

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. WOLFGANG HERR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

INDUKTION TOLEROGENER DENDRITISCHER ZELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION ZUR ERLANGUNG
DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN

DER
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Marta Arturovna Penttinen

aus Leningrad

2015

meiner Mutter

AUS DEM LEHRSTUHL FÜR INNERE MEDIZIN III
PROF. DR. WOLFGANG HERR
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

INDUKTION TOLEROGENER DENDRITISCHER ZELLEN

INAUGURAL-DISSERTATION ZUR ERLANGUNG
DES DOKTORGRADES DER MEDIZIN

DER
FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von

Marta Arturovna Penttinen

aus Leningrad

2015

Dekan	Prof. Dr. Dr. Torsten Reichert
1. Berichterstatter	Prof. Dr. Marina Kreutz
2. Berichterstatter	Prof. Dr. Sigrid Karrer
Tag der mündlichen Prüfung	11. Mai 2015

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	viii
Tabellenverzeichnis	x
1 Einleitung	1
1.1 Das Immunsystem	1
1.1.1 Antigenpräsentierende Zellen	2
1.1.1.1 Reifung dendritischer Zellen (DCs)	2
1.1.1.2 Funktion reifer dendritischer Zellen	4
1.1.2 „ <i>Pathogen Recognition</i> “-Rezeptoren	6
1.2 Graft-versus-Host Reaktion (GvHD)	9
1.2.1 Rolle von dendritischen Zellen in der GvHD	10
1.2.1.1 Modulation der GvHD durch TLRs und NOD2	10
1.2.2 Vitamin D ₃ und seine Wirkung auf die GvHD	11
1.2.3 Vitamin A und seine Wirkung auf die GvHD	12
1.2.4 Die Effekte von TGF- β auf das Immunsystem und die GvHD	13
2 Zielsetzung	15
3 Material	16
3.1 Geräte	16
3.2 Verbrauchsmaterial	17
3.3 Chemikalien	18
3.4 Inhibitoren, Enzyme und Kits	19
3.5 Software und Datenbanken	19
3.6 Antikörper	20
3.6.1 Western Blot	20
3.6.2 Durchflusszytometrie	20
3.6.3 Oligonukleotide	21
4 Methoden	22
4.1 Zellbiologische Methoden	22
4.1.1 Gewinnung humaner Monozyten	22

4.1.2	Waschen und Ernten	23
4.1.3	Bestimmung der Zellzahl	23
4.1.4	Differenzierung humaner dendritischer Zellen	23
4.1.5	Reifung humaner dendritischer Zellen	24
4.2	Proteinbiochemische Methoden	24
4.2.1	Isolierung von Proteinen	24
4.2.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	25
4.2.3	Western Blot	27
4.2.4	Immunfärbung von Western Blots	28
4.2.5	Densitometrische Auswertung der Western Blots	30
4.3	Immunologische Methoden	30
4.3.1	Bestimmung von Zytokinen im Zellkulturüberstand	30
4.3.2	Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)	30
4.3.3	Durchflusszytometrie	31
4.3.3.1	Aldehyddehydrogenasefärbung	31
4.3.3.2	Analyse von T-Lymphozyten	32
4.3.3.2.1	Oberflächenantigenfärbung	33
4.3.3.2.2	Intrazelluläre FOXP3-Färbung	34
4.3.3.2.3	Intrazelluläre Zytokinfärbung	34
4.4	Molekularbiologische Methoden	34
4.4.1	Isolierung RNA	34
4.4.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	35
4.4.2.1	Reverse Transkription	35
4.4.2.2	„ <i>real time</i> “ quantitative PCR	36
4.4.2.2.1	Reaktionsansatz von RT-qPCR	36
4.5	Statistische Auswertung	37
5	Ergebnisse	38
5.1	Einfluss bakterieller Bestandteile auf die Funktion dendritischer Zellen	38
5.1.1	Zytokinanalysen	38
5.1.2	Zytokinanalysen unter TGF- β -Einfluss	41
5.1.3	Untersuchung der Signalwege bakterieller Liganden	43
5.1.4	Analyse der Genexpression in dendritischen Zellen	46
5.1.5	Aktivität von Aldehyddehydrogenasen	48
5.2	Analyse der allogenen T-Zell-Antwort	50
5.2.1	Analysen der T-Zell-Proliferation	50
5.2.1.1	DC-vermittelte T-Zell-Proliferation in Abhängigkeit von bakteriellen Liganden und Vitaminvorstufen	50

5.2.1.2	Einfluss von TGF- β auf die T-Zell-Proliferation . . .	52
5.2.2	Der Einfluss von Vitaminvorstufen auf T-Zelldifferenzierung unter An- und Abwesenheit von TGF- β	53
6	Diskussion	57
6.1	Einfluss bakterieller Liganden auf die Reifung dendritischer Zellen . .	57
6.2	Vitamin A/D-Metabolismus in humanen dendritischen Zellen und sein Einfluss auf die T-Zell-Antwort	59
6.3	Einfluss von TGF- β auf dendritische Zellen	62
7	Zusammenfassung	64
	Literatur	67
8	Anhang	87
8.1	Danksagung	87
8.2	Eidesstaatliche Erklärung	89

Abbildungsverzeichnis

1.1	Hämato- und Lymphopoese	1
1.2	Einfluss dendritischer Zellen auf die T-Zell-Differenzierung	5
1.3	TLRs und NOD2 sowie ihre Liganden	6
1.4	TLR- und NOD2-Signalwege	8
5.1	IL-12- und IL-10-Sekretion nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen	39
5.2	IL-6-, IL-8 und TNF-Sekretion nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen	40
5.3	IL-10- und IL-12-Sekretion in Abhängigkeit von der An- und Abwesenheit von TGF- β bei der Kultivierung von DCs	42
5.4	IL6-, IL-8 und TNF-Sekretion dendritischer Zellen unter TGF- β -Einfluss	43
5.5	Einfluss von TLR- und NOD2-Liganden auf die Expression von I κ B α	44
5.6	Einfluss von TLR- und NOD2-Liganden auf die Expression von phospho-p38	45
5.7	Einfluss von TLR- und NOD2-Liganden auf die Expression von phospho-Akt	46
5.8	Genexpression der Retin-Aldehyddehydrogenasen in reifen DCs in An- und Abwesenheit von TGF- β	47
5.9	Kinetik der Retin-Aldehyddehydrogenasen-Aktivität	49
5.10	T-Zell-Proliferation in Abhängigkeit von unterschiedlich gereifter DCs bei An- und Abwesenheit von Vitaminmetaboliten	51
5.11	Mit TGF- β kultivierte DCs inhibieren die T-Zell-Proliferation	52
5.12	Durchflusszytometrische Analyse von T-Zellen	53
5.13	TGF- β -behandelte DCs erhöhen den Anteil FOXP3 ⁺ Zellen und supprimieren den Anteil IL-2 ⁺ sowie IFN- γ ⁺ CD4 ⁺ T-Zellen	54
5.14	TGF- β -behandelte DCs erniedrigen den Anteil von IL-2 ⁺ und IFN- γ ⁺ CD8 ⁺ T-Zellen	55
5.15	Der Effekt von TGF- β auf die Differenzierung von T _{reg} Zellen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe	56

