27 resp. IFN γ autokrin die DC zur IL-12p70 Produktion stimuliert und somit eine Th-1 Immunantwort unterstützt, konnte bei neonatalen DC – trotz scheinbar funktionierender IL-27 und IFN γ Signalwege – keine optimale IL-12p70 Sekretion induziert werden.

Bezüglich der Th1-polarisierenden Fähigkeit neonataler plasmazytoider DC gibt es bislang noch keine publizierten Studien. Versuche mit adulten pDC haben gezeigt, dass je nach Stimulus, die pDC unterschiedliche T-Zell Immunantworten auslösen. Die Stimulierung der adulten pDC mit CpG DNA und CD40L führt zur Polarisation von Th1 Immunantworten⁶⁷. Die Inkubation adulter pDC mit IL-3 hingegen induziert die Differenzierung von Th2 Zellen¹⁵⁹. Nach viralem Kontakt produzieren adulte pDC viel IFN α und lösen in den T-Zellen die Produktion von IFN γ und IL-10 mit regulatorischem T-Zell Phänotyp aus^{160,161}. Somit stellt sich die Frage, inwieweit neonatale pDC Th1 Immunantworten hervorrufen können. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Arbeit adulte und neonatale pDC mit CpG Oligonukleotiden stimuliert und mit autologen naiven T-Zellen kokultiviert. Die Ergebnisse zeigen, dass mit CpG A stimulierte neonatale pDC eine adult-ähnliche IFN γ Produktion in den autologen T-Zellen auslösen können. Die Konzentration von IFN γ in den neonatalen Kulturen, die mit CpG B und/oder CD40L stimuliert wurden, lagen weit unter denen der adulten Zellen. Betrachtet man die geringere Expression von Kostimulatoren und die deutlich beeinträchtigte inflammatorische Immunreaktion neonataler pDC im Vergleich zu adulten pDC (s.o.), so unterstreichen die schwächeren Th1-polarisierenden Fähigkeiten die Unreife neonataler pDC. Um der Produktivität adulter pDC zu entsprechen, benötigen die neonatalen pDC ganz bestimmte Bedingungen, die nicht grundsätzlich vorherrschen.

Zur Untersuchung der Funktionalität der DC bzw. zur Identifizierung von Unterschieden in der adulten und neonatalen DC-T-Zellbindung wurden gemischte Lymphozytenkulturen durchgeführt. Die eingesetzten Stimulatoren waren mit TLR Liganden-aktivierte adulte und neonatale DC. Als Effektorzellen dienten adulte CD4/CD45RA-positive T-Zellen. Bei einem Verhältnis von 1:10 (DC:T-Zelle) konnten keine Unterschiede zwischen adulten und neonatalen Zellen detektiert werden. Diese Beobachtungen bestätigen die Untersuchungen von Trivedi *et al.* (1997), in denen neonatale DC ähnliche T-Zell Proliferationen hervorriefen, wie die adulten DC. Die Proliferation der Zellen war dabei stimulationsunabhängig. Im Gegensatz dazu proliferierten die adulten Zellen wesentlich mehr, wenn ein Verhältnis von 1:100 (DC:T-Zelle) eingesetzt wurde. Dabei konnten Unterschiede zwischen den stimulierten DC festgestellt werden. Während Poly(I:C)- bzw. R848-stimulierte adulte DC keine Proliferation induzierten, führte die Stimulation der DC mit Zymosan, LPS, Flagellin, Cordycepin bzw. der TLR-Kombination zu einem deutlichen Zellwachstum. Hertz *et al.* (2001) beobachteten ebenfalls, dass TLR2-stimulierte adulte DC eine erhöhte T-Zell-

stimulatorische Fähigkeit haben im Vergleich zu unstimulierten DC¹¹⁰. Dass dabei das Verhältnis Stimulator:Effektor einen großen Einfluss hat, konnte von Ohshima *et al.* (1997) belegt werden¹⁶². Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit unterstützen die Hypothese, dass neonatale Zellen eine erhöhte Aktivierungsschwelle besitzen. Wenn quantitativ viele DC die T-Zellen aktivieren können (1:10), dann konnten keine Unterschiede in der Aktivierungsfähigkeit adulter und neonataler DC beobachtet werden. Sinkt die Quantität der DC (1:100) und somit die Quantität der Antigen-präsentierenden Moleküle und Kostimulatoren, so konnte eine beeinträchtigte T-Zellaktivierung detektiert werden.

Die Aktivierung des Immunsystems durch Bindung verschiedener PAMP an die TLR führen zu qualitativ unterschiedlichen Immunantworten. Das bedeutet, dass sowohl Th1 als auch Th2 gerichtete Antworten induziert und verschiedene Signalmechanismen aktiviert werden können¹⁰⁰. Zu den wichtigsten Faktoren, welche für die Differenzierung der Th Immunantworten verantwortlich sind, gehören einerseits der Phosphorylierungsstatus der p38 Mitogen-aktivierten Protein Kinase (MAPK), welcher Th1 Antworten unterstützt und andererseits der Phosphorylierungsstatus der extrazellulären Signal-regulierenden Kinase 1/2 (ERK), welcher zu Th2 Immunantworten führt¹⁰⁰. Darüber hinaus benötigen DC zur effizienten Reifung die Phosphorylierung von STAT1⁵⁹. In der vorliegenden Arbeit wurden die Phosphorylierungszustände von p38 MAPK, ERK 1/2 und STAT1 nach Aktivierung unreifer mDC mit den TLR Liganden Poly(I:C), LPS und ssRNA und deren Kombinationen durchflusszytometrisch bestimmt. Während der Phosphorylierungszustand der p38 MAPK unabhängig vom Stimulus annähernd auf einem niedrigen Niveau bleibt, steigt der Phosphorylierungsgrad der p38 MAPK der neonatalen mDC mit der Stimulationsdauer. Die neonatalen mDC zeigten auch in den unstimulierten Kontrollen, eine mit der Stimulationsdauer ansteigende Phosphorylierung der p38 MAPK. Hinsichtlich der Phosphorylierung der p38 MAPK in neonatalen Monozyten gibt es verschiedene Publikationen, für neonatale DC konnten bis *dato* keine gefunden werden. Levy *et al.* beobachteten 2004 in LPS-stimulierten adulten Monozyten substanziell höhere p38 Phosphorylierungszustände als in neonatalen Monozyten, während in TLR8-stimulierten Monozyten keine Unterschiede zwischen adult und neonatal detektiert wurden¹⁶³. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen allerdings, dass in neonatalen mDC ein wesentlich höheres Phosphorylierungsniveau zu beobachten war. Zudem konnte LPS in den neonatalen mDC einen Anstieg der p38-Phosphorylierung induzieren. Die Divergenz zwischen LPS- und Poly(I:C)-induzierter Phosphorylierung der p38 MAPK weist darauf hin, dass die Mechanismen für die Unterschiede in der Signalkette der MAPK Phosphorylierung vorgelagert sind. Auch Sadeghi *et al.* (2007) analysierten kürzlich die Phosphorylierung in neonatalen Monozyten, mit dem Ergebnis, dass, unabhängig vom Gestationsalter, sowohl die Aktivierung der p38 MAPK als auch die von ERK 1/2, im Vergleich zu adulten Monozyten wesentlich beeinträchtigt ist¹¹⁵. Bezüglich der Phosphorylierung von ERK 1/2 erweitern die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diese Hypothese auf mDC. Die Stimulation der adulten

mDC mit LPS und ssRNA konnte eine deutliche ERK-Phosphorylierung induzieren, während in den neonatalen mDC nur ein minimaler Anstieg phosphorylierter ERK nachzuweisen war. Xie *et al.* (2005) beobachteten in adulten mDC, dass durch Blockieren der p38 MAPK die Aktivierung von ERK 1/2 verstärkt wird⁵⁷. Möglicherweise hatten die Stimulationsbedingungen in der vorliegenden Arbeit für adulte und neonatale Zellen unterschiedliche Wirkungen, wobei die Phosphorylierung der einen Kinase, die Phosphorylierung der anderen jeweils blockiert.

Die neonatalen mDC zeigten in den ersten 10 min der Stimulationskultur eine beeinträchtigte Phosphorylierung von STAT1 selbst nach Stimulation der Zellen mit PMA. In adulten mDC war die Aktivierung von STAT1 in den ersten 10 min sehr deutlich, stieg jedoch während der weiteren Stimulationsdauer auch in den unstimulierten Zellen stark an. Die Aktivierung von STAT1 ist für die Hochregulierung von Kostimulatoren notwendig⁵⁹. Es wurde publiziert, dass alle TLR Liganden, die in adulten mDC zu einer IL-12p70 Produktion führen, die Phosphorylierung von STAT1 induzieren und es konnte festgestellt werden, dass TLR Liganden, welche keine Aktivierung von STAT1 auslösen (Poly(I:C), auch keine IL-12p70 Produktion induzieren¹⁶⁴. Somit liegt der Schluss nahe, dass zwischen der beeinträchtigten IL-12p70 Synthese nach TLR Aktivierung in neonatalen mDC und der mangelnden Phosphorylierung von STAT1 ein kausaler Zusammenhang besteht. Diese Hypothese unterstützend, beschreiben Maródi *et al.* (2001), dass neonatale Monozyten und Makrophagen verglichen mit adulten Zellen aufgrund der beeinträchtigten STAT1 Phosphorylierung nicht ausreichend aktivierbar sind, um Mikroorganismen töten zu können¹⁶⁵. Darüber hinaus gibt es Hinweise, dass neben STAT1 auch ERK 1/2 bei der Regulierung der IL-12 Produktion von DC involviert ist⁵⁵. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass in neonatalen DC sowohl die Phosphorylierung von STAT1 als auch von ERK 1/2 im Vergleich zu den adulten DC beeinträchtigt war. Das könnte folglich die niedrige neonatale IL-12p70 Produktion nach TLR Stimulation erklären.

Zusammenfassend unterstützen die Ergebnisse der Untersuchungen zu funktionellen Eigenschaften neonataler DC die Ergebnisse der phänotypischen Charakterisierung dieser Zellen. In allen Fällen konnte eine kombinierte Stimulation unterschiedlicher TLR eine Reifung neonataler DC induzieren. Die gleichzeitige und synergistische Aktivierung verschiedener Signalwege ist möglicherweise die Indikation für ernste Infektionen und wird benötigt, um die angeborene und erworbene Immunantwort vollständig auszulösen. Die Gegenwart einzelner TLR-Liganden resultiert gegebenenfalls nur in einer limitierten und kurzlebigen inflammatorischen Antwort. Auffällig bleibt, dass die induzierte neonatale Immunreaktion die Effizienz der adulten Antwort nicht erreicht.

Ausblick

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass die Antigenpräsentation in neonatalen DC sowohl durch die Unreife des Phänotyps der dendritischen Zellen und dementsprechend auch durch deren Funktion beeinträchtigt ist. Die Eigenschaften der DC beeinflussen die Polarisation der naiven T-Zellen und somit die Quantität und Qualität der neonatalen Immunantworten. Die gehemmten Fähigkeiten der DC verhindern Erfolge in der neonatalen Vakzinierung¹⁶³. Adjuvantien, die auf TLR-Bindung basieren, sind wichtige Mittel, APC zu aktivieren, um suffiziente adaptive Immunantworten zu generieren. Dementsprechend wurden bereits TLR Liganden wie Malp2 als Adjuvantien eingesetzt^{45,166}. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass die ineffiziente Immunisierung Neugeborener teilweise mit der beeinträchtigten TLR-basierten Antigenantwort zusammenhängt, da einzelne TLR Liganden keine optimale DC Reifung induzieren. Nichtsdestotrotz zeigen die Ergebnisse auch, dass unter gewissen Umständen die neonatalen DC in der Lage sind, zu reifen und T-Zellen zu polarisieren. So könnten, wie in der vorliegenden Arbeit, kombinierte TLR Liganden als Adjuvantien eingesetzt werden. Doch nicht nur TLR Liganden eignen sich als Adjuvantien oder Mediatoren, welche die Immunantworten generieren können. Der Nachweis des großen Einflusses von Interferon γ auf die neonatale Immunantwort macht deutlich, wie wichtig es ist, dieses Zytokin hinsichtlich seines Einflusses auf das neonatale Immunsystem weiter zu untersuchen. Darüber hinaus haben auch die Zytokine der IL-12 Familie sehr breite pro- und antiinflammatorische Eigenschaften. Es konnte in der vorliegenden Arbeit erstmalig nachgewiesen werden, dass neonatale DC IL-27 produzieren und mit der Expression der IL-27 Rezeptor mRNA IL-27 binden können, um Immunantworten zu beeinflussen. Im Mausmodell bestehen Hinweise darauf, dass die divergierenden Funktionen von IL-27 zeitabhängig sind¹⁴⁷. Bislang gibt es allerdings fast ausschließlich Studien zu murinen IL-27, so dass die Kenntnisse über dessen Einbindung in die humanen Krankheitsverläufe und/oder in die Entwicklung des kindlichen Immunsystems sehr beschränkt und weitere Untersuchungen dringend notwendig sind. Die vorliegende Arbeit konnte dafür eine wichtige Grundlage schaffen.

5. Zusammenfassung

Die Anfälligkeit für Infektionserkrankungen im frühen Kindesalter ist die Folge beeinträchtigter Immunantworten. Nach derzeitigem Forschungsstand wird vermutet, dass die neonatalen immunologischen Defizite auf eine entwicklungsbedingte Unreife neonataler dendritischer Zellen (DC) zurückzuführen sind. Das gilt im Besonderen für die beeinträchtigte Expression der bioaktiven, heterodimeren Form von IL-12. Ein kritischer Schritt für die Initiation der IL-12 Produktion von DC ist die Aktivierung von Toll-like Rezeptoren (TLR) durch Pathogen-assoziierte Moleküle (PAMP), wie sie auf bzw. in Bakterien, Viren und Pilzen vorkommen. Da der Großteil der bisherigen Erkenntnisse zur neonatalen Immunität aus dem Mausmodell hervorgegangen ist, wurden in der vorliegenden Arbeit Unterschiede zwischen humanen adulten und neonatalen DC analysiert. Die Zielsetzung bestand darin, die Rolle der dendritischen Zellen in Bezug auf die neonatale Anfälligkeit für Infektionserkrankungen zu ergründen. Dazu wurden erstmalig unreife DC unterschiedlicher Subpopulationen mit verschiedenen PAMP, Mediatoren und deren Kombinationen stimuliert und phänotypisch sowie funktionell charakterisiert.

Für das Immunsystem des Neugeborenen konnte gezeigt werden, dass einzelne PAMP nur schwache Expressionen von Kostimulatoren und Reifungsmarkern auf neonatalen DC auslösen. Auffällig war hingegen der große Einfluss kombinierter Stimulationen. Die Zugabe von LPS und IFN γ führte zu einem Anstieg der Reifungsmarker auf neonatalen DC, die aus hämatopoetischen Stammzellen differenziert wurden (HPC-DC) und zu einer deutlichen Produktion inflammatorischer Zytokine. Interessanterweise bewirkte ausschließlich diese Kombination die Produktion von bioaktivem IL-12 in neonatalen HPC-DC. Dendritische Zellen, die aus Monozyten generiert wurden (mDC), wurden mit mindestens zwei TLR-Liganden simultan stimuliert. Das sollte einer lebensnahen Situation entsprechen, bei der Pathogene mehrere TLR binden und aktivieren können. Dabei reagierten die adulten und neonatalen mDC in deutlich unterschiedlicher Weise: während die Reifung in adulten mDC bereits von einzelnen TLR-Liganden induziert wurde, benötigten neonatale mDC die synergistische Wirkung von mindestens zwei TLR Liganden, um Kostimulatoren und Reifungsmarker zu exprimieren und inflammatorische Zytokine, im Besonderen IL-12, zu produzieren. Die ebenfalls untersuchten adulten und neonatalen plasmazytoiden DC (pDC) zeigten hinsichtlich der Expression von Oberflächenmarkern keine Unterschiede. Nach Stimulation des TLR9 wurden jedoch von adulten pDC deutlich mehr inflammatorische Zytokine sekretiert als von neonatalen pDC.

Die Analyse der Th1-polarisierenden Fähigkeit der DC zeigte, dass adulte T-Zellen IFN γ produzierten, unabhängig davon, wie die autologen DC stimuliert wurden. Im Gegensatz dazu

produzierten ausschließlich die neonatalen T-Zellen, welche mit TLR4/TLR8-stimulierten autologen neonatalen DC-Überständen inkubiert wurden, das Th1 Zytokin IFN γ .

Im starken Kontrast zur beeinträchtigten IL-12 Produktion präsentierten neonatale DC, verglichen mit adulten DC, eine signifikant höhere Expression von IL-27, einem weiteren Mitglied der IL-12 Familie, welches erstmalig in neonatalen Zellen untersucht wurde. Hierbei zeigte sich wiederum die Kombination aus LPS und IFN γ als potenter Stimulator, der die Expression von p28 mRNA und EBI3 mRNA, den zwei IL-27 Untereinheiten, auslöste. Zudem konnte die mRNA des IL-27-Rezeptors WSX-1 in adulten und neonatalen DC sowie in adulten und neonatalen T-Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise exprimierten sowohl die neonatalen DC als auch die neonatalen T-Zellen signifikant mehr WSX-1 als die adulten DC und T-Zellen.

Mit Hilfe der Untersuchung der Phosphorylierungszustände von Signalkinasen konnte festgestellt werden, dass sich die Signalweiterleitung innerhalb der adulten DC von der in neonatalen DC unterschied. Während die adulten DC nach TLR-Stimulation vorrangig ERK 1/2 und STAT1 phosphorylierten, induzierte die Stimulation mit LPS die Phosphorylierung der p38 MAPKinase in neonatalen DC.

Die dargestellten Ergebnisse haben gezeigt, dass Zellen aus Neugeborenen nur zu eingeschränkten TLR-basierten Antigenantworten fähig sind, da einzelne TLR Liganden keine optimale DC-Reifung bewirken. Dies könnte einen wesentlichen Beitrag zur hohen neonatalen Infektanfälligkeit darstellen. Die Resultate weisen zudem darauf hin, dass eine ausreichend starke Stimulation zur Reifung der neonatalen DC und somit zu einer funktionierenden Antigenpräsentation und T-Zellpolarisation führen kann. Somit könnte das Wissen um die große Bedeutung der kombinierten TLR-Stimulation, wie die Daten der vorgelegten Dissertation belegen, helfen, neue Impfstrategien zu entwickeln, um der hohen neonatalen Morbidität und Mortalität entgegenzuwirken.

6. Literatur

6.1. Journalveröffentlichungen

1. Marshall-Clarke I, Reen I, Tasker I, Hassan I. Neonatal immunity: how well has it grown up? *Immunol Today*. 2000;21:35-41.
2. Velilla PA, Rugeles MT, Chougnet CA. Defective antigen-presenting cell function in human neonates. *Clin Immunol*. 2006;121:251-259.
3. Marchant A, Goetghebuer T, Ota MO, et al. Newborns develop a Th1-type immune response to *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin vaccination. *J Immunol*. 1999;163:2249-2255.
4. Vekemans J, Amedei A, Ota MO, et al. Neonatal bacillus Calmette-Guerin vaccination induces adult-like IFN-gamma production by CD4+ T lymphocytes. *Eur J Immunol*. 2001;31:1531-1535.
5. Canto E, Rodriguez-Sanchez JL, Vidal S. Naive CD4+ cells from cord blood can generate competent Th effector cells. *Transplantation*. 2005;80:850-858.
6. Chipeta J, Komada Y, Zhang XL, Azuma E, Yamamoto H, Sakurai M. Neonatal (cord blood) T cells can competently raise type 1 and 2 immune responses upon polyclonal activation. *Cell Immunol*. 2000;205:110-119.
7. Sun CM, Fiette L, Tanguy M, Leclerc C, Lo-Man R. Ontogeny and innate properties of neonatal dendritic cells. *Blood*. 2003;102:585-591.
8. Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*. 1998;392:245-252.
9. Rescigno M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cells at the end of the millennium. *Immunol Cell Biol*. 1999;77:404-410.
10. Wallet MA, Sen P, Tisch R. Immunoregulation of dendritic cells. *Clin Med Res*. 2005;3:166-175.
11. Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986;136:2348-2357.
12. O'Garra A. Cytokines induce the development of functionally heterogeneous T helper cell subsets. *Immunity*. 1998;8:275-283.
13. Chtanova T, Mackay CR. T cell effector subsets: extending the Th1/Th2 paradigm. *Adv Immunol*. 2001;78:233-266.
14. Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity*. 2006;24:677-688.
15. Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB, et al. Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature*. 2006;441:231-234.
16. Batten M, Li J, Yi S, et al. Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells. *Nat Immunol*. 2006;7:929-936.
17. Trinchieri G. Interleukin-12: a cytokine produced by antigen-presenting cells with immunoregulatory functions in the generation of T-helper cells type 1 and cytotoxic lymphocytes. *Blood*. 1994;84:4008-4027.
18. Snijders A, Kalinski P, Hilkens CM, Kapsenberg ML. High-level IL-12 production by human dendritic cells requires two signals. *Int Immunol*. 1998;10:1593-1598.

19. Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G. Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol.* 1998;160:5936-5944.
20. Raupach B, Kaufmann SH. Immune responses to intracellular bacteria. *Curr Opin Immunol.* 2001;13:417-428.
21. Trinchieri G. Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol.* 2003;3:133-146.
22. Wu CY, Gadina M, Wang K, O'Shea J, Seder RA. Cytokine regulation of IL-12 receptor beta2 expression: differential effects on human T and NK cells. *Eur J Immunol.* 2000;30:1364-1374.
23. Athie-Morales V, Smits HH, Cantrell DA, Hilkens CM. Sustained IL-12 signaling is required for Th1 development. *J Immunol.* 2004;172:61-69.
24. Oppmann B, Lesley R, Blom B, et al. Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity.* 2000;13:715-725.
25. Pflanz S, Timans JC, Cheung J, et al. IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity.* 2002;16:779-790.
26. Pflanz S, Hibbert L, Mattson J, et al. WSX-1 and glycoprotein 130 constitute a signal-transducing receptor for IL-27. *J Immunol.* 2004;172:2225-2231.
27. Schnurr M, Toy T, Shin A, Wagner M, Cebon J, Maraskovsky E. Extracellular nucleotide signaling by P2 receptors inhibits IL-12 and enhances IL-23 expression in human dendritic cells: a novel role for the cAMP pathway. *Blood.* 2005;105:1582-1589.
28. Chen Q, Ghilardi N, Wang H, et al. Development of Th1-type immune responses requires the type I cytokine receptor TCCR. *Nature.* 2000;407:916-920.
29. Lucas S, Ghilardi N, Li J, de Sauvage FJ. IL-27 regulates IL-12 responsiveness of naive CD4+ T cells through Stat1-dependent and -independent mechanisms. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003;100:15047-15052.
30. Takeda A, Hamano S, Yamanaka A, et al. Cutting edge: role of IL-27/WSX-1 signaling for induction of T-bet through activation of STAT1 during initial Th1 commitment. *J Immunol.* 2003;170:4886-4890.
31. Yoshimura T, Takeda A, Hamano S, et al. Two-Sided Roles of IL-27: Induction of Th1 Differentiation on Naive CD4+ T Cells versus Suppression of Proinflammatory Cytokine Production Including IL-23-Induced IL-17 on Activated CD4+ T Cells Partially Through STAT3-Dependent Mechanism. *J Immunol.* 2006;177:5377-5385.
32. Villarino AV, Larkin J, 3rd, Saris CJ, et al. Positive and negative regulation of the IL-27 receptor during lymphoid cell activation. *J Immunol.* 2005;174:7684-7691.
33. Owaki T, Asakawa M, Kamiya S, et al. IL-27 Suppresses CD28-Mediated IL-2 Production through Suppressor of Cytokine Signaling 3. *J Immunol.* 2006;176:2773-2780.
34. Stumhofer JS, Laurence A, Wilson EH, et al. Interleukin 27 negatively regulates the development of interleukin 17-producing T helper cells during chronic inflammation of the central nervous system. *Nat Immunol.* 2006;7:937-945.
35. Yoshimoto T, Okada K, Morishima N, et al. Induction of IgG2a class switching in B cells by IL-27. *J Immunol.* 2004;173:2479-2485.
36. Holscher C. The power of combinatorial immunology: IL-12 and IL-12-related dimeric cytokines in infectious diseases. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 2004;193:1-17.
37. Goriely S, Vincart B, Stordeur P, et al. Deficient IL-12(p35) gene expression by dendritic cells derived from neonatal monocytes. *J Immunol.* 2001;166:2141-2146.