7.1 Kultivierung reifer und tolerogener DCs und ihr Effekt in der Interaktion mit naiven T-Zellen 65

Tabellenverzeichnis

4.1	Elutriationsparameter und die daraus gewonnenen Zelltypen	23
-----	---	----

Abkürzungsverzeichnis

1,25(OH) ₂ Vitamin D ₃	1,25 Dihydroxyvitamin D ₃
25(OH) Vitamin D ₃	25 Hydroxyvitamin D ₃
³ H-Thymidin	Tritium-Thymidin
AB-Serum	Serum von Blutspendern mit Blutgruppe AB
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
ALDH	Aldehyddehydrogenase
APC	Antigenpräsentierende Zelle (<i>antigen-presenting cell</i>)
APC	Allo-Phyco-Cyanin
BAA	BODIPY TM - Aminoacetat
BAAA	BODIPY TM - Aminoacetaldehyd
BAAA-DA	BODIPY TM - Aminoacetaldehyd- Diethylacetat
BMDCs	aus dem Knochenmark abstammende dendritische Zellen (<i>bone marrow-derived dendritic cells</i>)
CARD	Caspase-Rekrutierungsdomäne (<i>caspase recruitment domain</i>)
CD	Differenzierungs-Cluster (<i>cluster of differentiation</i>)
cDNA	komplementäre DNA (<i>copy DNA</i>)
cpm	Impulse pro Minute
DC	dendritische Zelle (<i>dendritic cell</i>)
DEAB	Diethylaminobenzaldehyd
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribonukleotidsäure (<i>desoxyribonucleic acid</i>)
dNTPs	2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphate
ECL	erhöhte Chemilumineszenz (<i>enhanced chemiluminescence</i>)
ELISA	Enzymgekoppelter Immunabsorptionstest (<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
FACS	Fluoreszenz-aktivierte Zellsortierung (<i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FCS	fetales Kälberserum (<i>fetal calf serum</i>)
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
Flag	Flagellin
FOXP3	„Forkhead“-Box-Protein 3
GM-CSF	Granulozyten/Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor (<i>granulocyte/makrophage stimulating factor</i>)

GvHD	Transplantat-gegen-Wirt Erkrankung (<i>Graft-versus-Host disease</i>)
HLA	Humanes Leukozyten-Antigen (<i>human leukocyte antigen</i>)
HRP-konjugiert	<i>Horseradish peroxidase</i> -konjugiert
HSZT	hämapoetische Stammzelltransplantation
iDC	unreife dendritische Zelle (<i>immature dendritic cell</i>)
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin
IgG _{ges.}	IgG _{gesamt}
I κ B	Inhibitor von NF κ B
IL	Interleukin
KMT	Knochenmarktransplantation
LPS	Lipopolysaccharid
LCs	Langerhans-Zellen (<i> langerhans cells</i>)
M	Mol
MAP-Kinase	Mitogen-aktivierte Proteinkinase (<i>mitogen-activated proteine kinase</i>)
mDC	reife dendritische Zelle (<i>mature dendritic cell</i>)
MDP	Muramyldipeptid
MHC	Haupthistokompatibilitätsantigen (<i>major histocompatibility complex</i>)
min	Minute
MLR	Gemischte Leukozytenreaktion (<i>mixed lymphocyte reaction</i>)
M-MLV	muriner Leukämie-Virus, Moloney-Stamm
MNCs	mononukleäre Blutzellen (<i>mononuclear cells</i>)
moDCs	von Monozyten abstammende dendritische Zellen (<i>monocyte-derived dendritic cells</i>)
MOPS	3-(N-Morpholino)Propansulfonsäure
mRNA	<i>messenger</i> RNA
NF κ B	Nukleärer Faktor κ B
NLR	Nukleotidbindungs-Oligomerisationsdomänen-ähnlicher (<i>NOD-like</i>) Rezeptor
NOD	Nukleotidbindungs-Oligomerisationsdomänen-enthaltendes Protein (<i>nucleotide-binding oligomerisation domain-containing protein</i>)
P-Akt	Phospho-Akt, Proteinkinase B
PAMP	Pathogen-assoziiertes molekulares Muster (<i>pathogen-associated molecular patterns</i>)
PBMCs	periphere mononukleäre Blutzellen (<i>peripheral blood mononuclear cells</i>)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PE	Phycoerythrin

PE-Cy7	Phycoerythrin-Cychrom 7
PFA	Paraformaldehyd
PMA	Phorbol 12-Myristat 13-Acetat
PVDF	Polyvinylidendifluorid
RA	Retinsäure (<i>retinoic acid</i>)
RALDH	Retin-Aldehyddehydrogenase
RAR	Retinsäure-Rezeptor (<i>retinoic acid receptor</i>)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPMI	Kulturmedium, <i>Roswell Park Memorial Institute</i>
RT	reverse Transkription
RT-qPCR	quantitative Polymerasekettenreaktion in Echtzeit (<i>real-time quantitative polymerase chain reaction</i>)
RXR	Retinsäure X Rezeptor (<i>retinoic x receptor</i>)
s	Sekunde
SEM	<i>Standard Error of the Mean</i>
SNP	Einzelner Nukleotidpolymorphismus (<i>single nucleotid polymorphism</i>)
SZT	Stammzelltransplantation
T _{reg} -Zelle	regulatorische T-Zelle
T _H -Zelle	T-Helferzelle
TBST	<i>Tris-buffered saline (TBS) and Tween 20</i> -Puffer
tDCs	tolerogene dendritische Zellen
TGF- β	<i>transforming growth factor β</i>
TLR	Toll-ähnlicher Rezeptor (<i>Toll-like receptor</i>)
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
V450	FACS-Farbstoff, violett