38. Goriely S, Van Lint C, Dadkhah R, et al. A Defect in Nucleosome Remodeling Prevents IL-12(p35) Gene Transcription in Neonatal Dendritic Cells. *J Exp Med.* 2004;199:1011-1016.
39. Upham JW, Lee PT, Holt BJ, et al. Development of interleukin-12-producing capacity throughout childhood. *Infect Immun.* 2002;70:6583-6588.
40. Vanden Eijnden S, Goriely S, De Wit D, Goldman M, Willems F. Preferential production of the IL-12(p40)/IL-23(p19) heterodimer by dendritic cells from human newborns. *Eur J Immunol.* 2006;36:21-26.
41. Iwasaki A, Medzhitov R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. *Nat Immunol.* 2004;5:987-995.
42. Hallman M, Ramet M, Ezekowitz RA. Toll-like receptors as sensors of pathogens. *Pediatr Res.* 2001;50:315-321.
43. Kokkinopoulos I, Jordan WJ, Ritter MA. Toll-like receptor mRNA expression patterns in human dendritic cells and monocytes. *Mol Immunol.* 2005;42:957-968.
44. Visintin A, Mazzoni A, Spitzer JH, Wyllie DH, Dower SK, Segal DM. Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells. *J Immunol.* 2001;166:249-255.
45. Sieling PA, Chung W, Duong BT, Godowski PJ, Modlin RL. Toll-like receptor 2 ligands as adjuvants for human Th1 responses. *J Immunol.* 2003;170:194-200.
46. Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat Immunol.* 2001;2:675-680.
47. Schjetne KW, Thompson KM, Nilsen N, et al. Cutting edge: link between innate and adaptive immunity: Toll-like receptor 2 internalizes antigen for presentation to CD4+ T cells and could be an efficient vaccine target. *J Immunol.* 2003;171:32-36.
48. Trinchieri G, Sher A. Cooperation of Toll-like receptor signals in innate immune defence. *Nat Rev Immunol.* 2007;7:179-190.
49. Akira S, Hoshino K, Kaisho T. The role of Toll-like receptors and MyD88 in innate immune responses. *J Endotoxin Res.* 2000;6:383-387.
50. Kaisho T, Akira S. Toll-like receptors and their signaling mechanism in innate immunity. *Acta Odontol Scand.* 2001;59:124-130.
51. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Essential role for TIRAP in activation of the signalling cascade shared by TLR2 and TLR4. *Nature.* 2002;420:324-329.
52. Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway. *Science.* 2003;301:640-643.
53. Suzuki N, Suzuki S, Eriksson U, et al. IL-1R-associated kinase 4 is required for lipopolysaccharide-induced activation of APC. *J Immunol.* 2003;171:6065-6071.
54. Takeuchi O, Hoshino K, Kawai T, et al. Differential roles of TLR2 and TLR4 in recognition of gram-negative and gram-positive bacterial cell wall components. *Immunity.* 1999;11:443-451.
55. Xia CQ, Kao KJ. Suppression of interleukin-12 production through endogenously secreted interleukin-10 in activated dendritic cells: involvement of activation of extracellular signal-regulated protein kinase. *Scand J Immunol.* 2003;58:23-32.
56. Rescigno M, Martino M, Sutherland CL, Gold MR, Ricciardi-Castagnoli P. Dendritic cell survival and maturation are regulated by different signaling pathways. *J Exp Med.* 1998;188:2175-2180.
57. Xie J, Qian J, Yang J, Wang S, Freeman ME, 3rd, Yi Q. Critical roles of Raf/MEK/ERK and PI3K/AKT signaling and inactivation of p38 MAP kinase in the differentiation and survival of monocyte-derived immature dendritic cells. *Exp Hematol.* 2005;33:564-572.
58. Ardeschna KM, Pizzey AR, Devereux S, Khwaja A. The PI3 kinase, p38 SAP kinase, and NF-kappaB signal transduction pathways are involved in the survival and

- maturation of lipopolysaccharide-stimulated human monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. 2000;96:1039-1046.
59. Jackson SH, Yu CR, Mahdi RM, Ebong S, Egwuagu CE. Dendritic cell maturation requires STAT1 and is under feedback regulation by suppressors of cytokine signaling. *J Immunol*. 2004;172:2307-2315.
 60. Dalpke AH, Eckerle S, Frey M, Heeg K. Triggering of Toll-like receptors modulates IFN-gamma signaling: involvement of serine 727 STAT1 phosphorylation and suppressors of cytokine signaling. *Eur J Immunol*. 2003;33:1776-1787.
 61. Lore K, Betts MR, Brenchley JM, et al. Toll-like receptor ligands modulate dendritic cells to augment cytomegalovirus- and HIV-1-specific T cell responses. *J Immunol*. 2003;171:4320-4328.
 62. Larsson M, Messmer D, Somersan S, et al. Requirement of mature dendritic cells for efficient activation of influenza A-specific memory CD8+ T cells. *J Immunol*. 2000;165:1182-1190.
 63. Liu E, Tu W, Law HK, Lau YL. Decreased yield, phenotypic expression and function of immature monocyte-derived dendritic cells in cord blood. *Br J Haematol*. 2001;113:240-246.
 64. Relloso M, Puig-Kroger A, Pello OM, et al. DC-SIGN (CD209) expression is IL-4 dependent and is negatively regulated by IFN, TGF-beta, and anti-inflammatory agents. *J Immunol*. 2002;168:2634-2643.
 65. Kadowaki N, Liu YJ. Natural type I interferon-producing cells as a link between innate and adaptive immunity. *Hum Immunol*. 2002;63:1126-1132.
 66. Ito T, Amakawa R, Inaba M, et al. Plasmacytoid dendritic cells regulate Th cell responses through OX40 ligand and type I IFNs. *J Immunol*. 2004;172:4253-4259.
 67. Krug A, Towarowski A, Britsch S, et al. Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells which synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *Eur J Immunol*. 2001;31:3026-3037.
 68. Kadowaki N, Ho S, Antonenko S, et al. Subsets of human dendritic cell precursors express different toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *J Exp Med*. 2001;194:863-869.
 69. Liu YJ. IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. *Annu Rev Immunol*. 2005;23:275-306.
 70. Griffiths-Chu S, Patterson JA, Berger CL, Edelson RL, Chu AC. Characterization of immature T cell subpopulations in neonatal blood. *Blood*. 1984;64:296-300.
 71. Wilson CB, Westall J, Johnston L, Lewis DB, Dower SK, Alpert AR. Decreased production of interferon-gamma by human neonatal cells. Intrinsic and regulatory deficiencies. *J Clin Invest*. 1986;77:860-867.
 72. Barrios C, Brawand P, Berney M, Brandt C, Lambert PH, Siegrist CA. Neonatal and early life immune responses to various forms of vaccine antigens qualitatively differ from adult responses: predominance of a Th2-biased pattern which persists after adult boosting. *Eur J Immunol*. 1996;26:1489-1496.
 73. Trivedi HN, HayGlass KT, Gangur V, Allardice JG, Embree JE, Plummer FA. Analysis of neonatal T cell and antigen presenting cell functions. *Hum Immunol*. 1997;57:69-79.
 74. Langrish CL, Buddle JC, Thrasher AJ, Goldblatt D. Neonatal dendritic cells are intrinsically biased against Th-1 immune responses. *Clin Exp Immunol*. 2002;128:118-123.
 75. De Wit D, Olislagers V, Goriely S, et al. Blood plasmacytoid dendritic cell responses to CpG oligodeoxynucleotides are impaired in human newborns. *Blood*. 2004;103:1030-1032.

76. Chen W, Antonenko S, Sederstrom JM, et al. Thrombopoietin cooperates with FLT3-ligand in the generation of plasmacytoid dendritic cell precursors from human hematopoietic progenitors. *Blood*. 2003.
77. Santiago-Schwarz F, Belilos E, Diamond B, Carsons SE. TNF in combination with GM-CSF enhances the differentiation of neonatal cord blood stem cells into dendritic cells and macrophages. *J Leukoc Biol*. 1992;52:274-281.
78. Arrighi JF, Hauser C, Chapuis B, Zubler RH, Kindler V. Long-term culture of human CD34(+) progenitors with FLT3-ligand, thrombopoietin, and stem cell factor induces extensive amplification of a CD34(-)CD14(-) and a CD34(-)CD14(+) dendritic cell precursor. *Blood*. 1999;93:2244-2252.
79. Dilioglou S, Cruse JM, Lewis RE. Costimulatory function of umbilical cord blood CD14+ and CD34+ derived dendritic cells. *Exp Mol Pathol*. 2003;75:18-33.
80. Ebner S, Ratzinger G, Krosbacher B, et al. Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation, and is further enhanced by IL-4. *J Immunol*. 2001;166:633-641.
81. Morel Y, Truneh A, Sweet RW, Olive D, Costello RT. The TNF superfamily members LIGHT and CD154 (CD40 ligand) costimulate induction of dendritic cell maturation and elicit specific CTL activity. *J Immunol*. 2001;167:2479-2486.
82. MacDonald KP, Munster DJ, Clark GJ, Dzionek A, Schmitz J, Hart DN. Characterization of human blood dendritic cell subsets. *Blood*. 2002;100:4512-4520.
83. Sallusto F, Lanzavecchia A. Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med*. 1994;179:1109-1118.
84. Rongcun Y, Maes H, Corsi M, Dellner F, Wen T, Kiessling R. Interferon gamma impairs the ability of monocyte-derived dendritic cells to present tumour-specific and allo-specific antigens and reduces their expression of CD1A, CD80 AND CD4. *Cytokine*. 1998;10:747-755.
85. Winzler C, Rovere P, Rescigno M, et al. Maturation stages of mouse dendritic cells in growth factor-dependent long-term cultures. *J Exp Med*. 1997;185:317-328.
86. Cambi A, Gijzen K, de Vries JM, et al. The C-type lectin DC-SIGN (CD209) is an antigen-uptake receptor for *Candida albicans* on dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2003;33:532-538.
87. Engering A, Geijtenbeek TB, van Vliet SJ, et al. The dendritic cell-specific adhesion receptor DC-SIGN internalizes antigen for presentation to T cells. *J Immunol*. 2002;168:2118-2126.
88. Baribaud F, Pohlmann S, Doms RW. The role of DC-SIGN and DC-SIGNR in HIV and SIV attachment, infection, and transmission. *Virology*. 2001;286:1-6.
89. Colmenares M, Puig-Kroger A, Pello OM, Corbi AL, Rivas L. Dendritic cell (DC)-specific intercellular adhesion molecule 3 (ICAM-3)-grabbing nonintegrin (DC-SIGN, CD209), a C-type surface lectin in human DCs, is a receptor for *Leishmania amastigotes*. *J Biol Chem*. 2002;277:36766-36769.
90. Dilioglou S, Cruse JM, Lewis RE. Function of CD80 and CD86 on monocyte- and stem cell-derived dendritic cells. *Exp Mol Pathol*. 2003;75:217-227.
91. De Wit D, Tonon S, Orlslagers V, et al. Impaired responses to toll-like receptor 4 and toll-like receptor 3 ligands in human cord blood. *J Autoimmun*. 2003;21:277-281.
92. Gold MC, Donnelly E, Cook MS, Leclair CM, Lewinsohn DA. Purified neonatal plasmacytoid dendritic cells overcome intrinsic maturation defect with TLR agonist stimulation. *Pediatr Res*. 2006;60:34-37.

93. Napolitani G, Rinaldi A, Bertonni F, Sallusto F, Lanzavecchia A. Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells. *Nat Immunol.* 2005;6:769-776.
94. Heil F, Hemmi H, Hochrein H, et al. Species-specific recognition of single-stranded RNA via toll-like receptor 7 and 8. *Science.* 2004;303:1526-1529.
95. Diebold SS, Kaisho T, Hemmi H, Akira S, Reis e Sousa C. Innate antiviral responses by means of TLR7-mediated recognition of single-stranded RNA. *Science.* 2004;303:1529-1531.
96. Kurt-Jones EA, Popova L, Kwinn L, et al. Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus. *Nat Immunol.* 2000;1:398-401.
97. Otten LA, Finke D, Acha-Orbea H. Can MMTV exploit TLR4? *Trends Microbiol.* 2002;10:303-305; discussion 305-306.
98. Babik JM, Adams E, Tone Y, Fairchild PJ, Tone M, Waldmann H. Expression of murine IL-12 is regulated by translational control of the p35 subunit. *J Immunol.* 1999;162:4069-4078.
99. Means TK, Hayashi F, Smith KD, Aderem A, Luster AD. The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol.* 2003;170:5165-5175.
100. Agrawal S, Agrawal A, Doughty B, et al. Cutting Edge: different toll-like receptor agonists instruct dendritic cells to induce distinct Th responses via differential modulation of extracellular signal-regulated kinase-mitogen-activated protein kinase and c-Fos. *J Immunol.* 2003;171:4984-4989.
101. Angelone DF, Wessels MR, Coughlin M, et al. Innate immunity of the human newborn is polarized toward a high ratio of IL-6/TNF-alpha production in vitro and in vivo. *Pediatr Res.* 2006;60:205-209.
102. Link C, Gavioli R, Ebensen T, Canella A, Reinhard E, Guzman CA. The Toll-like receptor ligand MALP-2 stimulates dendritic cell maturation and modulates proteasome composition and activity. *Eur J Immunol.* 2004;34:899-907.
103. Matsumoto M, Funami K, Tanabe M, et al. Subcellular localization of Toll-like receptor 3 in human dendritic cells. *J Immunol.* 2003;171:3154-3162.
104. Du X, Poltorak A, Silva M, Beutler B. Analysis of Tlr4-mediated LPS signal transduction in macrophages by mutational modification of the receptor. *Blood Cells Mol Dis.* 1999;25:328-338.
105. Bainbridge BW, Darveau RP. *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide: an unusual pattern recognition receptor ligand for the innate host defense system. *Acta Odontol Scand.* 2001;59:131-138.
106. Muzio M, Bosisio D, Polentarutti N, et al. Differential expression and regulation of toll-like receptors (TLR) in human leukocytes: selective expression of TLR3 in dendritic cells. *J Immunol.* 2000;164:5998-6004.
107. Thoma-Uszynski S, Kiertcher SM, Ochoa MT, et al. Activation of toll-like receptor 2 on human dendritic cells triggers induction of IL-12, but not IL-10. *J Immunol.* 2000;165:3804-3810.
108. Tsuji S, Matsumoto M, Takeuchi O, et al. Maturation of human dendritic cells by cell wall skeleton of *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette-Guerin: involvement of toll-like receptors. *Infect Immun.* 2000;68:6883-6890.
109. Prebeck S, Kirschning C, Durr S, et al. Predominant Role of Toll-Like Receptor 2 Versus 4 in *Chlamydia pneumoniae*-Induced Activation of Dendritic Cells. *J Immunol.* 2001;167:3316-3323.
110. Hertz CJ, Kiertcher SM, Godowski PJ, et al. Microbial lipopeptides stimulate dendritic cell maturation via Toll-like receptor 2. *J Immunol.* 2001;166:2444-2450.

111. Wetzler LM. The role of Toll-like receptor 2 in microbial disease and immunity. *Vaccine*. 2003;21 Suppl 2:S55-60.
112. Fricke I, Mitchell D, Mittelstadt J, et al. Mycobacteria induce IFN-gamma production in human dendritic cells via triggering of TLR2. *J Immunol*. 2006;176:5173-5182.
113. Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, et al. Quantitative expression of toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodeoxynucleotides. *J Immunol*. 2002;168:4531-4537.
114. Luft T, Jefford M, Luetjens P, et al. IL-1 beta enhances CD40 ligand-mediated cytokine secretion by human dendritic cells (DC): a mechanism for T cell-independent DC activation. *J Immunol*. 2002;168:713-722.
115. Sadeghi K, Berger A, Langgartner M, et al. Immaturity of infection control in preterm and term newborns is associated with impaired toll-like receptor signaling. *J Infect Dis*. 2007;195:296-302.
116. Xing Z, Gauldie J, Cox G, et al. IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest*. 1998;101:311-320.
117. Roelofs MF, Joosten LA, Abdollahi-Roodsaz S, et al. The expression of toll-like receptors 3 and 7 in rheumatoid arthritis synovium is increased and costimulation of toll-like receptors 3, 4, and 7/8 results in synergistic cytokine production by dendritic cells. *Arthritis Rheum*. 2005;52:2313-2322.
118. Steinbach G, Bolke E, Schulte Am Esch J, et al. Comparison of whole blood interleukin-8 and plasma interleukin-8 as a predictor for sepsis in postoperative patients. *Clin Chim Acta*. 2006.
119. Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C. Macrophage deactivation by interleukin 10. *J Exp Med*. 1991;174:1549-1555.
120. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*. 1991;147:3815-3822.
121. Allavena P, Piemonti L, Longoni D, et al. IL-10 prevents the differentiation of monocytes to dendritic cells but promotes their maturation to macrophages. *Eur J Immunol*. 1998;28:359-369.
122. De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M. Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol*. 1997;27:1229-1235.
123. Wang P, Wu P, Siegel MI, Egan RW, Billah MM. IL-10 inhibits transcription of cytokine genes in human peripheral blood mononuclear cells. *J Immunol*. 1994;153:811-816.
124. Kalinski P, Schuitemaker JH, Hilkens CM, Kapsenberg ML. Prostaglandin E2 induces the final maturation of IL-12-deficient CD1a+CD83+ dendritic cells: the levels of IL-12 are determined during the final dendritic cell maturation and are resistant to further modulation. *J Immunol*. 1998;161:2804-2809.
125. Corinti S, Albanesi C, la Sala A, Pastore S, Girolomoni G. Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions. *J Immunol*. 2001;166:4312-4318.
126. Pastore S, Fanales-Belasio E, Albanesi C, Chinni LM, Giannetti A, Girolomoni G. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor is overproduced by keratinocytes in atopic dermatitis. Implications for sustained dendritic cell activation in the skin. *J Clin Invest*. 1997;99:3009-3017.
127. Hanna N, Hanna I, Hleb M, et al. Gestational age-dependent expression of IL-10 and its receptor in human placental tissues and isolated cytotrophoblasts. *J Immunol*. 2000;164:5721-5728.

128. Makhseed M, Raghupathy R, El-Shazly S, Azizieh F, Al-Harmi JA, Al-Azemi MM. Pro-inflammatory maternal cytokine profile in preterm delivery. *Am J Reprod Immunol.* 2003;49:308-318.
129. Caux C, Massacrier C, Vanbervliet B, Barthelemy C, Liu YJ, Banchereau J. Interleukin 10 inhibits T cell alloreaction induced by human dendritic cells. *Int Immunol.* 1994;6:1177-1185.
130. Burchett SK, Weaver WM, Westall JA, Larsen A, Kronheim S, Wilson CB. Regulation of tumor necrosis factor/cachectin and IL-1 secretion in human mononuclear phagocytes. *J Immunol.* 1988;140:3473-3481.
131. Sieburth D, Jabs EW, Warrington JA, et al. Assignment of genes encoding a unique cytokine (IL12) composed of two unrelated subunits to chromosomes 3 and 5. *Genomics.* 1992;14:59-62.
132. Scott ME, Kubin M, Kohl S. High level interleukin-12 production, but diminished interferon-gamma production, by cord blood mononuclear cells. *Pediatr Res.* 1997;41:547-553.
133. Joyner JL, Augustine NH, Taylor KA, La Pine TR, Hill HR. Effects of group B streptococci on cord and adult mononuclear cell interleukin-12 and interferon-gamma mRNA accumulation and protein secretion. *J Infect Dis.* 2000;182:974-977.
134. Lee SM, Suen Y, Chang L, et al. Decreased interleukin-12 (IL-12) from activated cord versus adult peripheral blood mononuclear cells and upregulation of interferon-gamma, natural killer, and lymphokine-activated killer activity by IL-12 in cord blood mononuclear cells. *Blood.* 1996;88:945-954.
135. Goriely S, Demonte D, Nizet S, et al. Human IL-12(p35) gene activation involves selective remodeling of a single nucleosome within a region of the promoter containing critical Sp1-binding sites. *Blood.* 2003;101:4894-4902.
136. Goriely S, Molle C, Nguyen M, et al. Interferon regulatory factor 3 is involved in Toll like receptor(TLR)4- and TLR3-induced IL-12p35 gene activation. *Blood.* 2006.
137. Weinmann AS, Plevy SE, Smale ST. Rapid and selective remodeling of a positioned nucleosome during the induction of IL-12 p40 transcription. *Immunity.* 1999;11:665-675.
138. Zhang D, Zhang G, Hayden MS, et al. A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science.* 2004;303:1522-1526.
139. Lauw FN, Caffrey DR, Golenbock DT. Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends Immunol.* 2005;26:509-511.
140. Fanning SL, George TC, Feng D, et al. Receptor cross-linking on human plasmacytoid dendritic cells leads to the regulation of IFN-alpha production. *J Immunol.* 2006;177:5829-5839.
141. Krieg AM. Therapeutic potential of Toll-like receptor 9 activation. *Nat Rev Drug Discov.* 2006;5:471-484.
142. Kerkmann M, Rothenfusser S, Hornung V, et al. Activation with CpG-A and CpG-B oligonucleotides reveals two distinct regulatory pathways of type I IFN synthesis in human plasmacytoid dendritic cells. *J Immunol.* 2003;170:4465-4474.
143. Adkins B, Bu Y, Guevara P. The generation of Th memory in neonates versus adults: prolonged primary Th2 effector function and impaired development of Th1 memory effector function in murine neonates. *J Immunol.* 2001;166:918-925.
144. Gasparoni A, Ciardelli L, Avanzini A, et al. Age-related changes in intracellular TH1/TH2 cytokine production, immunoproliferative T lymphocyte response and natural killer cell activity in newborns, children and adults. *Biol Neonate.* 2003;84:297-303.

145. Wu CY, Demeure C, Kiniwa M, Gately M, Delespesse G. IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells. *J Immunol.* 1993;151:1938-1949.
146. Owaki T, Asakawa M, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. IL-27 Induces Th1 Differentiation via p38 MAPK/T-bet- and Intercellular Adhesion Molecule-1/LFA-1/ERK1/2-Dependent Pathways. *J Immunol.* 2006;177:7579-7587.
147. Owaki T, Asakawa M, Morishima N, et al. A role for IL-27 in early regulation of Th1 differentiation. *J Immunol.* 2005;175:2191-2200.
148. Brombacher F, Kastelein RA, Alber G. Novel IL-12 family members shed light on the orchestration of Th1 responses. *Trends Immunol.* 2003;24:207-212.
149. Vanden Eijnden S, Goriely S, De Wit D, Willems F, Goldman M. IL-23 up-regulates IL-10 and induces IL-17 synthesis by polyclonally activated naive T cells in human. *Eur J Immunol.* 2005;35:469-475.
150. Hamano S, Himeno K, Miyazaki Y, et al. WSX-1 is required for resistance to *Trypanosoma cruzi* infection by regulation of proinflammatory cytokine production. *Immunity.* 2003;19:657-667.
151. Artis D, Villarino A, Silverman M, et al. The IL-27 receptor (WSX-1) is an inhibitor of innate and adaptive elements of type 2 immunity. *J Immunol.* 2004;173:5626-5634.
152. Yen D, Cheung J, Scheerens H, et al. IL-23 is essential for T cell-mediated colitis and promotes inflammation via IL-17 and IL-6. *J Clin Invest.* 2006;116:1310-1316.
153. Smits HH, van Beelen AJ, Hessle C, et al. Commensal Gram-negative bacteria prime human dendritic cells for enhanced IL-23 and IL-27 expression and enhanced Th1 development. *Eur J Immunol.* 2004;34:1371-1380.
154. Kamiya S, Owaki T, Morishima N, Fukai F, Mizuguchi J, Yoshimoto T. An indispensable role for STAT1 in IL-27-induced T-bet expression but not proliferation of naive CD4+ T cells. *J Immunol.* 2004;173:3871-3877.
155. Hunter CA. New IL-12-family members: IL-23 and IL-27, cytokines with divergent functions. *Nat Rev Immunol.* 2005;5:521-531.
156. Villarino AV, Huang E, Hunter CA. Understanding the pro- and anti-inflammatory properties of IL-27. *J Immunol.* 2004;173:715-720.
157. Batten M, Ghilardi N. The biology and therapeutic potential of interleukin 27. *J Mol Med.* 2007.
158. Nagai T, Devergne O, van Seventer GA, van Seventer JM. Interferon-beta Mediates Opposing Effects on Interferon-gamma-dependent Interleukin-12 p70 Secretion by Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. *Scand J Immunol.* 2007;65:107-117.
159. Rissoan MC, Soumelis V, Kadowaki N, et al. Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science.* 1999;283:1183-1186.
160. Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY, Liu YJ. Natural interferon alpha/beta-producing cells link innate and adaptive immunity. *J Exp Med.* 2000;192:219-226.
161. Levings MK, Sangregorio R, Galbiati F, Squadrone S, de Waal Malefyt R, Roncarolo MG. IFN-alpha and IL-10 induce the differentiation of human type 1 T regulatory cells. *J Immunol.* 2001;166:5530-5539.
162. Ohshima Y, Delespesse G. T cell-derived IL-4 and dendritic cell-derived IL-12 regulate the lymphokine-producing phenotype of alloantigen-primed naive human CD4 T cells. *J Immunol.* 1997;158:629-636.
163. Levy O, Zarembek KA, Roy RM, Cywes C, Godowski PJ, Wessels MR. Selective impairment of TLR-mediated innate immunity in human newborns: neonatal blood plasma reduces monocyte TNF-alpha induction by bacterial lipopeptides, lipopolysaccharide, and imiquimod, but preserves the response to R-848. *J Immunol.* 2004;173:4627-4634.

164. Gautier G, Humbert M, Deauvieux F, et al. A type I interferon autocrine-paracrine loop is involved in Toll-like receptor-induced interleukin-12p70 secretion by dendritic cells. *J Exp Med*. 2005;201:1435-1446.
165. Marodi L, Goda K, Palicz A, Szabo G. Cytokine receptor signalling in neonatal macrophages: defective STAT-1 phosphorylation in response to stimulation with IFN-gamma. *Clin Exp Immunol*. 2001;126:456-460.
166. Rharbaoui F, Drabner B, Borsutzky S, et al. The Mycoplasma-derived lipopeptide MALP-2 is a potent mucosal adjuvant. *Eur J Immunol*. 2002;32:2857-2865.

6.2. Monografien

1. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik MJ. *Immunobiology*. Garland Science, Taylor and Francis Group. New York and London; 6th edition 2005

6.3. Quellen aus dem Internet

- http://www.invivogen.com/sscat.php?ID=9&ID_cat=2
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?db=Nucleotide&itool=toolbar>
http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi

7. Anhang

7.1. Abkürzungen

Abb.	Abbildung
AB	Adultes Blut
ACK	Ammonium-Chlorid-Kalium Puffer
APC	<i>Antigen-presenting cell</i> (Antigen-präsentierende Zelle)
bp	Basenpaare
BDCA	<i>Blood dendritic cell antigen</i>
BSA	<i>Bovine serum albumine</i> (Rinderserum Albumin)
CB	<i>cord blood</i> (Nabelschnurblut)
CBA	<i>Cytometric bead array</i>
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDNA	<i>copy DNA</i>
CPM	<i>Counts per minute</i> (gezählte Ereignisse pro Minute)
DC	<i>Dendritic cell</i> (Dendritische Zelle)
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EBI3	<i>Ebstein-Barr-Virus-induced gene 3</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ERK	<i>Extracellular signal-regulated kinase</i>
FACS	<i>Fluorescence activated cell sorter</i> (Durchflusszytometer)
FCS	<i>Fetal calf serum</i> (Fetales Kälberserum)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenz
FLT3-L	<i>Fms-like tyrosine kinase-ligand</i>
FSC	<i>Forward scatter</i>
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophages colony-stimulating factor</i>
HKUEC	<i>Heat-killed uropathogenic e.coli</i> (Hitze-inaktivierte uropathogene <i>E.coli</i>)
HPC	<i>Hematopoietic progenitor cells</i> (Hämatopoetische Stammzellen)
HPC-DC	Aus HPC generierte dendritische Zellen
IFN	Interferon
IgG	Immunglobulin-G
IL	Interleukin
imDC	<i>Immature DC</i> (unreife Dendritische Zelle)
IRAK	Interleukin-1 Rezeptor-assoziierte Kinase
IRF	<i>Interferon regulatory factor</i>
KM	Kulturmedium
KM-AB	Kulturmedium mit 10% AB-Serum
KM-FCS	Kulturmedium mit FCS
LPS	Lipopolysaccharid
MACS	<i>Magnetic activated cell sorter</i> (Magnetische Zellseparation)
mDC	Aus Monozyten generierte dendritische Zellen
maDC	<i>Mature DC</i> (reife Dendritische Zelle)
Malp2	<i>Macrophage-activating lipopeptide</i>
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>

MEM	<i>Minimal essential medium</i>
MFI	Mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	<i>Major histocompatibility complex</i> (Haupthistokompatibilitäts Komplex)
MLR	<i>Mixed lymphocyte reaction</i> (Gemischte Lymphozytenreaktion)
mRNA	<i>messenger RNA</i>
NB	Nabelschnurblut
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nuc	<i>Nucleosom</i>
PamCys	Palmitoylcystein
PAMP	<i>Pathogen associated molecular pattern</i> (Pathogen-assoziierte molekulare Muster)
PBMCs	<i>Peripheal blood mononuclear cells</i> (periphere mononukleäre Blutzellen)
PBS	<i>Phosphat buffered saline</i> (Kochsalzlösung)
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> (Polymerase Kettenreaktion)
pDC	Plasmazytoide Dendritische Zelle
PE	Phycoerythrin
PerCP	Perdinin-Chlorophyll a Protein
PHA	Phytohämagglutinin
PI	Propidium Jodid
Poly(I:C)	<i>Polycytidylic acid</i>
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PRR	<i>Pattern recognition receptor</i> (Pathogenerkennungsrezeptor)
R	Rezeptor
R848	<i>Resiquimod</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkriptase
SCF	<i>Stem cell factor</i>
SI	Stimulationsindex
SSC	<i>Side-scatter</i>
ssRNA	<i>single strand RNA</i> (Einzelstrang-RNA)
STAT	<i>Signal transducers and activators of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TCCR	<i>T cell cytokine receptor</i> (IL-27 Rezeptor)
TCR	<i>T cell receptor</i> (T-Zell Rezeptor)
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Th-Zellen	T-Helfer Zellen
TIR	Toll/Interleukin 1 Rezeptor
TIRAP	Toll/Interleukin 1 Rezeptor Adaptor Protein
TLR	<i>Toll-like</i> Rezeptor (Toll-ähnlicher Rezeptor)
TMB	Tetramethyl-Benzidin
TNF	Tumornekrosefaktor
TPO	Thrombopoetin
TRAF	Tumornekrosefaktor-assoziiierter Faktor
TRAM	<i>Trif-related adaptor protein</i>
TZ	T-Zellen
WM	Waschmedium

7.2. Datenübersicht

7.2.1. Phänotypische Charakterisierung stimulierter dendritischer Zellen

7.2.1.1. Stimulation unreifer dendritischer Zellen aus hämatopoetischen Stammzellen

Daten zu *Abbildung 3.6*; [Prozentuale Zellanteile]

Expression von CD80

CD80	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	MW	Abw
d0	0,2	0,6	0,1	0,1	5,4	0,3	30,6	27,0	16,6	15,2	18,2	20,3	20,3	3,2	23,2	12,1	10,7
d3	1,7	17,8	5,4	2,5	4,3	4,8	44,0	39,2	31,4	27,5	24,9	23,7	6,0	17,4		17,9	13,7
Ko d5	41,0	13,1	0,2	28,0	8,4	4,8	41,1	36,4	42,0	30,2	28,7	31,7				25,5	14,3
LPS																	
IFN γ	3,5	15,9	15,5													11,6	5,8
LPS/IFN γ	61,7	68,3	43,9													58,0	10,3
Zymosan										21,3	34,3	24,8				26,8	5,5
Poly(I:C)										24,2	34,1	27,7				28,6	4,1
Malp2										8	16					11,9	3,9
Loxoribin										6,5	17					11,6	5,1
R848										7,4	20					13,5	6,1
CpG										32,4	11,3	17,5				20,4	8,8
HKUEC										21	21					21,1	0,2
Kombi							57,0	37	37	23,9	24,6	23,7	57,0	37,1	36,8	37,1	12,0

Daten zu *Abbildung 3.7*; [Prozentuale Zellanteile]

Expression von CD83

	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14
d0	1,9	6,7	8,3	3,0	13,6	4,0	0,1	0,3	0,5	0,1	0,5	0,4	0,2	0,3
d3	3,1	3,9	3,0	9,5	3,6	8,6	1,7	0,1	1,0	3,0	0,7	0,3	11,3	1,4
Ko d5	5,1	3,9	3,4	2,1	4,9	5,0	1,8	0,1	0,5	11,6	0,7	0,4	5,7	0,4
LPS	2,3	14,9	9,3	2,8	0,8	1,1	2,5	1,7	2,0					
IFNg	1,7	21,9	18,2	1,6	0,3	0,6	0,6	0,2	0,4	0,0	0,6	1,1		
LPS+IFNg	44,1	54,5	34,5	23,3	27,1	8,0				4,2	10,6	1,2		
Zymosan														
Poly(I:C)														
Malp2														
Loxoribin														
R848														
CpG														
HKUEC														
Kombi														

Umbruch

CB15	CB16	CB17	CB18	CB19	CB20	CB21	CB22	CB23	CB24	CB25	MW	Abw
0,5	0,1	0,2	5,2	4,8	13,7	15,6	12,7	14,2	2,5	4,0	4,5	5,2
0,8	1,7	1,4	14,6	11,6	17,6	15,9	13,1	12,0	4,9	5,0	6,0	5,4
0,1	0,7	0,3	9,1	6,3	17,3	8,7	13,0	10,8			4,9	4,7
											4,2	4,5
											3,9	7,3
											23,1	17,6
						7,8	38,4	12,4			19,5	13,5
						6,9	24,0	15,1			15,3	7,0
						5,1	2,2				3,7	1,5
						4,8	2,5				3,7	1,2
						5	19,6				12,3	7,3
						15,2	9,6	14,9			13,2	2,6
						18,7	9				13,9	4,9
			53,7	32,56	14,92	12,8	25,4	8,1			24,6	15,4

Daten zu *Abbildung 3.8*; [Prozentuale Zellanteile]

Expression von CD86all

	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	CB16	CB17	MW	Abw
d0	46,1	36,1	12,8	20,8	34,0	12,0	63,1	30,6	25,0	58,0	57,7	46,8	54,0	57,1	52,7	13,2	18,1	37,5	17,6
d3	77,2	40,2	21,8	27,6	42,9	20,0	60,0	50,4	28,6	73,5	59,7	59,6	53,3	57,0	10,9	21,7	13,0	42,2	20,4
Ko d5	72,2	51,9	33,0	37,7	53,5	22,3	55,2	35,5	26,5	64,4	60,4	73,0	50,3	63,3	13,8			47,5	17,8
LPS	56,1	29,2	32,6															39,3	11,9
IFNg	74,3	55,9	48,5	41,7	70,9	36,5												54,6	14,1
LPS+IFNg				91,8	85,1	66,8												81,2	10,6
Zymosan													51,7	59,6	14,0			41,8	19,9
Poly(I:C)													49,4	49,7	18,7			39,3	14,5
Malp2													17,6	8,5				13,1	4,6
Loxoribin													21,9	9,3				15,6	6,3
R848													27,6	15,5				21,6	6,1
CpG													69,2	56,6	23,2			49,6	19,4
HKUEC													44,1	14,1				29,1	15,0
Kombi										68,5	51,99	61,46	48,1	48,0	15,2			48,9	16,8

Daten zu *Abbildung 3.9*; [Prozentuale Zellanteile]

Expression von CD86high

	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11
d0	0,5	0,2	0,8	7,6	0,3	0,6	0,0	0,0	0,1	0,0	0,1
d3	4,1	3,2	3,9	23,0	2,5	7,7	0,7	15,8	3,0	0,8	0,5
Ko d5	1,5	2,4	2,6	7,2	3,0	1,9	0,7	10,3	0,4	0,1	0,4
LPS	2,4	15,4	12,5	2,4	15,4	12,5					
IFNg	19,2	15,2	19,4	19,2	15,2	19,4	1,3	5,0	12,2		
LPS+IFNg	54,1	71,0	50,2				55,1	58,2	51,1		
Zymosan											
Poly(I:C)											
Malp2											
Loxoribin											
R848											
CpG											
HKUEC											
Kombi											

Umbruch

CB12	CB13	CB14	CB15	CB16	CB17	CB18	CB19	CB20	MW	Abw
0,2	4,0	8,6	7,8		7,1	7,1	0,3	2,4	2,5	3,2
6,7	11,6	8,8	14,8		9,1	6,3	1,4	3,5	6,7	5,9
2,3	7,0	5,1	15,3		8,2	3,7			4,2	4,0
									10,1	5,6
									14,0	6,3
									56,6	6,9
				13,0	33,9	5,9			17,6	11,9
				6,9	20,1	13,5			13,5	5,4
				2	1,7				1,9	0,1
				1,6	1,9				1,8	0,2
				2,4	8,8				5,6	3,2
				14,8	12,9	7,5			11,8	3,1
				10,7	5,5				8,1	2,6
	52,0	37,27	15,74	12,2	23,5	6,0			24,4	15,8

Daten zu *Abbildung 3.10*; [Prozentuale Zellanteile]

Expression von HLA-DR

	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	CB16	CB17	CB18	CB19	MW	Abw
d0	66,7	67,3	72,7	71,9	78,9	66,6	80,3	49,3	81,4	79,7	65,2	28,0	18,2	60,2	78,9	66,1	47,0	57,9	82,2	64,1	17,3
d3	80,4	77,5	62,0	93,2	64,3	53,1	63,7	47,3	78,2	72,4	61,2	48,0	73,2	64,7	87,4	6,4	34,9	47,0	58,9	61,8	19,6
Kontrolle	89,3	81,0	84,9	95,9	81,5	81,5	71,4	50,3	86,8	86,3	61,0	43,3	66,8	73,6	76,1	68,8	23,8			71,9	18,0
LPS	66,6	63,5	79,7	71,0	51,6	58,1														65,1	9,0
IFNg	81,0	84,2	81,9	88,5	88,8	84,2	46,1	86,4	71,5											79,2	12,7
LPS+IFNg	90,3	89,0	88,3				69,6	88,9	74,8											83,5	8,2
Zymosan															83,7	71,6	30,0			61,8	23,0
Poly(I:C)															77,0	68,3	35,9			60,4	17,7
Malp2															50,7	67,1				58,9	8,2
Loxoribin															48,2	68				58,1	9,9
R848															44,3	53,9				49,1	4,8
CpG															94,3	74,9	30,8			66,6	26,6
HKUEC															38,4	62,3				50,4	12,0
Kombi												60,0	67,41	71,47	77,1	62,1	28,5			61,1	15,6

7.2.1.2. Stimulation unreifer dendritischer Zellen aus Monozyten

Daten zu *Abbildung 3.11*; [Prozentuale Zellanteile]

Expression von CD80

AB	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6					MW	Abw
d0	6,0	8,4	8,2	1,2	1,2	0,5					4,3	3,4
d3	8,3	5,3	6,4	19,6	67,8	11,3					19,8	22,0
d5	16,6	14,3	98,5								43,1	39,2
Ko d6	84,1	59,1		16,7	60,1	18,8					47,8	26,1
Zymosan	78	62,8	37,4								59,4	16,7
Poly(I:C)	72,8	70,1	30,8	61,7	19,7	84					56,6	23,3
LPS	92	69,1	37,2	72,6	38,3	78					64,5	20,2
Flagellin	96,6	64,2	40,3								67,0	23,1
Malp2	70,4	66,7	59,8								65,6	4,4
Loxoribin	76,5	61,8	47,1								61,8	12,0
R848	73,9	67	55,9	70,9	39	63					61,6	11,6
CpG	63,1	59,3	27,6								50,0	15,9
Cordycepin	70,6	60,1	38,9								56,5	13,2
Pam Cys	65,7	65,3	29,5								53,5	17,0
HKUEC	78,5	68,8	59,5								68,9	7,8
Poly/R848	87,6	68,2	33,7								63,2	22,3
LPS/R848	63	77,7	56,2								65,6	9,0
Kombination	95,5	74,3	59,1								76,3	14,9
CB	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	MW	Abw
d0	6,9	0,6	79,8	0,4	1,5	3,0	1,3	0,4	0,5		10,5	24,6
d3	78,9	7,4	41,6	22,2	4,0	7,7	11,4	41,2	15,3		25,5	23,0
d5	36,6	24,4	62,0	20,5	19,1	2,1					27,5	18,5
Ko d6	64,5	38,1		75,3			15,5	17,2	51,4		43,7	22,4
Zymosan	75,5	73	75,7	77,5	28,3						66,0	18,9
Poly(I:C)	70,9		97,2	90,6	81,6	20	56,3	22,7	74,8		64,3	27,3
LPS	88,1		79		64,4	95		18	87,7	42,1	67,7	26,2
Flagellin	86,6	73,3	57,3	93,5	12						64,5	29,0
Malp2	72,5	72,3	62,4	81,6	21,1						62,0	21,3
Loxoribin	67,3		66,1	60,7	82,6		24,6				60,3	19,3
R848	70,7		74,2	62,1	84		31	83,5	29,7	65	62,5	19,9
CpG	54,6	34,3	70,4	50,7	80,3	28	12,5				47,2	22,2
Cordycepin	68,9		62,5	54,7	79,1		19,1				56,9	20,5
Pam Cys	63,5	26,3	74	48,9	82,6		18,4				52,3	23,6
HKUEC	81,5			60,8	75,1		27,3				61,2	20,9
Poly/R848	81,6	88,8	34,4								68,3	24,1
LPS/R848	88,2	89,7	36,7								71,5	24,6
Kombination	78,9	70,1							50,2	49,2	62,1	12,8

Daten zu *Abbildung 3.12*; [Prozentuale Zellanteile]

Expression von CD83

AB	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	MW	Abw
d0	5,1	4,0	7,9			2,2	1,6	1,0			3,6	2,4
d3	3,1	2,1	6,5			14,9	62,7	5,5			15,8	21,4
d5	24,0		12,0								18,0	6,0
Ko d6	11,5	43,1		5,9	4,0	17,2	45,8	5,1			18,9	16,7
Zymosan	31,7	48,5	33,4								37,9	7,6
Poly(I:C)	32,6	50,7	25,9	49,3	14,9	65,3					39,8	17,0
LPS	64,1	47,2	29,2	43,8	40,3	57	52,7	82,6			52,1	15,2
Flagellin	83,3	40,9	30,2								51,5	22,9
Malp2	9,6	49,7	36,8								32,0	16,7
Loxoribin	10	45,7	21,2								25,6	14,9
R848	14,4	46	23,1	56,6	58,1	58,8					42,8	17,7
CpG	9,9	42	22,2								24,7	13,2
Cordycepin	10,4	38,7	16								21,7	12,2
Pam Cys	9,6	52,9	16,8								26,4	18,9
HKUEC	26,7	54,3	39,5								40,2	11,3
Poly/R848	61,1	56,7	58,1								58,6	1,8
LPS/R848	64	67,2	56,1								62,4	4,7
Kombination	70,7	64,2	47,2								60,7	9,9
CB	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	MW	Abw
d0	2,7		0,1	83,8	0,7	0,7	1,8	2,5	1,4	0,7	10,5	25,9
d3	26,6		2,7	36,7	8,0	1,6	3,4	6,6	24,2	9,6	13,3	11,9
d5	22,0		5,7	13,1	4,1	9,2	1,5				9,3	6,8
Ko d6	30,2	19,1			8,9		4,4	9,4	28,8		16,8	10,0
Zymosan	48,1		44,2	42,9	15,2		8,3				31,7	16,6
Poly(I:C)	28,2		85,6	46,5	8,2		10,9	20,7	9,8	44,9	31,9	24,7
LPS	77,9		25,5			12,5	24,3	8,7	81,3	51,9	40,3	28,0
Flagellin	73,3		13,6	8,0	20,8		4,3				24,0	25,3
Malp2	53,4		18,4	8,1	4,7		9,9				18,9	17,8
Loxoribin	37,3			5,7	8,9		8,0				15,0	12,9
R848	39,1		11,1	5,1	6,3		7,0	73,6	24,2	33,5	25,0	22,1
CpG	26,0	13,2	10,9	7,1	8,1	7,3	3,6				10,9	6,8
Cordycepin	36,4		11,2	6,9	13,4		7,4				15,1	10,9
Pam Cys	43,6	12,5	7,5	6,4	8,0		6,7				14,1	13,3
HKUEC	69,7		58,3	28,8	11,8		11,5				36,0	24,0
Poly/R848	61,4	78,6	23,1								54,4	23,2
LPS/R848	57,4	79	49,4								61,9	12,5
Kombination	47,3	28,2							37,1	27,5	35,0	8,0