1 Einleitung

1.1 Das Immunsystem

Immunität leitet sich aus dem Lateinischen (*immunitas*) ab und bedeutet das Frei-sein von Abgaben und Steuern [1]. Im medizinischen Sprachgebrauch bedeutet Immunität die Unempfänglichkeit gegenüber Krankheitserregern. Dieser Schutz wird vom Immunsystem gewährleistet, das sich aus unterschiedlichen Zellen und Molekülen zusammensetzt. Das Immunsystem wird in ein angeborenes sowie ein erworbenes bzw. adaptives unterteilt. Zusammen sichern beide Komponenten den Schutz des Körpers vor Pathogenen, also krankheitsauslösenden Mikroorganismen, sowie entarteten eigenen Zellen. Die Aufgabe des angeborenen Immunsystems ist die sofortige, jedoch unspezifische Bekämpfung von Krankheitserregern. Das adaptive Immunsystem bietet einen spezifischen Schutz gegen Krankheitserreger sowie ein immunologisches Gedächtnis [2, 3].

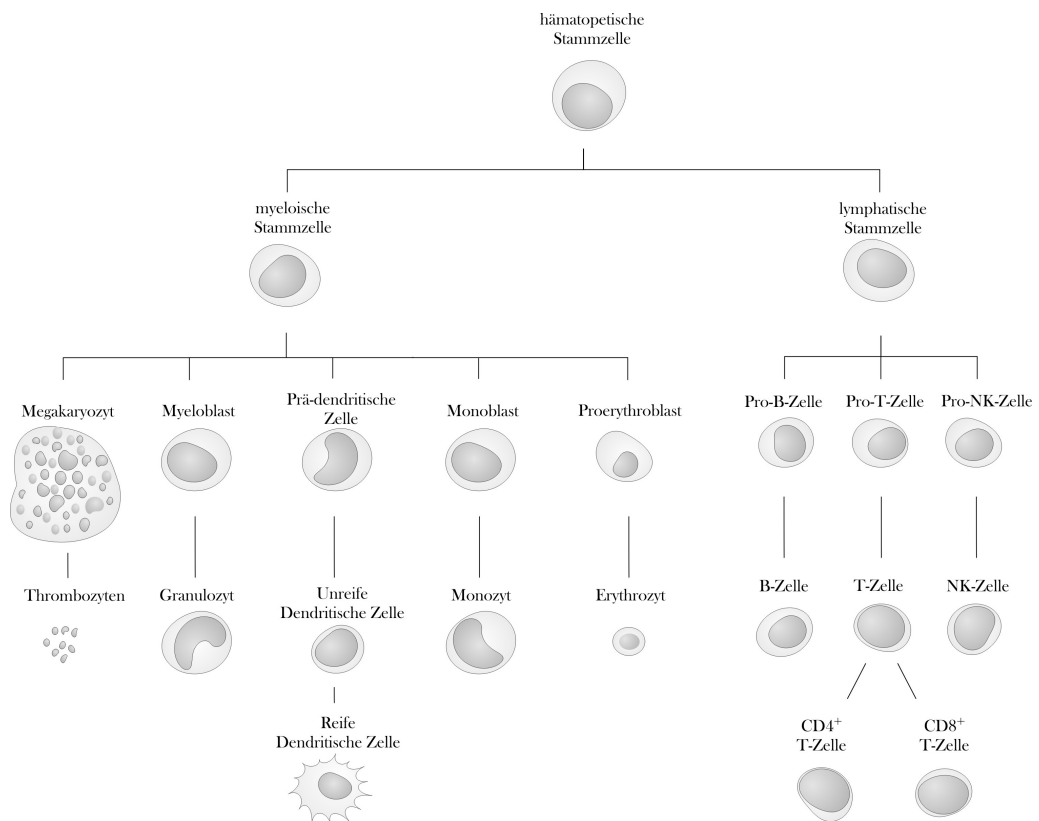


Abb. 1.1: Hämato- und Lymphopoese Abbildung nach [2], modifiziert.

Alle zellulären Bestandteile des Blutes entwickeln sich aus pluripotenten hämatopoetischen Stammzellen im Knochenmark, die sich in lymphatische und myeloische Vorläuferzellen teilen (Abb. 1.1). Aus lymphatischen Vorläuferzellen entwickeln sich Natürliche Killerzellen (NK-Zellen), B- und T-Lymphozyten (B- und T-Zellen). T-Lymphozyten werden in zwei Hauptklassen eingeteilt. Sie werden durch die Zelloberflächenglykoproteine *cluster of differentiation* (CD) 4 und 8 unterschieden. Das Oberflächenprotein CD4 markiert T-Helferzellen, die sich weiter in unterschiedliche Subpopulationen differenzieren können, CD8 ist auf der Oberfläche von zytotoxischen T-Zellen zu finden. Von myeloischen Vorläuferzellen stammen Granulozyten, Monozyten, Makrophagen, dendritische Zellen, Erythrozyten sowie Blutplättchen ab [2, 3].

1.1.1 Antigenpräsentierende Zellen

Zu den antigenpräsentierenden Zellen (*antigen-presenting cells*, APCs) zählen Monozyten, Makrophagen, B-Lymphozyten sowie dendritische Zellen. Sie stellen die Verbindung zwischen der angeborenen und erworbenen Immunantwort dar. APCs erkennen und prozessieren Pathogene und präsentieren deren Antigene über Haupt-histokompatibilitätskomplex- (*major histocompatibility complex*, MHC) II-Proteine den Zellen des adaptiven Immunsystems, die dadurch zur Differenzierung und Proliferation angeregt werden [2].