Daten zu *Abbildung 3.13*; [Prozentuale Zellanteile]

Expression von CD86all

AB	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	MW	Abw
d0	99,3	99,3	98,6			99,4	71,5	77,8			91,0	11,7
d3	38,4	43,8	31,5			71,2	80,2	18,3			47,2	21,7
d5	41,0		36,7								38,9	2,1
Ko d6	61,1	90,4		59,3	51,7	91,8	71,7	20,7			63,8	22,6
Zymosan	82,1	93,2	74,2								83,2	7,8
Poly(I:C)	89,8	93,4	71,1	75,6	71,2	96,6					83,0	10,6
LPS	98,3	95,4	78,7	91,2	94,6	75,3	98,5	94,8			90,9	8,3
Flagellin	99,5	93,0	81,6								91,4	7,4
Malp2	64,6	96,0	84,5								81,7	13,0
Loxoribin	60,7	91,5	57,5								69,9	15,3
R848	71,6	90,9	73,3	79,8	98,8	68,3					80,5	11,0
CpG	54,1	90,1	55,3								66,5	16,7
Cordycepin	61,1	86,9	56,4								68,1	13,4
Pam Cys	59,0	91,6	49,9								66,8	17,9
HKUEC	91,8	96,8	85,4								91,3	4,7
Poly/R848	92	82	99								90,7	7,1
LPS/R848	87	79	95								86,8	6,7
Kombination	98,5	96,1	78,9								91,2	8,7
CB	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	MW	Abw
d0	98,7		97,7	99,5	98,6	98,1	98,3	96,8	79,5	80,9	94,2	7,5
d3	87,4		41,7	98,0	40,5	34,1	61,9	46,7	62,8	32,7	56,2	22,1
d5	72,1		34,1	18,7	15,1	34,9	54,8				38,3	19,9
Ko d6	84,9	62,1					64,4	78,2	74,6		72,8	8,5
Zymosan	94,9		91,9	84,2	75,9		90,6				87,5	6,8
Poly(I:C)	96,2		99,7	97,7	69,6		83,0	90,8	88,1	91,8	89,6	9,1
LPS	85,8		84,2			68,6	79,3	64,3	95,5	97,0	82,1	11,5
Flagellin	82,7		65,1	60,3	88,6		59,2				71,2	12,1
Malp2	92,8		79,3	66,5	69,8		65,4				74,8	10,3
Loxoribin	89,8			50,8	69,4		61,9				68,0	14,2
R848	94,9		58,0	45,7	63,5		62,8	89,3	94,7	47,4	69,5	19,2
CpG	84,4	51,5	52,3	54,2	67,1	23,1	65,7				56,9	17,5
Cordycepin	89,5		65,3	96,3	69,1		86,3				81,3	12,0
Pam Cys	96,0	40,8	40,1	37,0	70,5		67,0				58,6	21,4
HKUEC	89,4		97,4	86,7	71,3		73,4				83,6	9,9
Poly/R848	92	98	96								95,1	2,5
LPS/R848	87	93	92								90,6	2,5
Kombination	89,1	81,3							80,9	93,4	86,2	5,3

Daten zu *Abbildung 3.14*; [Prozentuale Zellanteile]

Expression von CD86^{high}

AB	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	MW	Abw
d0	0	0,1	0,2			0	0	0			0,1	0,1
d3	1	2,5	1,8					4			2,3	1,1
d5	1,7		2								1,9	0,1
Ko d6	3,8	25		34,2	27	5,65	17,9	8,1			17,4	11,0
Zymosan	21,1	29,7	15								21,9	6,0
Poly(I:C)	16,9	33,5	16,6	43,3	33,9	72,1					36,1	18,7
LPS	48,9	27	11,5	72,4	77,7	47,3	82,4	72,7			55,0	24,1
Flagellin	59,3	22,8	13								31,7	19,9
Malp2	3,8	29,6	14,3								15,9	10,6
Loxoribin	2,9	32,5	11								15,5	12,5
R848	5,4	29,6	9,1	42,5	85	31,7					33,9	26,3
CpG	2,9	27,8	9,8								13,5	10,5
Cordycepin	2,3	29,2	8,7								13,4	11,5
Pam Cys	2,2	34,4	7,7								14,8	14,1
HKUEC	16	30,1	20,2								22,1	5,9
Poly/R848	62,4	53,8	85,3								67,2	13,3
LPS/R848	37,3	45,3	74,2								52,3	15,8
Kombination	37,8	32,3	14,3								28,1	10,0
CB	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	MW	Abw
d0	0,1		0	0	0	0	0	0,1	0	0	0,0	0,0
d3	6,7		5,6	26,4	1,2	0,6	8		18,3	7,9	9,3	8,2
d5	8,8		5,7	2,5	0,3	2,7	13,4				5,6	4,4
Ko d6	14,5	15,7					12,4	31,2	44,8		23,7	12,5
Zymosan	17,7		31	23,5	8,1		17,8				19,6	7,5
Poly(I:C)	15,6		90,9	25,8	3,7		12,6	54,1	39,7	46,8	36,2	26,4
LPS	12,3		9,5			7,6	2	11,3	79	79,7	28,8	32,1
Flagellin	10,8		4,9	5,2	7,8		10,4				7,8	2,5
Malp2	15,4		7,9	6,2	1,5		14,2				9,0	5,2
Loxoribin	17,7			5,1	2,3		10				8,8	5,8
R848	18,7		4,5	4,3	1,1		12,5	69,3	60,8	20,2	23,9	24,7
CpG	12,4	5,8	4,2	5,2	2,1	1,3	11,5				6,1	4,0
Cordycepin	13		4,5	8,5	4,2		9,4				7,9	3,3
Pam Cys	20,3	3,3	2,1	3,7	1,9		11,9				7,2	6,8
HKUEC	12,9		35,6	16,9	3,6		12,8				16,4	10,6
Poly/R848	67,5	82,7	66,1								72,1	7,5
LPS/R848	47	66,7	67,6								60,4	9,5
Kombination	9,2	4							0,3	18,2	7,9	6,7

Daten zu *Abbildung 3.15*; [Prozentuale Zellanteile]

Expression von HLA-DR

AB	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	MW	Abw
d0	94,9	94,8	92,5			89,7	74,5	54,8			83,5	14,6
d3	63,5	60,0	44,2			59,2	74,5	49,3			58,5	9,8
d5	56,9	45,1	38,5								46,8	7,6
Ko d6	70,4	93,7				80,4	75,4	48,1			73,6	14,9
Zymosan	62,7	93,0	74,5								76,7	12,5
Poly(I:C)	74	95,5	72,1	74,3	75,5	94,4					81,0	9,9
LPS	88,7	89,6	68			73,9	87,9	93,4			83,6	9,3
Flagellin	98,2	89,9	70,1								86,1	11,8
Malp2	51,4	93,1	75,9								73,5	17,1
Loxoribin	62,8	90,6	52,4								68,6	16,1
R848	58,6	90,5	59,3	78,4	88,9	76,0					75,3	12,7
CpG	55,3	91,5	67,2								71,3	15,1
Cordycepin	66,8	91,2	47,6								68,5	17,8
Pam Cys	66,0	94,4	43,4								67,9	20,9
HKUEC	72,6	92,2	80,7								81,8	8,0
Poly/R848	96,2	73,7	87,2								85,7	9,2
LPS/R848	93,4	80,5	74,3								82,7	8,0
Kombination	98,4	96,4	87,4								94,1	4,8
CB	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	MW	Abw
d0	86,6		98,5	97,8	95,2	78,4	78,7	94,2	56,1	55,2	82,3	15,9
d3	95,5		96,0	99,9	87,3	63,8	56,4	30,2	82,2	77,3	76,5	21,5
d5	91,9		95,0	97,7	46,6	78,7	65,0				79,2	18,3
Ko d6	85,1	67,7			71,9		51,3	62,4	58,4		66,1	10,7
Zymosan	89,9		97,4	99,2	74,1		74,9				87,1	10,8
Poly(I:C)	93,0		99,7	99,4	75,8		51,3	72,0	79,1	92,7	82,9	15,6
LPS	87,4		96,0			98,5	66,7	47,6	84,4	82,7	80,5	16,5
Flagellin	82,1		92,6	97,9	82,8		43,9				79,9	18,9
Malp2	84,6		94,2	99,3	82,5		48,8				81,9	17,6
Loxoribin	90,7			99,0	77,1		47,3				78,5	19,6
R848	92,2		93,5	98,9	74,0		46,9	64,5	83,1	80,1	79,2	16,1
CpG	90,3	56,8	92,3	98,8	72,3	66,4	46,5				74,8	18,2
Cordycepin	92,6		96,7	99,5	75,7		71,5				87,2	11,4
Pam Cys	92,6	57,2	94,7	98,0	79,7		50,9				78,9	18,5
HKUEC	82,3		99,3	99,1	64,3		52,2				79,4	18,8
Poly/R848	93,1	81,4	87,6								87,4	4,8
LPS/R848	90,9	75,2	82,7								82,9	6,4
Kombination	88,4	85,7							93,2	93,9	90,3	3,4

Daten zu *Abbildung 3.16*; [Prozentuale Zellanteile]

Expression von CD209

AB	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	MW	Abw
d0	4,3	5,9	7,3			3,3	1,6	0,3			3,8	2,4
d3	96,8	86,0	95,8			88,0	72,2	94,9			89,0	8,5
d5	98,5	90,9	97,8								95,7	3,4
Ko d6	98,8	84,6				90,1		96,2			92,4	5,5
Zymosan	99,0	81,9	92,2								91,0	7,0
Poly(I:C)	98,8	81,9	93,3	66,8	89,1	91,5					86,9	10,3
LPS	98,0	78,4	95,1			65,6	85,6	88,0			85,1	10,8
Flagellin	98,9	82,0	94,6								91,8	7,2
Malp2	99,4	80,1	94,0								91,2	8,1
Loxoribin	98,3	80,7	95,8								91,6	7,8
R848	98,9	82,1	95,2	68,3	84,0	90,4					86,5	10,0
CpG	99,1	79,1	93,0								90,4	8,4
Cordycepin	99,1	82,0	97,2								92,8	7,7
Pam Cys	99,2	77,1	94,4								90,2	9,5
HKUEC	98,4	79,3	96,1								91,3	8,5
Poly/R848	84,9	69,1	83,2								79,1	7,1
LPS/R848	88,9	61,2	84,8								78,3	12,2
Kombination	98,8	79,4	95,0								91,1	8,4
CB	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	MW	Abw
d0	1,7		0,2		0,7	1,1	1,7	1,9	0,4	0,4	1,0	0,6
d3	96,8		97,0	92,7	98,0	92,7	96,3	85,7	97,1	93,1	94,4	3,6
d5	99,0		97,5	98,7	99,4	96,6	95,0				97,7	1,5
Ko d6	99,0	95,3			98,2		83,0	86,9	93,9		92,7	5,9
Zymosan	98,7		98,3	97,3	98,8		76,5				93,9	8,7
Poly(I:C)	98,8		98,8	97,5	98,0		78,1	96,8	88,1	86,5	92,8	7,2
LPS	98,7		97,5			95,1	99,5	83,8	88,3	84,0	92,4	6,4
Flagellin	98,2		97,9	94,0	98,5		82,4				94,2	6,1
Malp2	98,7		97,9	96,3	99,0		81,1				94,6	6,8
Loxoribin	98,5			96,7	99,4		81,3				94,0	7,4
R848	99,2		98,8	97,5	99,4		86,8	90,1	86,5	82,9	92,7	6,4
CpG	99,0	95,6	98,6	96,3	98,5	97,5	76,7				94,6	7,4
Cordycepin	99,3		98,6	96,7	99,2		89,8				96,7	3,6
Pam Cys	99,0	93,1	98,9	96,0	99,4		72,4				93,1	9,5
HKUEC	98,3		96,2	93,8	99,1		82,0				93,9	6,2
Poly/R848	74,4	89,1	84,0								82,5	6,1
LPS/R848	84,7	83,8	83,3								83,9	0,6
Kombination	97,2	95,6							96,6	88,5	94,5	3,5

7.2.1.3. Stimulation unreifer plasmazytoider dendritischer Zellen

Daten zu *Abbildung 3.17*; [Prozentuale Zellanteile]

Ko	AB I	AB II	AB III	AB IV	AB V	AB VI	MW	Abw
CD40	43,8	59,3	44,2	85,8	99,4	90,1	70,4	22,3
CD80	0,7	26,4	1,5	47,9	27,8	8,1	18,7	17,0
CD83	2,8	21,2	3,2	11,3	16,5	16,3	11,9	6,9
CD86	30,6	49,9	16,1	43,9	78,9	34,1	42,3	19,5
CD86high	2	4,5	0,3	5,3	14,2	2	4,7	4,6
CD83/86	2,6	19,8	2,2	10,3	15,3	11,9	10,4	6,4
CpG A	AB I	AB II	AB III	AB V	AB VI	AB VII	MW	Abw
CD40	98,6	99,2	99,3	90,8	99,3	100	97,9	3,2
CD80	15,4	21,4	11,3	24,8	58,4	25	26,1	15,3
CD83	15	13,8	8,5	30,9	30,6	33,6	22,1	9,9
CD86	92,5	52,8	66,1	64,4	76,8	64,9	69,6	12,4
CD86high	11,5	9,5	6,8	11,2	16,5	7,9	10,6	3,1
CD83/86	15,5	13,2	8	28,5	29,1	26,7	20,2	8,3
CpG B	AB I	AB II	AB III	AB V	AB VI	AB VII	MW	Abw
CD40	95,1	96,6	98	95,6	99,6	99,5	97,4	1,8
CD80	7,2	18,2	8,5	72	58,5	17,6	30,3	25,3
CD83	12,3	18,3	12,2	36,8	28	20,9	21,4	8,7
CD86	73,7	77	62,2	86,3	85,6	70,3	75,9	8,4
CD86high	20,8	15,8	9,4	33,5	31,9	11	20,4	9,4
CD83/86	12,1	17,8	11,2	35,9	26,8	16,1	20,0	8,7
Ko	CB I	CB II	CB III	CB IV	CB V	CBVI	MW	Abw
CD40	57	62,8	62,8	63,8	43,4		58,0	7,7
CD80	3,5	5,4	12,9	5,6	5,5		6,6	3,3
CD83	5,8	6,6	8,5	4,2	10,2		7,1	2,1
CD86	52,8	54,2	53,5	39,5	59,5		51,9	6,6
CD86high	1	4,9	1,5	1,8	1,1		2,1	1,4
CD83/86	4,1	5,6	7,6	3,4	5,4		5,2	1,4
CpG A	CB I	CB II	CB III	CB IV	CB V	CBVI	MW	Abw
CD40	80,9	82,5	86,7	89,4	52,6	87,8	80,0	12,6
CD80	14,8	15,2	28,8	30,9	17	48,7	25,9	12,0
CD83	22,4	21,4	25,6	17,4	26,9	17,4	21,9	3,6
CD86	82,1	55,2	56,8	69,5	55,3	62,2	63,5	9,7
CD86high	5,9	8,9	4,1	9,2	2,2	8,4	6,5	2,6
CD83/86	20,2	19,6	24,1	17	21,4	16,7	19,8	2,5
CpG B	CB I	CB II	CB III	CB IV	CB V	CBVI	MW	Abw
CD40	73,8	82,1	91,2	90,3	58,9	91,9	81,4	11,9
CD80	3,1	8,1	23,1	25,4	7,8	77,4	24,2	25,2
CD83	18,3	9,6	22,1	26,3	16,8	42,2	22,6	10,2
CD86	71,2	60,1	78,8	84,2	63,5	96,6	75,7	12,5
CD86high	5,5	4,8	7,2	25,6	2,4	61,1	17,8	20,8
CD83/86	13,7	7,4	20,6	24,5	9,9	41,8	19,7	11,5

7.2.2. Nachweis inflammatorischer Zytokine stimulierter dendritischer Zellen

7.2.2.1. Stimulation unreifer DC aus hämatopoetischen Stammzellen

Daten zu *Abbildung 3.18*; [pg/ml]

Interleukin-1 β (IL-1 β)

IL-1b	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	CB16	MW	Abw
d0	0,0	0,0	0,0	0,0		0,0	15,7	0,0	0,0	0,0	16,1	0,0	17,0	0,0	0,0	0,0	3,3	6,5
d3		1,9			0,0	0,0	0,0	20,7	5,0	0,0	0,0	7,6	0,0	8,0	4,1	0,0	3,6	5,7
d5 Ko	0	0	0	0	0	0											0,0	0,0
Kombi		20,0			0,0	0,0	35,1	0,0	0,0	0,0			0,0	19,8			8,3	12,5
Zymosan					4,1	3,5	0,0		0,0	0,0	0,0						1,3	1,8
Poly					0,0	0,0	0,0		0,0	9,9	0,0						1,7	3,7
LPS					0,0	0,0	0,0	0,0	6,1						23,6	22,4	7,4	10,1
Malp2					0,0	0,0	0,0										0,0	0,0
Loxoribin					0,0	14,3	3,8										6,0	6,0
R848					0,0	15,7	0,0										5,2	7,4
CpG					0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0						0,0	0,0
HKUEC					49,4	18,8	0,0										22,7	20,4
LPS+IFN															58,2	178,7	118,5	60,3
IFN															4,8	4,5	4,7	0,1

Daten zu *Abbildung 3.19*; [pg/ml]

Interleukin-6 (IL-6)

IL-6	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	CB16	MW	Abw
d0	27	82	48	14		60	97	66	101	12	0	324	252	840	69	79	138,0	206,1
d3		14			7	134	0	13	32	6	16	484	327	654	307	238	171,7	206,8
d5 Ko	11,9	39	272,7	23,4	100												89,4	96,6
Kombi		4226			397	148	327	5000	4378	500	790			5000			2307,3	2115,4
Zymosan					701	146	135		2489	23	24						586,2	881,8
Poly					265	233	89		2881	5000	69						1422,9	1883,7
LPS					829	4865	2946	5000	1105						5000	4689	3490,3	1730,1
Malp2					1680	692	657										1009,6	474,1
Loxoribin					555	298	320										391,0	116,2
R848					910	5000	2998										2969,3	1670,0
CpG					30	46	10	96	385	92	172						118,6	119,4
HKUEC					5000	5000	4117										4705,7	416,3
CpG					30	46	10	96	385	92	172						118,6	119,4
LPS+IFNg															5000	5000	5000,0	0,0
IFNg															2085	1794	1939,3	145,6

Daten zu *Abbildung 3.20*; [pg/ml]

Interleukin-8 (IL-8)

IL-8	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	CB16	MW	Abw
d0	127	549	437	179		502	483	1244	1394	285	991	3010	738	710	370	692	780,7	691,0
d3		292			194	1659	569	1121	677	1700	595	2709	2897	548	1105	1213	1175,2	828,7
d5 Ko	145	527,8	1787	338,2	267,3	1987											842,0	749,8
Kombi		5000			5000	1625	1547	5000	5000	5000	2897			5000			4007,6	1448,3
Zymosan				5000	1884	1111		5000	1143	651							2464,8	1828,6
Poly				1140	1213	517		2815	5000	502							1864,3	1599,9
LPS				3614	5000	5000	5000	5000							5000	5000	4802,0	484,9
Malp2				5000	4220	2583											3934,4	1007,3
Loxoribin				4139	1591	651											2127,3	1473,4
R848				5000	5000	5000											5000,0	0,0
CpG				613	962	671	1090	1653	1766	1394							1164,0	422,1
HKUEC				5000	5000	5000											5000,0	0,0
LPS+IFNg															5000	3619	4309,3	690,8
IFNg															5000	5000	5000,0	0,0

Daten zu *Abbildung 3.21*; [pg/ml]

Interleukin-10 (IL-10)

IL-10	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	CB16	MW	Abw
d0	5,4	5,1	3,1	0,0		0,0	33,7	3,1	0,0	0,0	3,4	0,0	10,6	0,0	0,0	0,0	4,3	8,4
d3		7,9			0,0	1,5	0,0	8,2	0,0	0,0	7,8	3,9	0,0	8,2	0,0	4,8	3,3	3,5
d5 Ko	4,7	3,6	3,7	0	0	0											2,0	2,0
Kombi		584,2			15,2		3,1	361,4	19,5	23,1	8,9						145,1	215,8
Zymosan				64,8	1,6	8,2		117,0	0,0	0,0							31,9	44,4
Poly				3,5	1,8	0,0	36,4	21,0	123,4	0,0							26,6	41,5
LPS				25,8	24,1	4,3	24,1	37,1							3,0	3,4	17,4	12,7
Malp2				10,6	0,0	13,3											8,0	5,7
Loxoribin				0,0	12,5	0,0											4,2	5,9
R848				5,1	25,8	11,0											14,0	8,7
CpG				0,0	0,0	0,0	6,2	12,2	0,0	12,2							4,4	5,4
HKUEC				115,5	68,7	91,5											91,9	19,1
LPS+IFNg															2,0	2,7	2,4	0,3
IFNg															0,0	0,0	0,0	0,0

Daten zu *Abbildung 3.22*; [pg/ml]

Interleukin-12p40 (IL-12p40)

IL-12p40	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	CB16
d0	0,00	0,00	0,00	132,60	208,90			178,40	7,90	25,40	276,70	0,00	0,00	0,00		0,00
d3				119,20	113,80				113,4		691	59,1	94,8			28,2
d5 Ko	110,3	65,5			674,5	133	198,4		184,2							
Kombi	6,1	5,6	6,2			23,4	17,1		944		1258,1	1043,4			1847,4	
Zyosan										995,5	129,1	47,6	1337,5	1049	234,6	1197,6
Poly										95,3	130,8	63,6		418,7	1561,4	73,7
LPS	219	152,2	23,5	274	519,8					754,3	1333,5	1019,6	1085,3		318,7	
Malp2										170,3	419,4	198,2				
Loxoribin										141,4	356	77,6				
R848										631,2	1095,7	715,6				
CpG										42,5	45		337,9	142,4	477,2	
HKUEC										1222	1250,8	1258				
LPS+IFNg				817,2	865,6											
IFNg	27,8	2,9	13,4	91,6	89,9	5,3	17,1	5,3	43,9							