Dendritische Zellen (*dendritic cells*, DCs) sind die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen. Sie werden durch das Oberflächenantigen CD1a und die fehlenden CD-Marker für T- (CD3), B- (CD19), NK-Zellen (CD16) und Monozyten (CD14) charakterisiert. Überdies besitzen dendritische Zellen lange Plasmafortsätze (Dendriten), die dieser Zellgruppe ihren Namen gegeben haben. Während der Körper „infektionsfrei“ ist, ruhen dendritische Zellen in unterschiedlichen Geweben; man bezeichnet sie als unreif (*immature dendritic cells*, iDCs) [2]. Dendritische Zellen können *in vitro* aus humanen Monozyten durch die Stimulation mit IL-4 und *granulocyte/makrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) gewonnen werden, da eine Isolation aus humanem Blut nur bedingt möglich ist [4, 5].

1.1.1.1 Reifung dendritischer Zellen (DCs)

Mit Hilfe bestimmter Rezeptoren erkennen iDCs sogenannte pathogenassoziierte molekulare Muster (*pathogen-associated molecular patterns*, PAMPs) und körpereigene schädigungsassoziierte molekulare Muster (*damage-associated molecular patterns*, DAMPs). PAMPs und DAMPs werden durch diese mustererkennende Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRRs) gebunden und lösen unterschiedliche Signal-

kaskaden aus, die zur Reifung dendritischer Zellen führt (siehe Kapitel 1.1.2) [6]. Reife dendritische Zellen (*mature dendritic cells*, mDCs) sezernieren vermehrt Zytokine, die entweder pro- oder anti-inflammatorische Immunantworten begünstigen [7–10]. Des Weiteren werden durch den Kontakt mit bakteriellen Liganden die Reifungsmerkmale CD40, CD80, CD83 und CD86, unterschiedliche Chemokinrezeptoren, welche die Migration dendritischer Zellen in sekundäre lymphatische Organe regulieren, und Enzyme, beispielsweise Retin-Aldehyddehydrogenasen, erhöht exprimiert [11]. Außerdem wird die vermehrte Expression von MHC II-Proteinen induziert, die weitere gebundene Antigene präsentieren. Alternativ können iDCs durch den Kontakt zu inflammatorischen Zytokinen reifen [12]. mDCs aktivieren naive T-Lymphozyten und initiieren so eine spezifische Immunreaktion. Die Aktivierung wird durch die Erkennung des mit Antigen beladenen MHC II-Moleküls dendritischer Zellen durch den T-Zell-Rezeptor (*T-cell receptor*, TCR), kostimulatorische Oberflächenproteine (CD40, CD80, CD83, CD86) sowie durch DCs sezernierte Zytokine bewerkstelligt [2].

Reife dendritische Zellen synthetisieren Interleukin (IL-) 12, das eine pro-inflammatorische Reaktion bewirkt. Es induziert die Differenzierung von T-Helferzellen und Natürlichen Killerzellen, welche wichtig für die Abwehr von Krankheitserregern sind [13]. Weiterhin sezernieren mDCs die Zytokine TNF- α , IL-6 und IL-8, was die inflammatorische Immunantwort unterstützt [9, 14, 15].

Das von dendritischen Zellen ebenfalls sezernierte Interleukin 10 besitzt eine anti-inflammatorische Wirkung [16]. Es inhibiert die Zytokinsekretion und Effektorfunktionen bestimmter T-Helferzellen [17]. Des Weiteren inhibiert IL-10 die Sekretion der Interleukine 1 und 2 sowie Interferon- γ und unterdrückt die Aktivierung von T-Zellen [18]. Außerdem trägt es zum Abklingen einer Entzündungsantwort bei, indem es die Sekretion von IL-12 und TNF- α in aktivierten Immunzellen inhibiert [19–22].

Unter bestimmten Umständen entwickeln sich aus iDCs tolerogene dendritische Zellen (*tolerogenic dendritic cells*, tDCs). tDCs sind ein wesentlicher Bestandteil in der Erhaltung der peripheren Toleranz, da sie durch ihre Sekretion von IL-10 und der geringen Expression von Reifungsmerkmalen (MHC II, CD40, CD80, CD83 und CD86) der pro-inflammatorischen Immunantwort entgegen wirken [23]. Verschiedene Faktoren tragen zur Generierung tolerogener DCs bei, z.B. Interleukin 10, Vitamin D, Vitamin A sowie TGF- β [16, 24–27]. Interessant ist, dass gerade im Intestinaltrakt, wo die Toleranz gegen täglich aufgenommene körperfremde Stoffe entscheidend ist, eine hohe Menge an Vitamin A und TGF- β nachweisbar ist [28–30].

1.1.1.2 Funktion reifer dendritischer Zellen

Je nach Stimulus entwickeln sich reife oder tolerogene dendritische Zellen (siehe Kapitel 1.1.1.1). Diese beeinflussen die Differenzierung naiver $CD4^+$ T-Zellen zu unterschiedlichen T-Zell-Subpopulationen. Die wichtigsten T-Zell-Subpopulationen sind derzeit T-Helferzellen Typ 1 (T_H1 -Zellen), Typ 2 (T_H2 -Zellen), Typ 17 (T_H17 -Zellen) und regulatorische T-Zellen (*regulatory T-cells*, T_{regs}) (siehe Abbildung 1.2). Sie regulieren die Balance zwischen pro- und anti-inflammatorischer Immunantwort [2, 3].

T_H1 -Lymphozyten Das durch reife dendritische Zellen sezernierte IL-12 induziert die Differenzierung von T_H1 -Zellen. Diese sezernieren u.a. die Zytokine Interleukin 2, Tumornekrosefaktor sowie Interferon- γ [3].

T_H2 -Lymphozyten Die Differenzierung von T_H2 -Zellen wird durch IL-2 und IL-10 induziert. T_H2 -Zellen aktivieren über die Sekretion von IL-4, IL-5 und IL-13 B-Lymphozyten und eosinophile Granulozyten, die wichtig für die Parasitenabwehr sind. Des Weiteren sezernieren sie IL-10, was die Makrophagenfunktion und T_H1 -Immunantwort unterdrückt [31].

T_H17 -Lymphozyten T_H17 -Zellen differenzieren aus naiven $CD4^+$ T-Lymphozyten unter dem Einfluss von IL-1 β , IL-6, IL-21, IL-23 und TGF- β [32, 33]. Durch die Sekretion der Interleukine 17, 21 und 22 sind sie verantwortlich für die Rekrutierung, Aktivierung und Migration neutrophiler Granulozyten. Ferner induzieren T_H17 -Zellen die Differenzierung von B-, NK- und zytotoxischen $CD8^+$ T-Zellen [34]. Sie sind außerdem beteiligt an der Pathogenese vieler Autoimmunkrankheiten und inflammatorischer Erkrankungen [2, 35].