Umbruch

CB17	CB18	CB19	CB20	CB21	CB22	CB23	CB24	CB25	CB26	CB27	CB28	MW	Abw
	25,10	82,20	157,60	138,70	204,60	67,10	0,00		125,20	150,30	225,70	87,2	89,0
25,9	46	204,4	73,9	143,8	54,9	119,7	34,2	16,7	25,2	583,8	74,5	138,0	178,5
			3,3									195,6	205,1
563,2	92,9	57,6	1695,9	986,9	1449,6		125,9			1212,8		666,8	650,1
	83											634,2	521,7
	36,3											340,0	512,9
												570,0	428,3
												262,6	111,4
												191,7	119,1
												814,2	202,0
71,6	40,9											165,4	161,0
												1243,6	15,6
												841,4	24,2
												33,0	33,2

Daten zu *Abbildung 3.23*; [pg/ml]

Interleukin-12p70 (IL-12p70)

IL-12p70	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15
d0	2,50	0,00	1,90	2,90	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	
d3	3,9	1,7	2	1	8,8	0	0	5,4	8,7	3,7	0	0	0	0	0
d5 Ko	0	0	0	0	0	0									
Kombi					7,7			1715,7	205,5	40,8	3,5	330,7		39,8	7,7
Zymosan		42,6	0	0	457,7	22,6	0	0							
Poly		2,4	0	0		14,7	1383	0							
LPS	178	107,3	40	219	152,2	23,5									
Malp2	0	0	0												
Loxoribin	0	0	0												
R848	9,4	251,8	82,8												
CpG		0	0	0	0	0	3,6	0			0				
HKUEC	7,4	29,2													
LPS+IFNg	1524	2000	2000												
IFNg	12,3	0	164,5	0	4,4	27,8	2,9	13,4							

Umbruch

CB16	CB17	CB18	CB19	CB20	CB21	CB22	CB23	CB24	CB25	CB26	MW	Abw
0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,00	0,3	0,8
0									0	0	2,0	2,9
											0,0	0,0
		1715,7	205,5	40,8	3,5		39,8				335,1	596,6
											74,7	157,1
											233,4	514,2
									0	1,8	90,2	80,1
											0,0	0,0
											0,0	0,0
											114,7	101,5
											0,5	1,2
											18,3	10,9
									276,9	4279,3	2016,0	1295,3
									0	1,8	22,7	48,0

Daten zu *Abbildung 3.24*; [pg/ml]Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α)

TNF α	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	CB16	CB17	MW	Abw
d0	3,1	3,4	1,2	2,0		3,6	2,4	2,0	2,0	0,0	0,0	0,0	9,7	24,6	3,9	7,7	3	4,3	5,8
d3		2,40			2,9	7,7	0	2,2	0	2,5	0	8	38	12,3		11,3	3,3	7,0	9,8
d5 Ko	5,1	5,7	8,5	3,5	3,5	13												6,6	3,3
Kombi		487,6			191,6		123,2	3136,3	755,8	47,5	391,5			397,3				691,4	947,8
Zymosan					604,4	31,8	0		110,7	2,7	0							124,9	217,9
Poly					21,2	7,3	27,5		101,5	800,5	1,8							160,0	288,3
LPS	217,9	145,9	71,8	69,4	516,6											16,6	16,4	150,7	163,6
Malp2					31,1	38,4	30,7											33,4	3,5
Loxoribin					15,6	34,6	11,8											20,7	10,0
R848					21,6	139,2	62,5											74,4	48,7
CpG					20,6	27	0	0	0	44,1	4,5							13,7	16,0
HKUEC					288,5	243,5	107,2											213,1	77,1
LPS+IFN																61,2	298,1	179,7	118,5
IFNg																10,1	27,8	19,0	8,9

7.2.2.1. Stimulation unreifer dendritischer Zellen aus Monozyten

Daten zu *Abbildung 3.25*; [pg/ml] Interleukin-1 β (IL-1 β) Adult

IL1b	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12	MW	Abw
d3	0	0	6,798	4,997	1,696	9,785	19,6	61,6	354	8,1	43,4	29,1	44,9	94,8
d5	0	0	0										0,0	0,0
d6 Kontrolle	0	0	0	0				27,3	122	0	0	11,8	17,9	37,8
d6 Zymosan	14,828	0	0	0									3,7	6,4
d6 Poly(I:C)	8,167	0	0	4,396				29,5	124	10,3	0	5,7	20,2	37,5
d6 LPS	493,847	0	0	11,78				34,7	129	28	6,3	9,4	79,2	151,4
d6 Flagellin	27,523	0	0	0									6,9	11,9
d6 Malp2	0	0	0										0,0	0,0
d6 Loxoribine	0	0	0										0,0	0,0
d6 R848	0	0	0					57,3	122	9,8	11,3	2,9	25,4	40,6
d6 ODN	1,679	0	0	0									0,4	0,7
d6 HKUEC	61,546	18,991	15,736										32,1	20,9
d6 Kombination		61,156		13,943				76,6	159	101,1	59,9	17,1	69,9	46,4
d6 Poly/R848	38,7	118,4	11,3	20,6	212								80,2	76,0
d6 LPS/R848	96,7	157,1	89,7	47,8	13,5								81,0	48,5
d6 PamCys	0	0	0	0									0,0	0,0
d6 Cordycepin	0	0	0										0,0	0,0
IL1b	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12	MW	Abw
d7 Kontrolle	0	0		19	81,7	0	0	0		0			12,6	26,9
d7 Zymosan	0	0								0			0,0	0,0
d7 Poly(I:C)	0	2,522		19,6	79,1	12,6	0	10,8		0			15,6	25,0
d7 LPS	19,68	6,854		29,8	110,3	50,3	10,8	0		20,1			31,0	33,3
d7 Flagellin	3,387	2,967								0			2,1	1,5
d7 Malp2		0								0			0,0	0,0
d7 Loxoribine		0								0			0,0	0,0
d7 R848		2,281		37,1	91,1	8,8	16,1	5,2		0			22,9	30,1
d7 ODN	0	0								0			0,0	0,0
d7 HKUEC													#####	####
d7 Kombination	67,427	67,427		73,6	120,1	225	18,1	15,9	0	647,4			137,2	191,4
d7 Poly/R848	47,5	79,1	38,7	20,6	11,8								39,5	23,5
d7 LPS/R848	86,3	113,5	135,9	39,2	11,8								77,3	46,0
d7 PamCys	0												0,0	0,0
d7 Cordycepin		0							0	0			0,0	0,0

Daten zu *Abbildung 3.25*; [pg/ml] Interleukin-1 β (IL-1 β) Neonatal

IL1b	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	MW	Abw
d3	0		10,824	27,258	13,928	0	2,404	0	2,79	194,7	796	18,4	0	0	0	76,2	205,6
d5	0		0		9,28	0										2,3	4,0
d6 Kontrolle	0	0		0	0	0	0				320,4	9	3,4	0	0	30,3	91,8
d6 Zymosan	96,408		0	0		0	0									19,3	38,6
d6 Poly(I:C)	9,722		0	0		0	1,696				289,9	0	0	0	0	30,1	86,6
d6 LPS	274,396		0	87,344		0	0				428,1	11,3	2,8	0	0	80,4	142,0
d6 Flagellin	98,506		0	29,407		6,328	0									26,8	37,4
d6 Malp2	0		0	6,328		0										1,6	2,7
d6 Loxoribine	0		0			0										0,0	0,0
d6 R848	0		0	0		0					353,5	24	33,2	0	0	45,6	109,5
d6 ODN	0	0	0		2,445	0	0									0,4	0,9
d6 HKUEC	63,919		0	9,28		0										18,3	26,6
d6 Kombi	771,492	138,037			21,401	0	0				342,2	99,6	241,4	0	10,3	162,4	231,6
d6 Poly/R848	353,5	18,4	17,2	0	0											77,8	138,1
d6 LPS/R848	401,9	56,8	258,8	0	47,1											152,9	153,0
d6 PamCys	21,157	0	0	0		0	0									3,5	7,9
d6 Cordycepin	0		0	0		1,679										0,4	0,7
IL1b	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	MW	Abw
d7 Kontrolle	0	0		198,9	0	0	0	0	0	0						22,1	62,5
d7 Zymosan	0	0							0	0						0,0	0,0
d7 Poly(I:C)	0	0		289,9	0	9,8	0	0	0	0						33,3	90,8
d7 LPS	0	12,571		334,8	13,9	4,7	0	0	0	0						40,7	104,1
d7 Flagellin	0	0							0	0						0,0	0,0
d7 Malp2		0							0	0						0,0	0,0
d7 Loxoribine		1,696							0	0						0,6	0,8
d7 R848		0		222,3	6,9	22	0	0	0	0						31,4	72,5
d7 ODN	0	0							0	0						0,0	0,0
d7 HKUEC																#DIV/0!	#DIV/0!
d7 Kombi	1,696	46,245		369,1	181,9	465,2	0	32,6	16,6	25,6						126,5	165,2
d7 Poly/R848	193,5	18,4	89	0	0											60,2	74,3
d7 LPS/R848	401,9	54,8	331,2	0	23,2											162,2	169,2
d7 PamCys	0															0,0	0,0
d7 Cordycepin		0							0	0						0,0	0,0

Daten zu *Abbildung 3.26*; [pg/ml]

Interleukin-6 (IL-6)

Adult

IL-6	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12	MW	Abw
d3	20,4	19,1	34,2	46,2	1219,3	31,2	1050,6	2052,7	9315,3	719,8	1393,9	204,8	1342,3	2491,1
d5	159,2	330,8	16,8										168,9	128,4
d6 Kontrolle	271,1	217,4	12,8	16,3				890,2	4974,1	495,6	126,7	24,4	781,0	1506,6
d6 Zymosan	1490,5	306,7	14,7	692,8									626,2	554,0
d6 Poly(I:C)	2536,0	303,8	256,0	322,1				1155,3	5528,7	2344,3	436,5	174,0	1450,8	1678,9
d6 LPS	7599,0	1048,5	405,0	10735,2				1637,5	7922,4	11352,9	751,6	268,6	4635,6	4419,9
d6 Flagellin	7954,4	630,3	384,6	9813,5									4695,7	4240,4
d6 Malp2	1001,1	553,5	301,0										618,5	289,5
d6 Loxoribin	273,7	292,5	8,7										191,6	129,6
d6 R848	607,4	340,3	31,4					1722,2	6242,7	12876,5	1201,2	305,3	2915,9	4209,3
d6 ODN	292,5	190,8	15,1	22,2									130,2	117,2
d6 HKUEC	5750,3	1204,5	79,6										2344,8	2451,5
d6 Kombi		4549,2	138,5					4854,6	12091,2	21888,3	11415,6	14686,0	9946,2	6793,7
d6 Poly/R848	2122,2	5075,9	21888,3	3680,1	5105								7574,3	7240,4
d6 LPS/R848	4894,1	12311,2	21888,3	14166,1	8484,1								12348,8	5741,3
d6 PamCys	178,2	90,3	10,0	17,5									74,0	67,8
d6 Cordycepin	197,4	211,2	10,9										139,8	91,4
IL-6	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12	MW	Abw
d7 Kontrolle	24,9	25,5		922,0	5214,6	399,3	126,7	24,4		52,7			848,8	1675,5
d7 Zymosan	839,8	45,2								416,1			433,7	324,6
d7 Poly(I:C)	181,0	924,3		926,0	5191,1	4160,6	493,4	125,4		89,5			1511,4	1870,7
d7 LPS	10639,1	7978,2		1700,7	7993,5	15977,0	542,9	359,1		7766,9			6619,7	5112,3
d7 Flagellin	10172,5	8271,1								7766,9			8736,8	1035,8
d7 Malp2		3050,6								2511,8			2781,2	269,4
d7 Loxoribin		17,8								56,6			37,2	19,4
d7 R848		265,8		1448,7	5479,2	18284,9	1951,0	346,5		596,9			4053,3	6045,2
d7 ODN	22,6	18,6								7491,9			2511,0	3522,0
d7 HKUEC													#DIV/0!	#DIV/0!
d7 Kombi	10639,1	11028,1		12201,7	11876,2	21888,3	13544,2	20855,7	5078,7	9812,5			12991,6	5003,1
d7 Poly/R848	1857,2	5887,8	21888,3	3502,5	8013,4								8229,8	7142,0
d7 LPS/R848	10612,4	11982,8	21888,3	13666,4	10155,7								13661,1	4291,5
d7 PamCys	8,1												8,1	0,0
d7 Cordycepin		20,5							16,7	55,8			31,0	17,6

Daten zu *Abbildung 3.26*; [pg/ml]

Interleukin-6 (IL-6)

Neonatal

IL-6	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	MW
d3	18,8		395,6	875,5	22,8	14,9	7,7	835,8	29,9	5654,3	19477,7	246,8	86,8	12,9	73,0	1982,3
d5	162,3		306,7		14,9	10,2										123,5
d6 Kontrolle	418,5	28,0			13,0	7,8	11,2				9484,1	327,7	298,6	6,8	10,6	1060,6
d6 Zymosan	4510,2		127,8	2330,6		8,4	16,9									1398,8
d6 Poly(I:C)	4651,0		1297,1	1942,6		26,3	26,5				10661,4	1291,5	8905,1	33,6	25,8	2886,1
d6 LPS	7200,4		197,4	6521,9		13,9	1066,8				11876,2	19125,5	13590,1	943,5	1008,8	6154,5
d6 Flagellin	7330,8		148,5	6639,6		37,2	1219,3									3075,1
d6 Malp2	7185,1		197,4	3769,8		21,3										2793,4
d6 Loxoribin	442,6		170,5	1828,5		8,1										612,4
d6 R848	4048,8		182,6	921,2		7,9					10375,9	15695,4	21888,3	46,2	661,6	5980,9
d6 ODN	1118,6	15,0	134,4		14,5	8,8	11,2									217,1
d6 HKUEC	7135,7		654,1	3060,7		18,0										2717,1
d6 Kombi	7954,4	7668,2			4311,8	794,5	3593,6				12589,0	21888,3	21888,3	1636,2	7208,6	8953,3
d6 Poly/R848	9742,6	21888,3	21888,3	179,1	849,5											10909,6
d6 LPS/R848	12091,2	21888,3	21888,3	1888,2	12948,9											14141,0
d6 PamCys	1118,6	21,0	163,9	1171,5		273,7	14,3									460,5
d6 Cordycepin	585,2		134,4	1010,4		8,8										434,7
IL-6	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	MW
d7 Kontrolle	39,8	139,8		7642,1	380,7	395,5	8,4	12,8	1431,7	214,6						1140,6
d7 Zymosan	17,5	3231,9							19,5	432,4						925,3
d7 Poly(I:C)	33,1	1468,4		4531,6	1424,3	8667,9	29,3	19,9	780,7	1572,0						2058,6
d7 LPS	988,3	9465,2		10192,6	15977,0	11876,2	720,4	767,7	1025,6	1991,8						5889,4
d7 Flagellin	1670,0	7696,3							87,6	1852,0						2826,5
d7 Malp2		2089,6							58,3	1435,0						1194,3
d7 Loxoribin		188,8							17,6	377,8						194,7
d7 R848		294,2		5577,9	15004,1	21888,3	116,8	617,8	93,7	508,4						5512,6
d7 ODN	23,3	216,3							15,0	1645,3						475,0
d7 HKUEC																#DIV/0!
d7 Kombi	3920,5	10639,1		13711,2	21888,3	21888,3	3282,6	22013,8	8480,3	9442,9						12807,4
d7 Poly/R848	2877,3	21888,3	21888,3	217,8	882,3											9550,8
d7 LPS/R848	7566,7	21888,3	21888,3	2040,5	20667,7											14810,3
d7 PamCys	13,2															13,2
d7 Cordycepin		223,2							26,2	310,9						186,8

Daten zu *Abbildung 3.27*; [pg/ml]

Interleukin-8 (IL-8)

Adult

IL-8	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12	MW	Abw
d3	65	251	1254	908	14386	6728	1391	15001	20736	959	26017	17127	8735,2	8977,4
d5	280	2148	323										916,9	870,7
d6 Kontrolle	803	1034	906	908				12644	24599	1894	10396	3289	6274,6	7720,5
d6 Zymosan	17584	3904	4306										8598,0	6356,2
d6 Poly(I:C)	10160	2148	2888	355				15975	24599	24379	13374	4150	10891,9	8814,9
d6 LPS	12382	12496	12053					24822	12644	25269	25787	9332	16848,0	6618,7
d6 Flagellin	15364	10626	10626	18843									13864,9	3464,1
d6 Malp2	13428	9888	14044										12453,1	1831,2
d6 Loxoribin	1307	2264	827										1465,9	597,1
d6 R848	6963	2312	6307					14600	20736	20188	24873	7634	12951,7	7740,2
d6 ODN	811	1418	934										1054,4	262,3
d6 HKUEC	14823	15930	15228										15326,8	457,7
d6 Kombination		16511	12608					5190	8589	4834	20967	31710	14344,1	8948,3
d6 Poly/R848	10468,6	17011,8	7370,5	30587,7	17995,2								16686,8	8006,4
d6 LPS/R848	5886,7	7992,5	10374,4	23782,6	26732,5								14953,7	8582,9
d6 PamCys	398	1110	506	449									615,6	287,9
d6 Cordycepin	1055	1540	570										1055,1	395,9
IL-8	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12	MW	Abw
d7 Kontrolle	1994	228		11767	24822	1840	9939	2534		2554			6959,6	7796,1
d7 Zymosan	13390	5023								14243			10885,2	4159,8
d7 Poly(I:C)	689	2913		13587	23952	18617	14241	4937		3994			10366,2	7884,3
d7 LPS	17539	20066		25505	9398	11926	24430	10303		15869			16879,5	5774,8
d7 Flagellin	19012	18505								15869			17795,1	1377,7
d7 Malp2		17539								12558			15048,4	2490,6
d7 Loxoribin		545								987			765,7	221,0
d7 R848		8344		13709	15137	9064	28470	8573		5344			12663,0	7161,0
d7 ODN	585	477								14633			5231,8	6648,0
d7 HKUEC													#DIV/0!	#DIV/0!
d7 Kombination	12237	19711		3177	5034	1912	13736	16821	9948	3849			9602,8	6081,2
d7 Poly/R848	12420	12588,6	3913,9	29245,7	26017								16837,0	9410,8
d7 LPS/R848	3913,9	5627,6	4527,1	22940,8	30587,7								13519,4	11095,0
d7 PamCys	401												401,0	0,0
d7 Cordycepin		828							349	1799			992,0	603,2

Daten zu *Abbildung 3.27*; [pg/ml]

Interleukin-8 (IL-8)

Neonatal

IL-8	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	MW	Abw
d3	89		8336	853	178	624	2333	5697	5023	21690	23099	1460	109	4108	7094	5763,8	7280,2
d5	915		4499		99	382										1473,9	1771,2
d6 Kontrolle	5713	803		10626	260	289	1071				23952	2584	1703	2460	2272	4702,8	6733,1
d6 Zymosan	17584		6538	16074		1404	2123									8744,8	6847,7
d6 Poly(I:C)	14429		7416	12950		342	1553				25965	2266	23733	2691	2119	9346,3	9023,0
d6 LPS	15930		6808	14691		1556	1459				25269	16940	23733	16594	19422	14240,1	7962,1
d6 Flagellin	13428		4625	14429		1622	7666									8353,8	4946,8
d6 Malp2	15784		6250	15645		3014										10173,1	5658,2
d6 Loxoribin	7349		3079	11217		248										5473,3	4169,4
d6 R848	16659		3146	8957		319					27160	22586	11872	5703	15722	12458,2	8428,3
d6 ODN	5221	543	1818		246	267	1459									1592,2	1727,8
d6 HKUEC	10067		13068	16659		2857										10662,7	5075,0
d6 Kombi	3698	17746			14044	7969					9567	7779	3439	21543	31993	13086,3	8816,3
d6 Poly/R848	26671,6	16118,9	4156,2	6803,7	17048,4											14159,8	8036,3
d6 LPS/R848	19124,2	7535,3	7849,8	22130,2	33320,1											17991,9	9649,5
d6 PamCys	13792	741	1856	9539		5316	1796									5506,7	4739,3
d6 Cordycepin	8041		2542	8041		229										4713,6	3426,9
IL-8	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	MW	Abw
d7 Kontrolle	1237	3927		23099	3614	1352	2718	2651	10787	3381						5862,7	6652,0
d7 Zymosan	1474	14783							1875	6061						6048,2	5353,5
d7 Poly(I:C)	1139	3490		24163	2026	14212	2611	2387	1723	4586						6259,9	7358,2
d7 LPS	6698	19711		25050	10143	17169	14632	18823	9511	12223						14884,4	5506,3
d7 Flagellin	8694	18345							4157	10587						10445,5	5124,1
d7 Malp2		12460							2742	9588						8263,3	4076,6
d7 Loxoribin		4801							1585	3412						3265,9	1317,1
d7 R848		5906		24599	11453	6558	5092	16154	5067	5441						10033,5	6623,1
d7 ODN	1687	4845							795	9250						4144,5	3309,5
d7 HKUEC																#DIV/0!	#DIV/0!
d7 Kombi	13149	19184		10562	2741	3177	25674	8756	14779	10778						12088,8	6873,4
d7 Poly/R848	25392,9	5332,1	1481,3	6195,3	18320,2											11344,4	9010,7
d7 LPS/R848	9270	3953,2	3578,1	20966,7	19864,4											11526,5	7540,0
d7 PamCys	881															880,9	0,0
d7 Cordycepin		733							458	3080						1423,5	1176,7

Daten zu *Abbildung 3.28*; [pg/ml]