Regulatorische T-Lymphozyten Regulatorische T-Zellen (T_{reg}) spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation bzw. Modulation der Immunantwort und verhindern Autoimmunität [36, 37]. Es wird zwischen angeborenen (*naturally occurring regulatory T-cells*, nT_{regs}) und peripher induzierbaren (*inducible regulatory T-cells*, iT_{regs}) regulatorischen T-Zellen unterschieden [38]. iT_{regs} (im Folgenden auch T_{regs} genannt) können durch den direkten Einfluss von IL-10, Retinsäure sowie TGF- β aus naiven $CD4^+$ T-Zellen differenzieren [39]. Auch tolerogene dendritische Zellen können diese Differenzierung induzieren [40, 41]. Ihre immunsuppressive Funktion gewährleisten sie u.a. durch die Sekretion von TGF- β und IL-10 und die Modulation von reifen dendritischen Zellen, indem sie ihre Reifung und ihre Zytokinsekretion

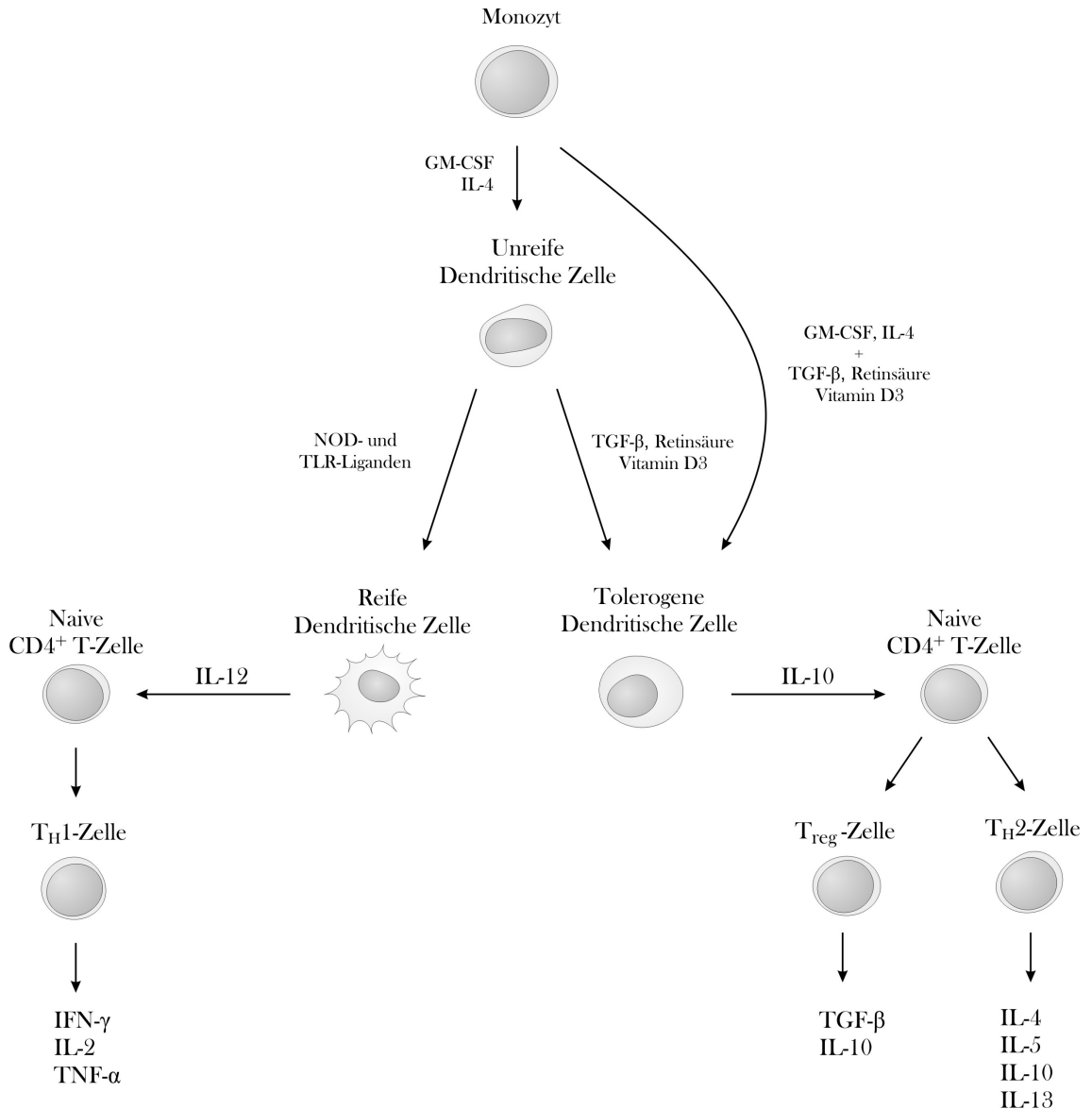


Abb. 1.2: Einfluss dendritischer Zellen auf die T-Zell-Differenzierung Aus Monozyten differenzierte DCs reifen durch den Kontakt zu bakteriellen Komponenten und sezernieren u.a. das pro-inflammatorische Zytokin IL-12. Hierdurch wird die Differenzierung von T_H1 -Zellen begünstigt, die ihrerseits die inflammatorischen Zytokine IFN- γ , IL-2 sowie TNF- α produzieren. Durch den Einfluss von TGF- β , Retinsäure bzw. Vitamin D können entweder aus unreifen DCs oder aber direkt aus Monozyten (mit GM-CSF und IL-4) tolerogene DCs entstehen, die vor allem über die Sekretion des anti-inflammatorischen IL-10 die Differenzierung von T_{reg} - sowie T_H2 -Zellen induzieren.

inhibieren. Überdies können T_{regs} andere Effektorzellen, wie T-Helferzellen, über direkte Zellkontakt-abhängige Mechanismen inhibieren [25, 42].