Interleukin-10 (IL-10) Adult

IL-10	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12	MW	Abw
d3	0,0	0,0	0,0	5,5	34,2	3,5	39,0	407,4	1448,3	52,6	45,7	3,4	170,0	400,5
d5	4,7	4,6	2,9										4,1	0,8
d6 Kontrolle	5,2	0,0	0,0	0,0				107,2	427,8	33,4	4,3	3,9	64,6	132,5
d6 Zymosan	58,3	5,4	0,0	60,4									31,0	28,4
d6 Poly(I:C)	17,7	0,0	1,5	8,1				154,5	534,2	2193,1	7,0	2,7	324,3	680,9
d6 LPS	289,4	14,6	5,3	589,6				291,4	1202,9	3359,1	18,5	2,5	641,5	1029,8
d6 Flagellin	998,6	5,6	3,1	341,5									337,2	405,9
d6 Malp2	11,4	3,0	0,0										4,8	4,8
d6 Loxoribin	7,0	0,0	0,0										2,3	3,3
d6 R848	8,1	3,5	0,0					321,8	697,9	1774,7	13,3	5,5	353,1	585,6
d6 ODN	7,5	0,0	0,0	5,5									3,3	3,3
d6 HKUEC	91,6	19,2	7,4										39,4	37,2
d6 Kombination		305,4	212,9	4864,3				1065,7	2094,6	11398,9	547,7	123,4	2576,6	3648,0
d6 Poly/R848	358,7	616,7	5260	97,5	34,1								1273,4	2004,0
d6 LPS/R848	1026,6	1702,6	10608,1	567,5	50,9								2791,1	3946,1
d6 PamCys	6,1	0,0	0,0	3,3									2,4	2,6
d6 Cordycepin	5,4	2,3	1,6										3,1	1,7
IL-10	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12	MW	Abw
d7 Kontrolle	1,7	9,9		3,2		101,5	357,0	33,9	6,5	2,4		3,2	57,7	110,1
d7 Zymosan	34,7	3,6		1009,0								1009,0	514,1	495,0
d7 Poly(I:C)	2,4	5,0		5,2		114,5	351,7	1531,0	7,1	1,3		5,2	224,8	474,5
d7 LPS	387,1	89,7		2783,1		269,0	819,6	3051,2	12,4	2,2		2783,1	1133,0	1253,8
d7 Flagellin	112,7	61,9		188,6								188,6	137,9	53,7
d7 Malp2		20,5		66,2								66,2	51,0	21,6
d7 Loxoribin		5,1		0,0								0,0	1,7	2,4
d7 R848		3,6		4,3		243,2	411,4	1502,9	32,6	4,7		4,3	275,9	484,7
d7 ODN	3,2	6,9		432,5								432,5	218,8	213,7
d7 HKUEC													#DIV/0!	#DIV/0!
d7 Kombination	4930,4	1283,2	124,3	14182,9		1191,8	1295,8	10996,7	208,8	184,1	124,3	14182,9	4427,7	5532,9
d7 Poly/R848	266,3	524,1	3766,2	81,4	57,3								939,1	1423,4
d7 LPS/R848	116,6	1225,5	8782,6	567,5	41,8								2146,8	3344,5
d7 PamCys	0,0												0,0	0,0
d7 Cordycepin		11,1	0,0	0,0							0,0	0,0	2,2	4,5

Daten zu *Abbildung 3.28*; [pg/ml]

Interleukin-10 (IL-10) Neonatal

IL-10	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	MW	Abw
d3	3,7		2,9	3,4	0	2	0	16,718	0	665,5	231,2	13,8	15,3	2,1	3,1	68,6	175,5
d5	4,9		0	3,2	0	0										1,6	2,1
d6 Kontrolle	6,2	0		16,6	0	0	0				72,3	11	21,2	3	3,3	12,1	20,2
d6 Zymosan	232,9		0	682,4		0	3,394									183,7	265,0
d6 Poly(I:C)	21,8		0	37		0	0				93,4	22,1	5502,1	2,4	2	568,1	1644,9
d6 LPS	2341,6		0	3357,9		2,2	1,683				182,6	2563,5	3468,5	2,1	3,4	1192,3	1455,2
d6 Flagellin	3705		0	5218,3		2,1	0									1785,1	2237,2
d6 Malp2	200,4		0	101		0										75,4	83,1
d6 Loxoribin	5,9		0	29		0										8,7	12,0
d6 R848	17,5		4,5	10,6		0					119,6	988,9	7605,7	0	3,1	972,2	2364,8
d6 ODN	5,2	1,9	0		0	0	0									1,2	1,9
d6 HKUEC	802,3		0	198,4		2,1										250,7	328,5
d6 Kombii	5124,5	6186,3			254,6	14,3	20,816				501,8	10703,4	17243,8	4,8	21	4007,5	5622,8
d6 Poly/R848	107,2	1625,8	9696,8	0	4,3											2286,8	3755,9
d6 LPS/R848	303,2	10997	15904	4,2	36,1											5448,8	6715,7
d6 PamCys	6,9	3	2,8	15,3		0	0									4,7	5,3
d6 Cordycepin	4,6		0	12		4,7										5,3	4,3
IL-10	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	MW	Abw
d7 Kontrolle	0	10,3	6,8	0		50,4	19,1	31,1	1,6	3,3	6,8	0				11,8	15,3
d7 Zymosan	0	120,5	0,0	15,4							0,0	15,4				25,2	43,2
d7 Poly(I:C)	0	37,2	0,0	2,1		76,6	29,0	4052,3	1,7	3,2	0,0	2,1				382,2	1160,8
d7 LPS	0	400,9	4,6	18,9		141,9	1603,4	3871,0	3,0	1,7	4,6	18,9				551,7	1143,7
d7 Flagellin	0	127,4	0,0	12,9							0,0	12,9				25,5	45,9
d7 Malp2		21,2	0,0	14,9							0,0	14,9				10,2	8,6
d7 Loxoribin		9,9	0,0	2,7							0,0	2,7				3,1	3,6
d7 R848		8,9	0,0	2,4		43,2	628,6	5551,9	0,0	2,2	0,0	2,4				624,0	1653,1
d7 ODN	0	7,9	0,0	11,9							0,0	11,9				5,3	5,4
d7 HKUEC																#DIV/0!	#DIV/0!
d7 Kombi	21,157	4792,3	1167,5	3613,8		309,3	9063,5	16934,0	14,0	397,3	1167,5	3613,8				3735,8	4930,9
d7 Poly/R848	62,9	1710,4	13769	2,5	2,8											3109,6	5369,8
d7 LPS/R848	475,9	8320,9	14800	6,2	94,7											4739,6	5936,3
d7 PamCys	0															0,0	0,0
d7 Cordycepin		11,472	0	0							0	0				2,3	4,6

Daten zu *Abbildung 3.29*; [pg/ml]

Interleukin-12p40 (IL-12p40)

Adult

IL-12p40	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12	MW	Abw
d3	8,5	162,6	2,6	2,2	41,6	3,1	3,4	4,8	7,8	1,7	7,4	10,1	21,3	43,9
d5	0,0	68,6	33,1										33,9	28,0
d6 Kontrolle	0,0	0,0	0,0	12,2				0	13,8	0	12,9	11,1	5,6	6,2
d6 Zymosan	106,0	316,2	126,5	2095,1									660,9	832,1
d6 Poly(I:C)	41,3	412,0	364,9	95,6				1,7	12,3	407,1	152,4	135,7	180,3	159,4
d6 LPS	1077,5	867,3	28,4	1904,7				53,2	13,7	973,7	267,4	115,8	589,1	619,6
d6 Flagellin	1372,1	1018,8	0,0	2140,7									1132,9	769,6
d6 Malp2	181,3	171,4	9,1										120,6	79,0
d6 Loxoribin	0,0	183,0	0,0										61,0	86,3
d6 R848	63,0	208,7	669,6					211,1	16,5	2667	2308,2	953,2	887,2	974,3
d6 ODN	0,0	301,9	0,0	13,1									78,7	128,9
d6 HKUEC	540,2	81,2	742,3										454,6	276,6
d6 Kombination	2000,0	278,2		1650,5				673,6	42,8	2755,7	2000	2000	1425,1	908,5
d6 Poly/R848	300,6	15,5	2755,7	4783,6	5000								2571,1	2122,0
d6 LPS/R848	542,3	39,5	2755,7	5000	5000								2667,5	2112,4
d6 PamCys	0,0	229,9	62,5	31,9									81,1	88,7
d6 Cordycepin	0,0	214,7	0,0										71,6	101,2
IL-12p40	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12	MW	Abw
d7 Kontrolle	82,9	17,0		10,2	42,1	13,9	20,1	10,7					28,1	24,5
d7 Zymosan	2121,9	439,7											1280,8	841,1
d7 Poly(I:C)	46,0	208,3		16,1	39,4	2509,5	776,9	200					542,3	839,2
d7 LPS	1667,2	1928,2		259,6	50,7	1105,5	444	281,4					819,5	693,3
d7 Flagellin	2117,3	2034,7											2076,0	41,3
d7 Malp2		1592,8											1592,8	0,0
d7 Loxoribin		58,6											58,6	0,0
d7 R848		817,3		479,2	54	2460,6	4524,4	1787,4					1687,1	1502,3
d7 ODN	42,9	36,6											39,8	3,1
d7 HKUEC													#DIV/0!	#DIV/0!
d7 Kombination	2203,9	2235,0		1438,8	86,9	2755,7	5000	5000					2674,3	1667,3
d7 Poly/R848	656,8	47,4	2755,7	5000	5000								2692,0	2087,8
d7 LPS/R848	1028,7	93,7	2755,7	5000	5000								2775,6	2007,0
d7 PamCys	17,0												17,0	0,0
d7 Cordycepin		28,5											28,5	0,0

Daten zu *Abbildung 3.29.*; [pg/ml]

Interleukin-12p40 (IL-12p40)

Neonatal

IL-12p40	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	MW	Abw
d3	4,6	0,0	1,2	0,0	0,0	0,0	6,8	10,9	1,3	10,4	4,3	4,2	0,0	3,4	3,8
d5	14,7		78,3	78,3	0,0	0,0								34,3	36,4
d6 Kontrolle	33,3	52,6		57,0	0,6	0,0		2,1	0,9	4,5	3,1	3,1	0,0	14,3	21,2
d6 Zymosan	430,3		47,5	91,5		0,0							6,9	115,2	160,9
d6 Poly(I:C)	114,2		92,5	67,6		0,0		4,0	2,3	526,0	8,1	9,5	13,2	83,7	152,7
d6 LPS	2000,0		182,1	158,3		420,7		101,5	1623,3	932,2	154,7	134,1	224,1	593,1	657,6
d6 Flagellin	2000,0		236,1	82,7		0,0							199,9	503,8	752,8
d6 Malp2	61,5		441,0	127,2		0,0								157,4	169,8
d6 Loxoribin	35,7		0,0	67,8		0,0								25,9	28,2
d6 R848	84,1		57,1	90,9		0,0		53,8	2344,8	2755,7	66,9	1005,9		717,7	1027,1
d6 ODN	48,0	0,0	17,7		0,0								0,0	13,1	18,7
d6 HKUEC	136,0		700,8	284,1		0,0								280,2	262,8
d6 Kombi	2000,0					0,0		270,4	2344,8	2755,7	670,3	4371,4	1765,7	1772,3	1356,2
d6 Poly/R848	65,8	2344,8	2755,7	261,7	1291,6									1343,9	1077,3
d6 LPS/R848	188,6	2344,8	2755,7	811,3	5000									2220,1	1681,8
d6 PamCys	18,0	9,9	0,0	14,5		0,0							23,8	11,0	8,8
d6 Cordycepin	24,1		0,0	33,8		0,0								14,5	14,9
IL-12p40	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	MW	Abw
d7 Kontrolle	45,4	34,7		18	24,2	24	8,1	3,8						22,6	13,4
d7 Zymosan	47,8	120,5												84,2	36,4
d7 Poly(I:C)	28,0	49,5		21	51,2	568,6	21	26,7						109,4	187,8
d7 LPS	404,3	1192,7		207,9	1281,8	831,6	255,5	317,5						641,6	422,3
d7 Flagellin	403,0	469,9												436,5	33,4
d7 Malp2		287,0												287,0	0,0
d7 Loxoribin		54,6												54,6	0,0
d7 R848		160,6		93,5	2755,7	2755,7	211,9	1394						1228,6	1165,8
d7 ODN	13,0	32,7												22,9	9,9
d7 HKUEC														#DIV/0!	#DIV/0!
d7 Kombi	1902,2	1956,8		502,8	2755,7	2755,7	1448,2	5000						2331,6	1305,5
d7 Poly/R848	126,9	2755,7	2755,7	351,6	1675,3									1533,0	1129,9
d7 LPS/R848	379,9	2755,7	2755,7	2507,9	5000									2679,8	1463,8
d7 PamCys	0,0													0,0	0,0
d7 Cordycepin		11,7												11,7	0,0

Daten zu *Abbildung 3.30*; [pg/ml] Interleukin-12p70 (IL-12p70) Adult

IL-12p70	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	MW	Abw
d3	0	0	0	0	0	0	1,5	0	0	0	0,2	0,5
d5	0	0	0	0							0,0	0,0
d6 Kontrolle	0	0	0	0				0	0	1,6	0,2	0,6
d6 Zymosan	0	2,3	0	222,1							56,1	95,9
d6 Poly(I:C)	2,9	0	1,5	6,4				11,7	145,3	59,2	32,4	49,9
d6 LPS	11,4	2,4	0	459,9				15,1	0	0	69,8	159,3
d6 Flagellin	9,3	0	0	974,2							245,9	420,5
d6 Malp2	0	0	0								0,0	0,0
d6 Loxoribin	0	0	0								0,0	0,0
d6 R848	0	0	0					34,1	56	29,3	19,9	21,5
d6 ODN	0	0	0	0							0,0	0,0
d6 HKUEC	0	2,3	8,5								3,6	3,6
d6 Kombination		2,8	102,2	5123,1				609,4	1631,1	5300,4	2128,2	2243,8
d6 Poly/R848	692,8	1172,6	2287,5								1384,3	668,0
d6 LPS/R848	388,3	1418,4	2023,5								1276,7	675,0
d6 PamCys	0	0	0	0							0,0	0,0
d6 Cordycepin	0	0	0								0,0	0,0
IL-12p70	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	MW	Abw
d7 Kontrolle	0	0				0	0	0		0	0,0	0,0
d7 Zymosan	252,2	0								3	85,1	118,2
d7 Poly(I:C)	0,0	0				22,1	426,4	48,8		0	82,9	154,6
d7 LPS	6765,3	9,7				11	2,4	2,8		11,9	1133,9	2518,5
d7 Flagellin	2504,8	55,6								3,9	854,8	1166,9
d7 Malp2		0								0	0,0	0,0
d7 Loxoribin		0								0	0,0	0,0
d7 R848		0				36,6	180,2	33,9		6,7	51,5	66,0
d7 ODN	0	0								0	0,0	0,0
d7 HKUEC											#DIV/0!	#DIV/0!
d7 Kombination	5861,6	4059				412,6	606,1	7119,3	65	46	2595,7	2800,5
d7 Poly/R848	859,4	1064,1	2957,2								1626,9	944,4
d7 LPS/R848	357,9	1360,2	2223,5								1313,9	762,3
d7 PamCys	0										0,0	0,0
d7 Cordycepin		0							0	0	0,0	0,0

Daten zu *Abbildung 3.30*; [pg/ml]

Interleukin-12p70 (IL-12p70)

Neonatal

IL-12p70	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	MW	Abw
d3	0		1,6		0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0,1	0,4
d5	0		0	0	0				0							0,0	0,0
d6 Kontrolle	0	0		0	0	0			0		1,6	1,8	0	0	0	0,3	0,7
d6 Zymosan	0		0	0		0			0							0,0	0,0
d6 Poly(I:C)	0		114,4	0		0			0		0	2,8	3,1	3,7	0	12,4	34,0
d6 LPS	0		0	0		0			0		0	2	2,5	0	0	0,5	0,9
d6 Flagellin	0		0	2,4		0			0							0,5	1,0
d6 Malp2	0		0	1,3					0							0,3	0,6
d6 Loxoribin	0		0	0					0							0,0	0,0
d6 R848	0		0	0					0		0	118,4	10,1	0	12,1	15,6	36,6
d6 ODN	0		0	0		0			0							0,0	0,0
d6 HKUEC	0		0	0					0							0,0	0,0
d6 Kombi	1,5	8,6	0		0	25,1			0		7,4	182,8	60,3	34,5	204,4	47,7	71,2
d6 Poly/R848	12,7	135,7	67,1	13,4	94											64,6	47,4
d6 LPS/R848	6,6	192,9	103,7	8,4	277,2											117,8	105,4
d6 PamCys	0	0	0	0		0			0							0,0	0,0
d6 Cordycepin	0		0	1,9					1,9							1,0	1,0
IL-12p70	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	MW	Abw
d7 Kontrolle	0	0		0	0	0	0	0	0	0						0,0	0,0
d7 Zymosan	0	0							0	0						0,0	0,0
d7 Poly(I:C)	0	0		0	0	0	0	0	14,4	2,4						1,9	4,5
d7 LPS	0	0		0	3,4	0	2,6	0	0	0						0,7	1,3
d7 Flagellin	0	0							0	0						0,0	0,0
d7 Malp2		0							0	0						0,0	0,0
d7 Loxoribin		0							0	0						0,0	0,0
d7 R848		0		2,6	88,4	10,1	0	0	0	0						12,6	28,8
d7 ODN	0	0							0	0						0,0	0,0
d7 HKUEC																#DIV/0!	#DIV/0!
d7 Kombi	20,3	27,01		10	96,1	40,1	127,6	1353,9	89,9	78,7						204,8	408,0
d7 Poly/R848	0	65,9	35,1	0	12,3											22,7	25,1
d7 LPS/R848	4,9	173,1	47	52,9	316,6											118,9	113,6
d7 PamCys	0															0,0	0,0
d7 Cordycepin		0							0	0						0,0	0,0

Daten zu *Abbildung 3.31.*; [pg/ml] Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α)

Adult

TNF α	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12	MW	Abw
d3	1,4	1,8	1,4	7,0	145,8	6,0	27,2	31,9	72,4	6,1	21	55,2	31,4	40,9
d5	2,5	12,7	1,6										5,6	5,1
d6 Kontrolle	2,4	5,0	3,0	62,6				17,6	13,5	33,3	18,2	14,7	18,9	17,9
d6 Zymosan	323,7	21,2	30,3	1647,8									505,7	670,5
d6 Poly(I:C)	194,4	18,5	109,2	83,7				37,1	17,3	2300,5	722,2	237,8	413,4	698,5
d6 LPS	1134,5	100,3	182,6					9031,1	112,3	3825,5	3048,1	763,6	2274,8	2872,6
d6 Flagellin	2390,0	48,6	55,9	8638,6									2783,3	3512,7
d6 Malp2	13,0	34,4	58,9										35,4	18,8
d6 Loxoribin	2,4	8,3	2,8										4,5	2,7
d6 R848	34,0	6,2	43,6					23216,6	69,4	7475,5	6292	1323,4	4807,6	7511,2
d6 ODN	2,9	7,8	3,2	10,2									6,0	3,1
d6 HKUEC	446,3	222,6	688,5										452,5	190,3
d6 Kombi		2439,6	61,8					25179,5	676,6	23961,5	22130,1	19335,8	13397,9	10834,3
d6 Poly/R848	25180	77,6	11720	15031,7	8008,9								12003,6	8258,8
d6 LPS/R848	25180	587,3	21996	22528,6	16008,2								17260,0	8859,5
d6 PamCys	1,8	4,4	2,4	66,0									18,7	27,3
d6 Cordycepin	2,3	5,6	2,3										3,4	1,6
TNF α	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12	MW	Abw
d7 Kontrolle	47,3	2,4		14,5	11,4	17,7	33,2	6,6		1,4			16,8	14,9
d7 Zymosan	786,2	17,3								22,6			275,4	361,2
d7 Poly(I:C)	9,6	31,7		17,6	13,5	1730,2	171,9	31,7		0			250,8	561,5
d7 LPS	9537,0	4094,7		4854,6	31,5	1659,1	1139,5	240		238,6			2724,4	3083,8
d7 Flagellin	8955,1	2273,6								24,3			3751,0	3792,7
d7 Malp2		346,0								2,5			174,3	171,8
d7 Loxoribin		4,5								0			2,2	2,2
d7 R848		49,3		16495,4	32,1	4049,9	10972,6	1038		1,1			4662,6	6068,6
d7 ODN	11,6	3,7								4,9			6,7	3,5
d7 HKUEC													#DIV/0!	#DIV/0!
d7 Kombi	9623,3	10154,0		25179,5	157	20474,9	21733,8	21930,2	3077,9	5232,7			13062,6	8840,8
d7 Poly/R848	17413	22,7	10907	13739,7	11171,6								10650,7	5806,1
d7 LPS/R848	25180	165,4	19053	22130,1	16008,2								16507,2	8724,8
d7 PamCys	6,3												6,3	0,0
d7 Cordycepin		6,1							3,6	0			3,2	2,5

Daten zu *Abbildung 3.31.*; [pg/ml] Tumor-Nekrose-Faktor α (TNF α)

Neonatal

TNF α	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	MW
d3	1,5		8,0	2,7	1,1	2,6	4,3	7,0	10,9	112,3	53,3	5,8	10,8	4,6	6,6	16,5
d5	5,5		17,9		1,4	2,2										6,8
d6 Kontrolle	4,5	14,0			2,2	2,1	13,3				22,7	39,7	9,5	46,0	2,2	15,6
d6 Zymosan	64,2		30,8	105,2		6,5	34,9									48,3
d6 Poly(I:C)	27,3		348,1	37,5		3,6	24,3				80,8	25,7	863,6	36,8	8,5	145,6
d6 LPS	169,7		52,9	97,2		10,5	679,2				7146,5	9616,9	1771,0	1047,8	2309,3	2290,1
d6 Flagellin	304,2		9,3	151,2		6,1	794,5									253,1
d6 Malp2	52,4		16,9	13,7		21,6										26,2
d6 Loxoribin	8,7		9,1	36,3		1,4										13,9
d6 R848	21,4		13,5	15,0		1,7					3136,5	19567,1	3597,0	268,8	5639,6	3584,5
d6 ODN	3,9	7,0	6,5		2,4	2,2	21,3									7,2
d6 HKUEC	35,5		202,7	18,3		7,5										66,0
d6 Kombi	2490,3	6012,3			548,7	779,2	5000,0				14675,3	25179,5	18458,6	3557,5	16298,1	9299,9
d6 Poly/R848	2550,3	20110,2	21996	458,1	6748,4											10372,7
d6 LPS/R848	13780	25179,5	15490	3958,8	20780,7											15837,7
d6 PamCys	77,0	4,3	3,7	13,7		39,1	21,3									26,5
d6 Cordycepin	4,7		6,1	23,7		1,9										9,1
TNF α	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	CB15	MW
d7 Kontrolle	33,8	17,7		193,0	17,9	15,3	16,4	0,0	601,3	11,9						100,8
d7 Zymosan	20,9	27,9							9,6	6,1						16,1
d7 Poly(I:C)	8,6	6,7		26,8	2,3	226,9	15,3	0,0	4,4	5,7						33,0
d7 LPS	215,5	4049,9		2854,6	3789,4	476,5	394,7	877,9	134,4	509,3						1478,0
d7 Flagellin	346,0	638,0							31,3	33,1						262,1
d7 Malp2		57,0							15,6	2,7						25,1
d7 Loxoribin		32,0							15,5	0,0						15,8
d7 R848		30,4		408,8	15700,5	2236,8	103,4	3807,7	135,8	9,1						2804,1
d7 ODN	54,1	15,7							5,1	10,1						21,3
d7 HKUEC																#DIV/0!
d7 Kombi	4480,0	7480,3		12482,9	21033,8	13293,7	4629,4	21540,9	6320,1	5002,9						10696,0
d7 Poly/R848	855,6	10521,5	16646	157,7	5695,8											6775,3
d7 LPS/R848	855,6	10521,5	16646	157,7	5695,8											6775,3
d7 PamCys	15,5															15,5
d7 Cordycepin		11,8							4,0	1,1						5,6