Je nach Reifung der APCs, präsentiertem Antigen und produzierten Zytokinen können unterschiedliche T-Zell-Populationen stimuliert werden. Dabei geht die Stimulation durch mDCs zumeist mit einer Aktivierung von T_H1 - und T_H17 -Zellen,

somit mit einer inflammatorischen Immunantwort, einher [43–45]. tDCs hingegen bewirken die Differenzierung von T_{reg} -Zellen [41].

1.1.2 „Pathogen Recognition“-Rezeptoren

Pathogene werden anhand von ihren Bestandteilen über mustererkennende Rezeptoren antigenpräsentierender Zellen erkannt. Diese sind in ihrer Spezifität genetisch festgelegt und erkennen Bestandteile von körperfremden oder körpereigenen Pathogenen. Es werden unterschiedliche Rezeptor-Typen beim Menschen beschrieben, davon sind Toll-ähnliche Rezeptoren („*Toll-like*“ receptors, TLRs) sowie Nukleotidbindungs-Oligomerisationsdomänen-ähnliche Rezeptoren (*NOD-like* receptors, NLRs) am besten erforscht [2, 44, 46–48].

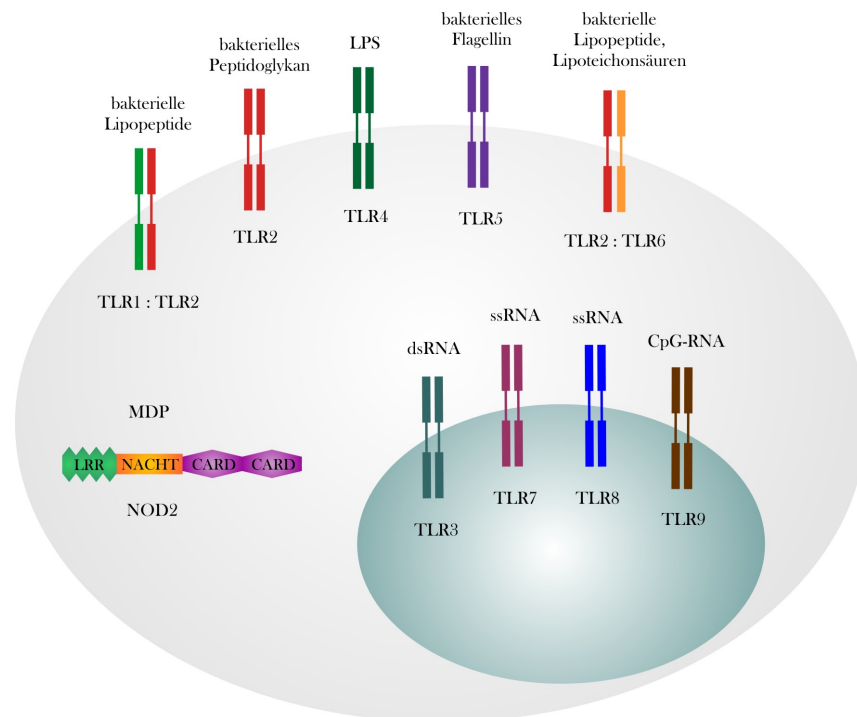


Abb. 1.3: TLRs und NOD2 sowie ihre Liganden Die dargestellten PRRs erkennen unterschiedliche Pathogenbestandteile. Je nach Rezeptortyp befinden sich TLRs entweder in der Plasmamembran oder in Membranen im Zellinneren. Durch die Bindung ihrer Liganden kommt es zur Homo- bzw. Heterodimerisierung der TLRs. Der intrazelluläre NOD2-Rezeptor erkennt Muramyldipeptid (MDP). Weitere Abkürzungen: LPS, Lipopolysaccharid; ds, doppelsträngig; ss, einzelsträngig; RNA, Ribonukleinsäure; DNA, Desoxyribonukleinsäure; CpG, Cytosin-Phosphat-Guanin. Abbildung nach [2], modifiziert.

TLRs TLRs sind von großer Bedeutung im angeborenen Immunsystem. Es existieren insgesamt elf humane TLRs, die sowohl auf der Zelloberfläche, als auch intrazellulär lokalisiert sind. Sie werden von unterschiedlichen hämatopoetischen Zellen, wie DCs, Makrophagen und T- und B-Zellen, aber auch von nicht-hämatopoetischen

Zellen wie Epithelien, Endothelien und Fibroblasten exprimiert [2, 46, 47]. TLRs erkennen strukturell unterschiedliche Komponenten von Mikroorganismen, wie Lipopolysaccharid (LPS), ein Molekül auf der äußeren Membran gramnegativer Bakterien, Flagellin (Flag), ein Bestandteil bakterieller Geißeln, und Lipoteichonsäure (*lipoteichoic acid*, LTA), ein Zellwand-Element grampositiver Bakterien. Des Weiteren können auch virale und fungoide Komponenten durch TLRs gebunden werden [2, 46, 47].

TLRs sind transmembrane Proteine, die nach der Bindung bakterieller Liganden durch eine Dimerisierung zu einer Rekrutierung intrazellulärer Adapterproteine führen [7, 8]. Über das Adapterprotein MyD88 werden unterschiedliche Signalkaskaden aktiviert. Der Transkriptionsfaktor $\text{NF}\kappa\text{B}$, der in unstimulierten Zellen an den Inhibitor von $\text{NF}\kappa\text{B}$ ($\text{I}\kappa\text{B}$) gebunden vorliegt, wird nach TLR-Stimulation aktiviert. $\text{I}\kappa\text{B}$ wird phosphoryliert und $\text{NF}\kappa\text{B}$ kann in den Nucleus diffundieren und an die DNA binden [8, 44, 46, 48, 49]. Überdies werden unterschiedliche Mitogen-aktivierte Protein- (*mitogen activated protein*, MAP-) Kinasen aktiviert, die zu einer Aktivierung bzw. Suppression bestimmter Transkriptionsfaktoren führen (z.B. AP-1). Zu diesen Kinasen zählen beispielsweise die p38-MAP-Kinase [50] und die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3K), die ihrerseits die Aktivierung der Proteinkinase B (Akt) vermittelt [8]. Die p38-MAP-Kinase spielt eine große Rolle in programmiertem Zelltod, Differenzierung, Proliferation und Inflammation [51]. Akt ist zuständig für sowohl pro-inflammatorische [52] als auch für anti-inflammatorische [53, 54] Effekte. Diese drei Signalwege sind in Abbildung 1.4 dargestellt.

Letztendlich führen diese drei Signalwege zur Genexpression unterschiedlicher Zytokine, können untereinander interagieren und somit die Immunantwort unterschiedlich stark beeinflussen [55].

NLRs Neben TLRs fungieren auch Nukleotidbindungs-Oligomerisationsdomänen-ähnliche Rezeptoren (*NOD-like receptors*, NLRs) als Sensoren für bakterielle Infektionen [56, 57]. Diese intrazellulären Proteine binden Bestandteile der bakteriellen Zellwand [58]. Über die Stimulation der NOD-Rezeptoren werden ebenfalls Signalkaskaden in Gang gesetzt, was zur Ausschüttung pro-inflammatorischer Zytokine und zur Modulation der Immunantwort führen kann [49]. Alle NLRs besitzen eine zentrale Nukleotidbindungs-Oligomerisationsdomäne (*nucleotide binding and oligomerization domain*, NOD- oder NACHT-Domäne) und eine Domäne mit Leucinreichen Wiederholungen (*leucine-rich repeat domain*, LRR) am C-terminalen Ende. N-terminal befindet sich bei NLRs eine Caspase aktivierende und rekrutierende Domäne (*caspase activation and recruitment domain*, CARD) [59, 60]. Muramyldipep-

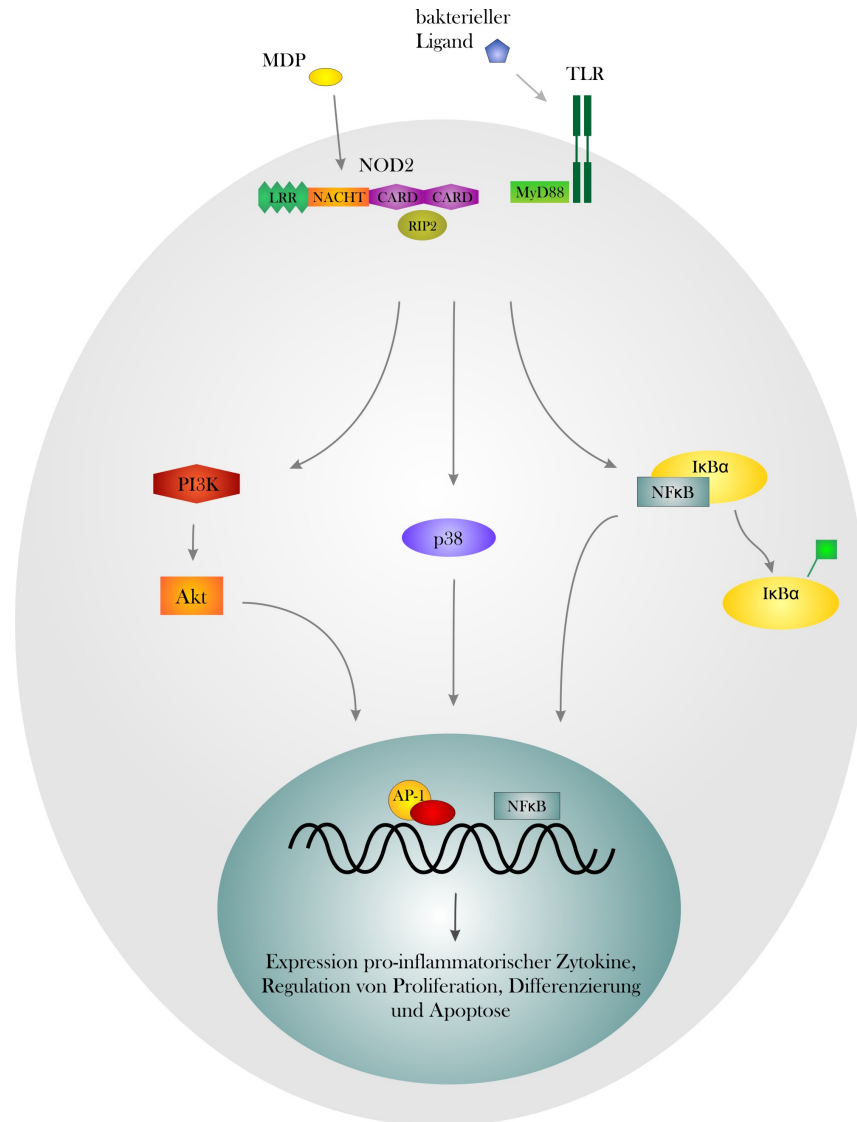


Abb. 1.4: TLR- und NOD2-Signalwege Die Bindung bakterieller Liganden bewirkt eine Dimerisierung des Toll-like Rezeptors und damit eine Rekrutierung von MyD88. MDP bindet an den NOD2-Rezeptor und bewirkt eine Konformationsänderung der CARD-Domäne. Die Konformationsänderung zieht die Rekrutierung von RIP2 nach sich. Beide Rezeptoren induzieren über ihre Adapterproteine die PI3K-, MAP-Kinase- und NFκB-Signalwege. Abbildung nach [46, 48] und [44], modifiziert.

tid (MDP) ist ein Bestandteil von Peptidoglykan, was sowohl von gramnegativen als auch grampositiven Bakterien produziert und vom NOD2-Rezeptor erkannt wird. MDP bewirkt nach Andocken eine Konformationsänderung der CARD, die eine Rekrutierung von *receptor-interacting protein kinase 2* (RIP2) nach sich zieht [61]. Dadurch kommt es zu MAP-Kinasen- und NFκB-Signalweg-vermittelten inflammatorischen Effekten [62, 63].

Interessant ist außerdem, dass TLRs und NODs untereinander interagieren und unterschiedliche Immunreaktionen auslösen können [64–67]. Magalhaes et al. konnten feststellen, dass der NOD2-Signalweg zu einer T_H2 -Immunantwort führt. Die Kosti-

mulation von NOD2-Liganden mit TLR2- oder TLR4-Liganden jedoch begünstigt eine T_H1 -Antwort [68].