7.2.2.1. Stimulation unreifer plasmazytoider dendritischer Zellen

Daten zu *Abbildung 3.32*; [pg/ml] Interferon α (IFN α)

Adult

	ABI	ABII	ABIII	ABIV	ABV	MW	Abw
Kontrolle	246	0	89	80	24	88,1	86
CpG A	2.860	5.214	4.008	6.178	969	3.845,8	1821
CpG B	163	172	395	154	727	322,2	221
	CBI	CBII	CBIII	CBIV	CBV	MW	Abw
Kontrolle	100	10	0	46,18	0	31,1	38
CpG A	301	704	6.044	3.680	94	2.164,6	2334
CpG B	52	115	229	106	19	104,0	71

Daten zu *Abbildung 3.33*; [pg/ml] Inflammatorische Zytokine

Adult

IL-1b	ABI	ABII	ABIII	ABIV	ABV	ABVI	ABVII	MW	Abw
Kontrolle		38,6	7	0	8,7	10,2	8,9	12,2	12,2
CpG A	433,1	25,7	39,3	0	7,7	16,2	12,2	76,3	146,1
CpG B	1232,6	20,5	40,5	0	6,1	23,1	10,5	190,5	425,6
IL-6	ABI	ABII	ABIII	ABIV	ABV	ABVI	ABVII	MW	Abw
Kontrolle		1253	80,9	16,7	80,9	366,3	116,4	319,0	432,1
CpG A	6099	973,9	1448,4	170,4	146,9	741,4	874,6	1493,5	1927,1
CpG B	10092,6	1384,5	1448,4	85,6	79,4	599,9	945,7	2090,9	3306,7
IL-8	ABI	ABII	ABIII	ABIV	ABV	ABVI	ABVII	MW	Abw
Kontrolle		16149,5	6225	1094,4	3235,2	9001,5	7352,7	7176,4	4783,8
CpG A	17201,6	11896,9	11071	1766,5	2109	7254	6450,6	8249,9	5146,0
CpG B	18154,3	16445,7	15031	2710	5588,2	10873,5	5951,4	10679,2	5604,6
IL-10	ABI	ABII	ABIII	ABIV	ABV	ABVI	ABVII	MW	Abw
Kontrolle		39,6	2,7	0	0	2,5	3,7	8,1	14,2
CpG A	211,4	32,5	29	2,2	1,8	3,1	41	45,9	69,2
CpG B	154,6	38,6	6,5	0	2,1	2,3	125,8	47,1	60,6
IL-12p70	ABI	ABII	ABIII	ABIV	ABV	ABVI	ABVII	MW	Abw
Kontrolle	0	1,5	0	0	0	0	0	0,2	0,5
CpG A	0	0	0	0	0	0	0	0,0	0,0
CpG B	6,4	0	0	0	0	0	0	0,9	2,2
TNFα	ABI	ABII	ABIII	ABIV	ABV	ABVI	ABVII	MW	Abw
Kontrolle		9,4	1,4	0	3,5	3,8	3,2	3,6	2,9
CpG A	329,2	50	171	227,1	106,8	22,1	184,2	155,8	98,3
CpG B	569,2	82,5	17,2	63,1	41,4	21,3	81,7	125,2	182,9

Daten zu *Abbildung 3.33.*; [pg/ml] Inflammatorische Zytokine Neonatal

IL-1b	CBI	CBII	CBIII	CBIV	CBV	MW	Abw
Kontrolle	7,8	2,1	5	24,4	10,5	10,0	7,7
CpG A	19,7	5,9	3,3	23,4	24,7	15,4	9,0
CpG B	7,3	8	19,7	46,9	13,3	19,0	14,6
IL-6	CBI	CBII	CBIII	CBIV	CBV	MW	Abw
Kontrolle	84,4	144,9	143,5	816,9	254,2	288,8	269,7
CpG A	442,4	217	172	1151,6	883,1	573,2	383,5
CpG B	192,3	224,2	446,6	2267,6	430	712,1	784,6
IL-8	CBI	CBII	CBIII	CBIV	CBV	MW	Abw
Kontrolle	4752,8	8301,8	9415,2	13614,4	12556,9	9728,2	3162,0
CpG A	9246,7	8684,1	6253,7	12332,1	14499,1	10203,1	2891,6
CpG B	7587,5	9415,2	10873,5	15441,2	15511,7	11765,8	3203,7
IL-10	CBI	CBII	CBIII	CBIV	CBV	MW	Abw
Kontrolle	0	3,4	0	1,6	3,9	1,8	1,6
CpG A	4,2	1,1	4,4	28,1	17,6	11,1	10,2
CpG B	24,6	3,5	20	52,2	3,8	20,8	17,8
IL-12p70	CBI	CBII	CBIII	CBIV	CBV	MW	Abw
Kontrolle	0	0	0	0	0	0,0	0,0
CpG A	0	0	0	0	0	0,0	0,0
CpG B	0	0	0	0	0	0,0	0,0
TNFa	CBI	CBII	CBIII	CBIV	CBV	MW	Abw
Kontrolle	2,1	6,8	15,7	2,8	88,2	23,1	32,9
CpG A	9,8	12,2	73,8	60,2	44,9	40,2	25,5
CpG B	10,2	14	75,9	40,6	34,6	35,1	23,5

7.2.3. Signaltransduktion in stimulierten dendritischen Zellen

Daten zu *Abbildung 3.34*; [MFI] Phosphorylierung der p38 MAPK

	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	MW	Abwn	CB!	CB2	CB3	CB4	MW	Abwn
PMA 1000 10min	78	83	65	113	76	70	84	81,3	14,4	116	123	85	95	104,8	15,4
R848 10min			62	83	66	63	84	71,6	9,8	93	107	77	97	93,5	10,8
R848 30min			66	91	67	64	85	74,6	11,1	98	103	84	101	96,5	7,4
R848 60min			85	80	62	55	97	75,8	15,3	92	106	88	114	100,0	10,5
R848 120min			50	83	57	58	98	69,2	18,2	88	110	119	100	104,3	11,5
R848 240min			86	80	50	57	81	70,8	14,4	87	90	105	92	93,5	6,9
LPS 10min	62			87	67	59	88	72,6	12,4	88	107	72	96	90,8	12,8
LPS 30min	67			92	59	65	93	75,2	14,4	97	102	76	99	93,5	10,3
LPS 60min	76			80	73	56	115	80,0	19,3	93	124	102	111	107,5	11,5
LPS 120min	68			94	58	53	108	76,2	21,3	93	114	113	110	107,5	8,5
LPS 240min	72			100	54	51	95	74,4	20,2	100	106	119	104	107,3	7,1
Poly 10min				81	56	53	76	66,5	12,2	84	100	67	91	85,5	12,1
Poly 30min				74	56	57	77	66,0	9,6	84	91	76	90	85,3	6,0
Poly 60min				74	61	51	85	67,8	12,9	82	101	74	92	87,3	10,2
Poly 120min				68	60	44	82	63,5	13,7	79	97	91	106	93,3	9,8
Poly 240min				67	40	50	69	56,5	12,1	78	103	89	87	89,3	9,0
R848/LPS 10min		92		76	61	58	74	72,2	12,1	85	109	68	93	88,8	14,8
R848/LPS 30min		102		84	56	63	83	77,6	16,4	92	107	74	95	92,0	11,8
R848/LPS 60min		92		77	62	53	95	75,8	16,4	88	113	90	103	98,5	10,2
R848/LPS 120min		97		90	53	36	91	73,4	24,3	84	99	90	110	95,8	9,8
R848/LPS 240min		102		77	46	57	75	71,4	19,1	82	101	91	95	92,3	6,9
R848/Poly 10min				73	54	52	74	63,3	10,3	90	108	65	84	86,8	15,4
R848/Poly 30min				73	51	55	71	62,5	9,6	70	98	68	87	80,8	12,4
R848/Poly 60min				79	53	53	78	65,8	12,8	85	106	70	89	87,5	12,8
R848/Poly 120min				74	54	44	94	66,5	19,2	81	99	83	96	89,8	7,9
R848/Poly 240min				74	41	50	69	58,5	13,5	76	92	118	91	94,3	15,1
unstimuliert 10min	55	76	58	87	71	62	82	70,1	11,4	92	108	68	99	91,8	14,8
unstimuliert 30min					74	65	81	73,3	6,5		109	77	99	95,0	13,4
unstimuliert 60min					74	59	107	80,0	20,0		110	84	105	99,7	11,3
unstimuliert 120min					71	49	103	74,3	22,2		103	106	105	104,7	1,2
unstimuliert 240min					60	53	100	71,0	20,7		101	105	110	105,3	3,7
Kontrolle						63	70	66,5	3,5			66	91	78,5	12,5

Daten zu *Abbildung 3.35*; [MFI] Phosphorylierung von ERK1/2

	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	MW	Abwn	CB1	CB2	CB3	CB4	MW	Abwn
PMA 1000 10min	842	1006	1106	496	575	550	762,5	236,3	917	376	545	400	559,5	216,3
R848 10min		126	141	186	99	121	134,6	29,0	121	106	94	119	110,0	10,9
R848 30min		276	242	222	199	135	214,8	47,2	203	107	162	141	153,3	34,8
R848 60min		157	196	231	29	186	159,8	69,5	194	154	159	137	161,0	20,7
R848 120min		160	149	208	78	138	146,6	41,8	102	89	138	113	110,5	18,0
R848 240min		607	127	131	95	114	214,8	196,5	148	95	152	88	120,8	29,4
LPS 10min	201		190	196	103	119	161,8	41,9	140	104	89	105	109,5	18,7
LPS 30min	272		339	236	160	140	229,4	73,0	220	97	96	122	133,8	50,9
LPS 60min	234		210	440	211	165	252,0	96,6	114	148	129	121	128,0	12,7
LPS 120min	172		162	179	101	153	153,4	27,6	129	81	131	106	111,8	20,3
LPS 240min	134		125	134	105	128	125,2	10,7	127	50	138	84	99,8	35,1
Poly 10min			138	146	96	107	121,8	20,8	97	88	85	132	100,5	18,7
Poly 30min			177	150	121	124	143,0	22,6	128	76	102	114	105,0	19,1
Poly 60min			248	205	148	136	184,3	45,1	184	109	165	119	144,3	31,2
Poly 120min			117	203	174	136	157,5	33,3	150	77	113	127	116,8	26,5
Poly 240min			78	107	118	111	103,5	15,2	128	59	106	126	104,8	27,8
R848/LPS 10min			129	175	123	118	136,3	22,7	141	161	93	118	128,3	25,4
R848/LPS 30min			306	177	189	133	201,3	64,0	168	80	117	155	130,0	34,4
R848/LPS 60min			183	279	126	127	178,8	62,3	127	154	159	128	142,0	14,6
R848/LPS 120min			163	131	77	118	122,3	30,8	137	76	111	110	108,5	21,7
R848/LPS 240min			119	116	88	94	104,3	13,5	81	53	115	88	84,3	22,1
R848/Poly 10min			135	123	46	92	99,0	34,4	121	77	78	111	96,8	19,6
R848/Poly 30min			204	125	76	110	128,8	46,9	192	68	98	84	110,5	48,2
R848/Poly 60min			169	160	192	131	163,0	21,9	145	82	116	115	114,5	22,3
R848/Poly 120min			103	203	84	119	127,3	45,5	116	65	105	96	95,5	19,0
R848/Poly 240min			102	93	89	93	94,3	4,8	77	48	191	68	96,0	55,8
unstimuliert 10min	173	151	182	215	137	93	158,5	38,2	117	92	79	105	98,3	14,2
unstimuliert 30min				183	174	106	154,3	34,4		83	105	93	93,7	9,0
unstimuliert 60min				248	142	148	179,3	48,6		119	122	114	118,3	3,3
unstimuliert 120min				207	135	123	155,0	37,1		106	106	80	97,3	12,3
unstimuliert 240min				176	129	109	138,0	28,1		92	127	111	110,0	14,3
Kontrolle					93	83	88,0	5,0			61	92	76,5	15,5

Daten zu *Abbildung 3.36* [MFI] Phosphorylierung von STAT1

	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	MW	Abwn	CB1	CB2	CB3	CB4	MW	Abwn
IFNg 10min	105	38	213	239	115	126	226	151,7	69,7	219	154	188	200	190,3	23,7
LPS 10min	84			173	113	114	285	153,8	71,7	200	137	158	150	161,3	23,6
LPS 30min	80			187	117	119	408	182,2	118,1	192	122	219	185	179,5	35,5
LPS 60min	136			216	111	112	717	258,4	232,5	189	194	347	154	221,0	74,4
LPS 120min	106			239	136	141	595	243,4	181,4	220	220	283	185	227,0	35,3
LPS 240min	120			231	92	120	374	187,4	104,8	172	252	182	122	182,0	46,4
R848 10min		38		192	106	125	241	140,4	70,3	144	140	170	179	158,3	16,6
R848 30min		39		164	117	94	338	150,4	102,1	179	146	226	173	181,0	28,8
R848 60min		46		159	91	110	527	186,6	174,0	224	202	372	193	247,8	72,6
R848 120min		60		201	136	134	554	217,0	174,3	225	230	331	186	243,0	53,6
R848 240min		35		189	93	136	296	149,8	88,9	262	255	197	143	214,3	48,3
R848/LPS 10min			178	137	110	97	204	145,2	40,4	176	127	152	170	156,3	19,1
R848/LPS 30min			212	134	100	86	267	159,8	69,1	165	128	173	149	153,8	17,2
R848/LPS 60min			225	204	108	118	396	210,2	103,7	158	136	197	140	157,8	24,1
R848/LPS 120min			277	217	156	115	407	234,4	102,3	146	197	337	176	214,0	73,3
R848/LPS 240min			219	218	82	125	254	179,6	64,9	174	193	151	151	167,3	17,6
Poly 10min				169	92	98	231	147,5	56,9	154	115	148	162	144,8	17,9
Poly 30min				159	97	90	226	143,0	54,9	162	107	217	163	162,3	38,9
Poly 60min				112	94	101	394	175,3	126,5	226	167	322	198	228,3	58,0
Poly 120min				184	129	92	398	200,8	118,5	201	184	376	158	229,8	85,8
Poly 240min				197	74	125	276	168,0	76,1	198	215	176	130	179,8	31,9
R848/Poly 10min				125	104	100	210	134,8	44,5	147	104	126	155	133,0	19,8
R848/Poly 30min				118	101	73	201	123,3	47,7	175	98	147	151	142,8	28,0
R848/Poly 60min				172	84	91	263	152,5	72,6	185	100	202	141	157,0	39,7
R848/Poly 120min				188	117	122	634	265,3	214,7	144	207	189	143	170,8	28,0
R848/Poly 240min				176	129	96	222	155,8	47,7	163	155	138	82	134,5	31,6
unstimuliert 10min	70	40	46	58	124	113	307	108,3	86,4	170	161	147	174	163,0	10,4
unstimuliert 30min					133	105	545	261,0	201,1		203	188	190	193,7	6,6
unstimuliert 60min					110	125	643	292,7	247,8		194	275	179	216,0	42,2
unstimuliert 120min					142	123	621	295,3	230,4		266	257	180	234,3	38,6
unstimuliert 240min					113	122	357	197,3	113,0		291	218	150	219,7	57,6
Kontrolle						85	97	91,0	6,0		128	134,7		131,4	3,3

7.2.4. Kombinierte Zellkulturen

7.2.4.1. Allogene DC-T-Zellkultur

Daten zu *Abbildung 3.37.*; 3.38 [cpm]

1 zu 10							1 zu 100						
1 zu 10	AB1	AB2	AB3	AB4	MW	Abw	1 zu 100	AB1	AB2	AB3	AB4	MW	Abw
Kontrolle	104065	89987	79049	78220	87830,3	10460	Kontrolle	32579	25480	29314	26200	28393,3	2814
Zymosan	99224	91607	92645	84352	91957,0	5274	Zymosan	36194	36655	34111	32320	34820,0	1733
Poly(I:C)	64602	45169	42129	48088	49997,0	8691	Poly(I:C)	7432	6429	7395	16964	9555,0	4296
LPS	111273	76605	86909	86013	90200,0	12819	LPS	38624	45725	43135	40218	41925,5	2726
Flagellin	75381	70719	70078	64298	70119,0	3935	Flagellin	58906	46299	38923	48378	48126,5	7147
Loxoribin	86379	69945	73788	87143	79313,8	7575	Loxoribin	40470	36055	32367	34212	35776,0	3007
R848	104640	65761	65793	72302	77124,0	16108	R848	6217	22711	12914	8621	12615,8	6303
ODN	91729	93692	73446	67546	81603,3	11323	ODN	32943	32034	40821	31522	34330,0	3782
Cordycepin	110047	94684	85452	81199	92845,5	11063	Cordycepin	48521	48397	51118	37568	46401,0	5214
Kombination	76313	59492	62136	55940	63470,3	7734	Kombination	61843	52279	54461	63762	58086,3	4827
1 zu 10	CB1	CB2	CB3	CB4	MW	Abw	1 zu 100	CB1	CB2	CB3	CB4	MW	Abw
Kontrolle	101692	94132	97980		97934,7	3087	Kontrolle	102426	96238	77425	88724	91203,3	9318
Zymosan	97005	110845	110853	97699	104100,5	6753	Zymosan	84321	86455	82916	84477	84542,3	1261
Poly(I:C)	112494	93276	87630		97800,0	10643	Poly(I:C)	97045	83250	85385	67330	83252,5	10587
LPS	77975	81354	87371		82233,3	3886	LPS	68433	79790	57196		68473,0	9224
Flagellin	103203	103353			103278,0	75	Flagellin					#DIV/0!	#DIV/0!
Loxoribin	110552	108361	101441		106784,7	3883	Loxoribin	93387	77159	94676	93359	89645,3	7229
R848	100219	96018			98118,5	2101	R848	100115	94331	92701	93642	95197,3	2898
ODN	117708	104603	111964		111425,0	5364	ODN	71975	77886	86500		78787,0	5964
Cordycepin	75153	66636	75284		72357,7	4046	Cordycepin	75670	96578	69578	91360	83296,5	11043
Kombination	75701	75715	64907		72107,7	5092	Kombination	73517	60378	66623	66942	66865,0	4647

Daten zu *Abbildung 3.39.*; [pg/ml]

IL-5

CB 3d	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	MW	Abw
ohne CD3			1,2											1,2	0,0
Kontrolle	387,9	99,8	150,6	291,6	458,7	140,4	21,8	57,9	136,5	124,9	149,9	68,9	14,5	161,8	131,1
LPS	978,8	132,9	169	402,1	501,5									436,9	304,4
ssRNA	452,5	155	92,7	345,7	433,5									295,9	146,3
Poly(I:C)	386,1	164,2	60,7	248,1	320,5									235,9	114,6
ssRNA/LPS	654,6	138,1	101,2	129,2	350,7	135,2	151,3	81,1	166,9	174	158,5	244,9	115,3	200,1	147,1
ssRNA/Poly	436,2	142,1	79,3	437,6	405,9									300,2	156,4
AB 3d	AB1	AB2	AB3											MW	Abw
ohne CD3	1,2													1,2	0,0
Kontrolle	232,8	663,7	216,8											371,1	207,0
LPS	240,7	755,7	277,5											424,6	234,6
ssRNA	156,5	540,9	214,7											304,0	169,2
Poly(I:C)	215,7	530,9												373,3	157,6
ssRNA/LPS	186	604,8	223,1											338,0	189,3
ssRNA/Poly	158	572	186											305,3	188,9

Daten zu *Abbildung 3.39*; [pg/ml]

IL-10

CB 3d	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	MW	Abw
ohne CD3			101,2											101,2	0,0
Kontrolle	1601,7	1923,8	1400,8	707,9	1020,7	485,4	319,5	461	670,1	101	80,8	670,1	79,2	732,5	573,0
LPS	940,9	2548,1	1110,7	608,6	962,2									1234,1	677,2
ssRNA	1562	2506,5	1173,6	632,8	1167,5									1408,5	623,6
Poly(I:C)	1473,1	2270,3	3507,5	1640,6	1825,5									2143,4	732,1
ssRNA/LPS	1287,8	2445,3	1343,1	2852,7	1695,5	570,8	528,7	222,9	410,2	461	88,2	113,8	846,4	989,7	854,5
ssRNA/Poly	1770,3	2966,2	3947,3	590,3	1064,6									2067,7	1234,3
AB 3d	AB1	AB2	AB3											MW	Abw
ohne CD3	302,4													302,4	0,0
Kontrolle	2743,8	6706	1939,8											3796,5	2083,3
LPS	5285,7	6312,9	3774,5											5124,4	1042,6
ssRNA	4094,5	6925,4	3206,1											4742,0	1585,9
Poly(I:C)	7326,5	10474,7												8900,6	1574,1
ssRNA/LPS	7151,9	5437,4	4334,1											5641,1	1159,3
ssRNA/Poly	8672	7812,9	4914,5											7133,1	1607,5

Daten zu *Abbildung 3.39.*; [pg/ml]TNF α

CB 3d	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	CB13	CB14	MW	Abw
ohne CD3			40												40,0	0,0
Kontrolle	5910,9	6529	7495,3	5529,6	7540,2	7148,7	5865,6	2340,4	4119,7	4119,7	4437,9	4171,9			5434,1	1550,7
LPS	7960,8	8064,2	8168,9	5773,7	6514,7										7296,5	971,8
ssRNA	6040,2	6472,8	5235,3	4711	5674,8										5626,8	613,3
Poly(I:C)	6092,7	7691,4	7960,8	4772,7	6403,4										6584,2	1155,6
ssRNA/LPS	6817,1	6995,8	8675,3	5976,6	6080,6	12712,4	13907,6	12826,3	7647,6	9970,6	6773,4	10337,5	10714,4	12942,3	9455,5	2727,5
ssRNA/Poly	7056,4	8274,9	8901,7	5159,8	5388										6956,2	1498,0
AB 3d	AB1	AB2	AB3												MW	Abw
ohne CD3	204,3														204,3	0,0
Kontrolle	12416,9	15408,9	7757,9												11861,2	3148,1
LPS	17953,9	16408,7	15408,9												16590,5	1046,9
ssRNA	14998,7	17010,7	11047												14352,1	2477,2
Poly(I:C)	17397,3	13831,1													15614,2	1783,1
ssRNA/LPS	17953,9	14082,7	13462,9												15166,5	1987,2
ssRNA/Poly	5270,4	14274,7	11450,6												10331,9	3760,1