1.2 Graft-versus-Host Reaktion (GvHD)

Die Graft-versus-Host Reaktion (*graft-versus-host disease*, GvHD, GvH-Reaktion) ist die bedeutendste Komplikation der Knochenmark- und Stammzelltransplantationen (KMT und SZT). Sie betrifft etwa 40% aller Patienten, die eine KMT oder SZT erhalten, und endet in bis zu 25% letal [69, 70]. Besonders betroffen sind Haut, Leber, Lunge und Darm. Gerade diese Organe haben ständigen Kontakt zu Bakterien [71]. Die häufigste und früheste Manifestation ist die Haut-GvHD mit einem makulopapulösen Ausschlag [70]. Die gastrointestinalen Symptome der Graft-versus-Host Reaktion sind Übelkeit und Erbrechen, Dyspepsie [72] sowie Diarrhö [73, 74]. Gerade die gastrointestinale Manifestation ist mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität durch die GvHD assoziiert [75]. Eine GvHD der Leber lässt sich anhand erhöhter Bilirubinwerte erkennen [76]. Pulmonale Infiltrate sind ebenfalls mögliche Folgen einer Stammzelltransplantation [77].

Pathophysiologisch wird die Graft-versus-Host Reaktion in fünf Stadien unterteilt [11]. Zu Beginn kommt es durch die Grunderkrankung sowie die Therapie (Polychemotherapie und/oder Radiatio) vor der allogenen Knochenmark- oder Stammzelltransplantation zu Gewebeschäden. Diese Schäden bewirken eine Translokation von bakteriellen Liganden, PAMPs, aus dem Darm ins Blut sowie die Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (u.a. Interleukin 1, Interleukin 6, $TNF-\alpha$) [78]. Gerade $TNF-\alpha$ steht in Zusammenhang mit der Inzidenz sowie Schwere der Graft-versus-Host Reaktion [9, 79–81]. Konsekutiv werden antigenpräsentierende Zellen aktiviert. Die durch den Kontakt zu PAMPs gereiften dendritischen Zellen aktivieren T-Zellen des Spenders [82–85].

Durch die T-Zell-Proliferation und -Differenzierung werden die Zytokine Interferon γ und Interleukin 2 ausgeschüttet, die mit einer T_H1 -Zell-Immunantwort assoziiert sind [82, 86]. Anschließend migrieren die aktivierten T-Zellen aus den sekundären lymphatischen Organen, in denen sie von reifen dendritischen Zellen aktiviert wurden, in die Zielorgane der Graft-versus-Host Reaktion [87]. Dort entfalten sie ihre zytotoxische Wirkung und es kommt zu Untergang des umliegenden Gewebes mit Freisetzung proinflammatorischer Moleküle, die die Entzündung verstärken und aufrechterhalten [88].

1.2.1 Rolle von dendritischen Zellen in der GvHD

Schon 1999 haben Shlomchik et al. die zentrale Rolle von dendritischen Zellen in der Initiation der Graft-versus-Host Reaktion festgestellt [89], was in den folgenden Jahren wiederholt bestätigt wurde [82, 83, 90]. Entscheidend hierbei ist wahrscheinlich die Aktivierung dendritischer Zellen durch Darmbakterien. Van Bekkum et al. haben schon vor 40 Jahren beobachtet, dass dekontaminierte oder unter keimfreien Umständen aufwachsende Mäuse nach einer Knochenmarktransplantation keine gastrointestinalen Läsionen im Sinne einer GvHD entwickelten, woraus folgt, dass der Kontakt mit bakteriellen Bestandteilen einen wesentlichen Beitrag zu Alloreaktivität leistet [91, 92]. Des Weiteren konnte 1988 festgestellt werden, dass eine antibiotische Dekontamination des Darmes vor einer Knochenmarktransplantation die Schwere einer Graft-versus-Host Reaktion drastisch reduziert [93]. Diese Erkenntnisse führten dazu, dass die Darmdekontamination zu einer Standardprozedur vor Knochenmark- und Stammzelltransplantationen wurde [94]. Andere Studien konnten zeigen, dass unreife und tolerogene dendritische Zellen eine essenzielle Rolle in der Toleranz einnehmen, indem sie T_{reg} -Zellen induzieren können [95–97]. Durch den Kontakt zu Bakterien im Darm wird also entschieden, ob eine alloreaktive oder eine tolerogene Reaktion folgt [82, 98].

1.2.1.1 Modulation der GvHD durch TLRs und NOD2

TLR-Signalwege können die Graft-versus-Host Reaktion sowohl aggravieren als auch abmildern. Wann und wodurch diese Wirkung erfolgt, ist noch weitestgehend ungeklärt; kritische Faktoren scheinen der Zeitpunkt der TLR-Stimulation sowie der betroffene Zelltyp zu sein [71]. Eine Antagonisierung von LPS ist mit einer Reduktion klinischer Symptome der GvHD sowie einem erhöhten Überleben in Mäusen assoziiert [99]. Holler et al. konnten in ihren Experimenten zeigen, dass die LPS-TNF-Achse als Hauptmechanismus zur Entstehung der GvH-Reaktion beiträgt [100]. Eine Graft-versus-Host Reaktion bei TLR4-knockout-Mäusen zeigt sich in Symptomen, Mortalität sowie histologischem Gewebeschaden deutlich reduziert [101]. Mäuse mit beschädigtem TLR2/4 und TLR9-Signalweg weisen eine geringere intestinale GvHD-Schwere auf [102]. Eine Vorbehandlung von Mäusen vor einer Stammzelltransplantation mit Flagellin, einem TLR5-Stimulus, führte in Experimenten von Hossain et al. zu einer weniger schweren GvHD sowie verbessertem Überleben [103]. Das könnte daran liegen, dass die wiederholte Stimulation mit bakteriellen Liganden zu einem verminderten Ansprechen auf bakterielle Komponenten führt [104]. Diverse Studien haben Mutationen im NOD2-Gen mit chronisch inflammatorischen gastrointestinalen Erkrankungen assoziiert [61, 105]. Auch eine verminderte NOD2-

Aktivität geht mit einer verstärkten intestinalen Inflammation einher [106]. Es wurde wiederholt gezeigt, dass bei NOD2-Defizienz im Empfänger die Inzidenz der Graft-versus-Host Reaktion erhöht ist und mit einer erhöhten Aktivität von antigenpräsentierenden und T-Zellen verknüpft ist [49, 107, 108]. Des Weiteren konnten Holler et al. sowie