Daten zu *Abbildung 3.39.*; [pg/ml] IFNg

CB 3d	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	MW	Abw
ohne CD3			80,7										80,7	0,0
Kontrolle	1489,3	1349,3	1373,8	255,2	462,3	1175,8	324,6	39,2	733,6	358,4	64,8	385	667,6	513,6
LPS	3955,8	2277,1	2441,9	419,8	538,7								1926,7	1319,3
ssRNA	1571,3	1289,8	779,4	600,6	496,7								947,6	414,3
Poly(I:C)	2086	1476	2179,6	451,3	942,9								1427,2	661,7
ssRNA/LPS	2484,8	1961,3	12152,6	973,6	2065,6	10193,5	11665	4557,5	3897,8	5529,6	12367,7	602,2	5704,3	4399,8
ssRNA/Poly	2179,6	1386,2	3032,9	302,4	623,7								1505,0	1002,7
AB 3d	AB1	AB2	AB3										MW	Abw
ohne CD3	2584,1												2584,1	0,0
Kontrolle	23225,3	23858,3	10811,6										19298,4	6006,6
LPS	17104,2	19398,9	5363,6										13955,6	6147,2
ssRNA	13908,7	8371,5	8616,5										10298,9	2554,5
Poly(I:C)	23858,3	19398,9	264,4										14507,2	10234,4
ssRNA/LPS	7934,2	8406,1	6949,1										7763,1	607,0
ssRNA/Poly	9278,5	7739,8	6777,9										7932,1	1029,9

Daten zu *Abbildung 3.40.*; [pg/ml]

IL-2, IL-4, IL-5

IL-2	Kontrolle	CpG A	CpG B	CpGA+CD40L	CpGB+CD40L	CD40L
AB1	3959,6	3459,9	3337,6	3219,7	2689,6	4179,2
AB2	4491,0	4410,9	4491,0	4371,4	4332,3	4450,8
AB3	4371,4			4293,5	4410,9	4293,5
AB4	4293,5	4274,2	4511,3	4430,8		
AB5	4255,1	4160,5	4274,2	4217,0	4141,8	4332,3
AB6	4293,5	4179,2	4067,9			
AB7	4255,1	4255,1	4491,0	4332,3	4371,4	4255,1
AB8	4179,2	4293,5	4255,1	4255,1	4179,2	4332,3
AB9	4450,8	4293,5	4293,5	4217,0	4179,2	4179,2
AB10	4198,0	4255,1		4217,0	4141,8	4217,0
AB11	4179,2	4332,3	4450,8	4410,9	4255,1	4293,5
MW	4266,0	4191,4	4241,4	4196,5	4077,9	4281,4
Abwn	138,6	253,0	348,4	334,4	499,9	81,6
CB1	4293,5	4179,2	4141,8	4179,2	4332,3	4332,3
CB2	4293,5	4332,3	4274,2	4217,0	4332,3	4351,8
CB3	4293,5	4430,8	4450,8	4274,2	4332,3	4179,2
CB4	4332,3	4450,8	4332,3	4371,4	4351,8	4312,9
CB5	3367,8		3428,9	2942,7	3785,5	3651,7
CB6	4371,4	4371,4	4371,4	4332,3	4410,9	4332,3
MW	4158,7	4352,9	4166,6	4052,8	4257,5	4193,4
Abwn	354,8	96,5	343,2	500,6	212,9	248,8
IL-4	Kontrolle	CpG A	CpG B	CpGA+CD40L	CpGB+CD40L	CD40L
AB1	90,5	86,3	61,8	58,8	80,8	105,1
AB2	2759,5	2289,6	2372,4	2663,0	2821,6	2239,4
AB3	2604,4			1217,1	2200,0	4375,0
AB4	2013,4	1497,3	1628,3	1763,1		
AB5	1960,6	1778,8	2209,8	1755,4	1124,3	1842,8
AB6	773,4	951,1	1109,6			
AB7	517,9	393,7	583,4	430,1	560,7	705,1
AB8	711,3	910,2	1497,3	833,5	1238,7	724,0
AB9	1943,3	1329,2	1503,9	1249,7	1464,7	1701,9
AB10	363,5	376,6		370,0	478,3	341,6
AB11	249,9	702,0	1642,8	822,6	1599,8	373,3
MW	1271,6	1031,5	1401,0	1116,3	1285,4	1378,7
Abwn	946,8	656,2	689,2	745,6	815,4	1274,9
CB1	106,6	121,9	114,3	120,8	128,3	118,6
CB2	125,9	239,0	262,5	190,8	288,4	128,8
CB3	101,7	142,5	117,5	150,6	110,1	87,9
CB4	103,1	114,3	107,6	100,3	98,4	105,1
CB5	125,3		168,0	55,0	106,1	197,8
CB6	112,2	130,0	128,8	126,5	129,4	86,3
MW	112,5	149,5	149,8	124,0	143,4	120,8
Abwn	9,9	45,7	54,1	41,9	65,8	37,7
IL-5	Kontrolle	CpG A	CpG B	CpGA+CD40L	CpGB+CD40L	CD40L
AB1	11,4	3,3	6,9	2,0	2,7	14,3
AB2	978,0	494,4	891,3	525,1	804,3	607,8
AB3	1029,9			217,9	421,3	2614,2
AB4	900,5	377,6	309,9	479,7		
AB5	829,4	586,7	711,5	760,3	313,0	1029,9
AB6	220,1	270,1	211,7			
AB7	447,3	237,9	183,1	243,8	270,1	764,1
AB8	259,7	244,9	292,1	257,2	190,3	228,8
AB9	1154,5	748,7	655,8	704,2	704,2	1019,3
AB10	27,9	54,0		34,9	27,6	38,7
AB11	569,2	530,4	928,8	623,4	779,9	479,7
MW	584,3	354,8	465,7	384,9	390,4	755,2
Abwn	397,0	225,1	316,5	257,2	291,5	748,2
CB1	132,1	68,8	84,6	124,8	190,3	316,1
CB2	33,7	38,7	28,8	16,3	19,1	27,2
CB3	6,0	5,6	4,6	4,6	5,3	9,4
CB4	9,9	3,1	8,0	1,5	9,7	5,7
CB5	7,3		73,5	6,3	4,0	51,1
CB6	8,2	5,8	14,1	3,8	6,0	8,0
MW	32,9	24,4	35,6	26,2	39,1	69,6
Abwn	45,4	25,8	31,8	44,3	67,8	111,3

Daten zu *Abbildung 3.40.*; [pg/ml]IL-10, TNF α , IFN γ

IL-10	Kontrolle	CpG A	CpG B	CpGA+CD40L	CpGB+CD40L	CD40L
AB1	377,9	717,6	1013,7	817,3	3443,4	564,6
AB2	5529,1	5731,6	2649,3	6738,9	2241,0	6159,2
AB3	6678,6			5680,3	4831,5	3002,3
AB4	6242,9	6327,7	3803,4	6678,6		
AB5	10101,2	6923,2	4269,8	6985,8	3619,0	7677,7
AB6	10854,8	7574,8	4486,4			
AB7	1633,9	1647,8	898,7	1902,1	1026,8	687,1
AB8	14217,0	12201,2	10010,7	12201,2	9149,6	13230,0
AB9	12092,0	9399,9	6738,9	9876,6	7373,1	11151,7
AB10	9315,7	8514,4		6861,2	4733,1	8747,2
AB11	11983,7	13111,5	10757,6	13170,6	10565,8	12648,2
MW	8093,3	7215,0	4958,7	7091,3	5220,4	7096,4
Abwn	4210,7	3775,0	3362,1	3734,5	3004,1	4586,6
CB1	2051,8	3169,1	1058,1	3303,5	1533,3	1627,0
CB2	1095,1	7241,7	681,2	5333,7	1321,4	1310,2
CB3	1282,6	10192,4	1599,6	8747,2	467,4	853,3
CB4	5455,0	9484,8	1854,6	9067,7	2051,8	2989,8
CB5	6271,1		2069,1	9570,5	2797,0	6214,9
CB6	1142,9	8176,6	2157,9	9315,7	6618,8	358,3
MW	2883,1	7652,9	1570,1	7556,4	2465,0	2225,6
Abwn	2143,6	2463,9	536,8	2376,3	1987,5	1960,6
TNF α	Kontrolle	CpG A	CpG B	CpGA+CD40L	CpGB+CD40L	CD40L
AB1	2684,5	2051,0	1389,4	1158,2	2393,7	4206,3
AB2	18484,4	11372,8	13923,8	10117,8	12331,7	12899,0
AB3	17671,5			10027,2	12669,0	17592,2
AB4	18989,9	11170,0	9164,7	10394,5		
AB5	15441,1	8683,2	8566,8	9937,4	5588,2	10583,2
AB6	10394,5	10394,5	8880,7			
AB7	10209,2	6511,5	5059,4	7319,2	5563,1	8761,6
AB8	18989,9	16006,8	18318,9	15302,9	15441,1	18989,9
AB9	13737,2	9415,3	8008,0	8880,7	9164,7	11789,4
AB10	6872,5	5439,4		4841,8	5428,1	7124,3
AB11	18989,9	18735,4	18989,9	18989,9	18989,9	18989,9
MW	13860,4	9978,0	10255,7	9697,0	9730,0	12326,2
Abwn	5363,4	4626,3	5490,9	4705,5	5174,0	5009,9
CB1	5538,2	5333,5	3435,5	5333,5	4906,1	7156,4
CB2	13015,5	11949,5	7621,5	10488,4	10027,2	12783,5
CB3	5951,4	8605,4	4927,7	6997,3	3955,0	6811,0
CB4	7124,3	5978,2	4757,4	4453,8	4434,2	6750,0
CB5	1271,4		1420,6	653,9	878,7	1953,7
CB6	11789,4	8153,3	9760,2	8376,3	10117,8	8227,0
MW	7448,4	8004,0	5320,5	6050,5	5719,8	7280,3
Abwn	3957,8	2331,8	2715,4	3114,2	3335,7	3164,1
IFN γ	Kontrolle	CpG A	CpG B	CpGA+CD40L	CpGB+CD40L	CD40L
AB1	15624,5	14409,5	10708,8	12037,2	9965,4	22592,4
AB2	22694,2	23420,0	23420,0	24497,3	19043,3	23420,0
AB3				21405,4	20099,3	20929,5
AB4	19652,4	22390,1	22592,4	23420,0		
AB5	20835,6	22796,5	21892,2	22592,4	21990,9	21990,9
AB6	23631,6	20742,1	23631,6			
AB7	22390,1	22189,6	23525,5	23952,6	22390,1	20464,1
AB8	15072,3	16790,2	19389,0	17562,5	20099,3	15208,5
AB9	24169,0	24060,5	19043,3	22491,0	21213,8	23845,1
AB10	22796,5	23631,6		24060,5	25167,3	22592,4
AB11	21213,8	18957,9	19302,0	18703,8	17801,1	18536,3
MW	20808,0	20938,8	20389,4	21072,3	19752,3	21064,3
Abwn	3009,2	3067,2	3863,7	3721,1	3996,7	2579,2
CB1	7958,6	22289,6	2046,4	19302,0	3317,0	7274,0
CB2	3919,4	20649,0	1335,1	23002,4	2504,6	10055,4
CB3	7406,0	22592,4	7816,7	23210,3	2284,0	4631,8
CB4	8552,4	22189,6	6985,5	19043,3	6860,9	4242,0
CB5	20099,3		8629,6	19740,9	16196,8	15765,6
CB6	18205,9	23210,3	16343,2	22796,5	23002,4	7144,3
MW	11023,6	22186,2	7192,8	21182,6	9027,6	8185,5
Abwn	5958,3	847,0	4950,1	1835,7	7874,3	3895,5

Daten zu *Abbildung 3.42.*: [fg/ μ l Aktin mRNA]

TLR mRNA

TLR1	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	Median
Monos	0,3047	0,1659	0,4307	2,9067	0,5461	0,9382	0,4884
imDC	0,6533	7,6850		0,0000	0,0570	0,2538	0,2538
	CB1	CB2	CB3	CB5	CB6	CB7	Median
Monos	0,5440	1,5320	0,5612	1,4565	0,3518	0,3854	0,5526
imDC	0,4244	0,4272	0,4107	0,0737	0,0229	0,1197	0,2652
TLR2	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	Median
Monos	15,1525	7,1368	0,6463	194,6050	11,1564	5,0313	9,1466
imDC	1,1483	450,9755		467,8709		0,2817	226,0619
	CB1	CB2	CB3	CB5	CB6	CB7	Median
Monos	15,0945	12,8417	5,6414	82,8751	18,3888	77,2307	16,7417
imDC	72,9009	1,8151	2,6392	0,6693	80,7588	0,5635	2,2271
TLR3	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	Median
Monos	0	0	0	0	0	0	0,0000
imDC	0	0		0	0	0	0,0000
	CB1	CB2	CB3	CB5	CB6	CB7	Median
Monos	0	0	0	0	0	0	0,0000
imDC	0	0	0	0	0	0	0,0000
TLR4	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	Median
Monos	0,3819	2,5626			0,2321	0,3367	0,3593
imDC	16,4942			0	0	0	0,0000
	CB1	CB2	CB3	CB5	CB6	CB7	Median
Monos		2,8927	4,7092	31,7526	5,511	44,1623	5,511
imDC	47,4349	0,626	2,9524	0,5334	5,0288	0,7516	1,852
TLR7	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	Median
Monos	55,4574	19,4208	0,0389			7,5359	13,4784
imDC	0,0007					0	0,0004
	CB1	CB2	CB3	CB5	CB6	CB7	Median
Monos	55,4305	167,9018	54,3215	34,2096	19,2428	7,3825	44,26555
imDC	0,1193	0,1257	0,8005	0,0022		0,0358	0,1193
TLR8	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	Median
Monos	0,0116	0,0267			0,0259	0,0347	0,0263
imDC	0,0262				0,0067		0,0165
	CB1	CB2	CB3	CB5	CB6	CB7	Median
Monos	0,02813	0,2	0,0141	0,0974	0,049	0,0208	0,038565
imDC		0,007	0,0073	0,0007	0	0,0008	0,0008
TLR10	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	Median
Monos	20,5146	13,2267	0,0225	250,0688	0,372		13,2267
imDC	0,0089					0	0,0045
	CB1	CB2	CB3	CB5	CB6	CB7	Median
Monos	10,3204	3,6691	31,05	56,9187	58,5824	36,0228	33,5364
imDC	156,678	0,0147	4,0236	0,3926	101,7052	0	2,2081

Daten zu *Abbildung 3.43.*; [fg/ μ l Aktin mRNA]

TLR mRNA

TLR2	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	MW
Kontrolle	2,7635	0,9473	1,4479	0,1934	0,02395	1,0854			1,0769
Zymosan	0,5995	2,859	1,5957	0,0943	0,1952	0,1823			0,9210
Zymosan/LPS	2,563	1,286	1,047	0,47	0,0947	0,9734			1,0724
	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	MW
Kontrolle	2,5273	4,682	3,6486		1,947	6,8746			3,9359
Zymosan	8,2654	14,2940	12,3948	10,0376	6,2837	15,7253			11,1668
Zymosan/LPS	2,4736	3,948	4,2634	5,2763	1,502	5,9283			3,8986
	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	MW
Kontrolle	1,4733	4,4046	3,3452		1,6289	8,2307			3,8165
LPS	0,1955	2,729	0,6157	0,0843	0,2352	0,1619			0,6703
LPS/IFNγ	1,785	0,7689	1,7007	0,2312	0,1993	1,4809	0,9956	0,7139	1,0231
LPS/ssRNA	0,0499	0,0799	0,1231	0,2483	0,1221	0,0248			0,1080
	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	MW
Kontrolle	0,0577				0,0007	0,4986			0,1857
ssRNA	0,0675	0	0,00055	0,001	0,0074	0			0,0127
ssRNA/LPS	0,133	0,0006	0,0282	0,0045	0,0912	0			0,0429
	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	MW
Kontrolle	0,4638	0,2929	0,6424	0,5975	0,0973	1,5685			0,6104
ssRNA	0,0022	0,0041	0,0014	0,0009	0,0004	0,0013			0,0017
ssRNA/LPS	0,0075	0,0241	0,0069	0,014	0,0074	0,002			0,0103

Daten zu *Abbildung 3.44.*; [fg/ μ l Aktin mRNA]

IL-27p28 und EB13 mRNA

p28 AB	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	MW	Abw
Monos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
imDC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
LPS	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
LPS+IFNg	0,2546	0,1229				0,5605		0,567	0,3602	0,6722		0,4229	0,1933
LPS+ssRNA	0	0		0	0,4591	0						0,0918	0,1836
ssRNA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
p28 CB	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	MW	Abw
Monos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
imDC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
LPS	0	0	0	0,0038	0	0	0	0,0021	0	0	0,1292	0,0123	0,0370
LPS+IFNg		6,0302	0,1058		1,7868	1,4077	1,2903	2,7818	3,1564	0,9102		2,1837	1,7174
LPS+ssRNA	0,0488	0	0	0	0	0,01399						0,0105	0,0179
ssRNA	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
EB13 AB	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	MW	Abw
Monos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
imDC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
LPS	7,0637			0	0,2857	0			0	0		1,2249	2,6133
LPS+IFNg	730,3	530,6		159,9	107,6	53,38		147,1	725,7	161,4		326,9975	267,8105
LPS+ssRNA	309,7385	0,137		1,3183	124,5652							108,9398	126,4760
ssRNA	1,3123	0	0,9638	0	0,0474	0						0,3873	0,5406
EB13 CB	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	MW	Abw
Monos	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
imDC	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
Kontrolle	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		0	0
LPS	0,1353	5,3902	0	5,9768	0,0036	0,0529	0	3,7102	0	0,0123	11,6972	2,4526	3,6831
LPS+IFNg	53,08	483,4	691,2	154,5	1510	2840	830,8	1943	27,43	947,6	1969	1040,9100	874,2024
LPS+ssRNA	17,5167	0,131	0,5168	0,1362	23,5117	2,9632						7,4626	9,4391
ssRNA	0,2919	0	0,7559	0,0587	0,2941	0,072						0,2454	0,2550

Daten zu *Abbildung 3.45.*; [fg/ μ l Aktin mRNA]

WSX-1 mRNA in DC

WSX1 DC	AB1	AB2	AB3	AB4	AB5	AB6	AB7	AB8	AB9	AB10	AB11	AB12	MW	Abw
monocytes	204	191,9	18	1239									413,23	557,0
imDC3d	98,5	48,3	5,9	280,2	138	440	5,03	809	8050	5,1	69		904,46	2382,6
5d ctrl	58,1	14,1	4,4	114,78	3,7	2300	34	1,2	69000	0,8	15000		7866,46	20762,0
LPS	60,4	12,5	0,07	69,4	31	110	5,5	0,05	4900	100	7200		1135,36	2484,0
LPS/IFNg	139,4	27	3,2	72,3	66	300	1,2	0,51	3300	21	6700		966,42	2136,0
ssRNA					170	110	12	0,65	19000	18	130		2777,24	7153,9
LPS/ssRNA					810	0,53	0,25	0,27	3100	11	580		643,15	1133,4
WSX1 DC	CB1	CB2	CB3	CB4	CB5	CB6	CB7	CB8	CB9	CB10	CB11	CB12	MW	Abw
monocytes	238,9	109,6	355,9	576	3168								889,68	1285,1
imDC3d	105,6	579,8	233,6	604,9	1003,1	390	110	130	4,7	37	1800		454,43	540,8
5d ctrl	206,1	801,4	140,5	630,7	371,2	0,0085	99	52	100	160	110000	4100	9721,74	31599,7
LPS	84	591,5	149,5	365,1	609,3	28	140	640	0,091	0,56	9200	2300	1175,67	2605,2
LPS/IFNg	207,6	669,6	186,6	210,7	377,4	0,0029	500	39	0,3	1	2600	1700	541,02	803,5
ssRNA						17	520	290	0,058	310	4000	1500	948,15	1438,1
LPS/ssRNA						11	133	740		41	2700	2500	1020,83	1253,4

Daten zu *Abbildung 3.45.*; [fg/ μ l Aktin mRNA]

WSX-1 mRNA in T-Zellen

	WSX-1		WSX-1		<i>students t-test</i>
AB1	5,9849	CB1	6,8348		<i>T value</i> -3,287780
AB2	5,145	CB2	13,2952		<i>P value</i> 0,009412
AB3	7,8403	CB3	13,8451		<i>Degrees of Freedom</i> 9
AB4	6,285	CB4	18,7017		
AB5	7,5925	CB5	11,5482		
AB6	8,3639	CB6			

7.3. Accession numbers

mRNA	<i>Accession number</i>
TLR1	NM_003263
TLR2	NM_003264
TLR3	NM_003265
TLR4	NM_138554
TLR5	NM_003268
TLR6	NM_006068
TLR7	NM_016562
TLR8	NM_016610
TLR9	NM_017442
TLR10	NM_030956
Aktin	NM_001101
PDH	NM_000284
IL-27	NM_145659
EBI3	NM_005755
WSX-1 (IL-27 Rezeptor A)	NM_004843

Eigene Publikationen

Artikel:

Krumbiegel D, Rohr J, Schmidtke P, Knuf M, Zepp F, Meyer CU. Efficient maturation and cytokine production of neonatal DCs requires combined proinflammatory signals. *Clin Dev Immunol* 2005;12:99-105.

Krumbiegel D, Zepp F, Meyer CU. Combined Toll-like receptor agonists synergistically increase production of inflammatory cytokines in human neonatal dendritic cells. *Hum Immunol* 2007; *accepted*

Vorträge:

Krumbiegel D, Schmidtke P, Winter J. Der Th1-/Th2-CBA in der Praxis. Seminar: Neue Methoden zum Zytokinnachweis am FACS. 18. Oktober 2002, Mainz

Krumbiegel D, Meyer CU. Dendritische Zellen (DC) aus Neugeborenen zeigen verglichen mit DC aus Erwachsenen grundlegend andere Expressionsmuster für IL-12, IL-23 und IL-27. Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft Pädiatrische Immunologie 18. - 20. Mai 2007, Ittingen, Schweiz

Poster:

Krumbiegel D, Adam A, Schattenberg K, Rohr J, Zepp F, Meyer CU. Maturation of Neonatal DCs by Combined Stimulation with Pathogen-associated Molecular Patterns (PAMPs). 8th International Symposium on Dendritic Cells 17. – 21. Oktober 2004, Brügge, Belgien

Krumbiegel D, Lorenz N, Zepp F, Meyer CU. Differential Maturation of Neonatal and Adult Monocyte-derived Dendritic Cells after Stimulation with TLR-Ligands. Tagung: Frontiers in Neonatal and Infant Immunity 18. - 20. März 2005, Madrid, Spanien

Krumbiegel D, Zhou X, Zepp F, Meyer CU. Different Sources of IL-10 in Adults and Newborns. 16th European Congress of Immunology 06. – 09. September 2006, Paris, Frankreich

Krumbiegel D, Anthogalidis-Voss C, Knuf M, Zepp F, Meyer CU. Combination of TLR4-Ligand LPS and IFN γ triggers IL-27 Expression in Newborn and Adult DC. 9th International Conference on Dendritic Cells 16. – 20. September 2006, Edinburgh, Großbritannien

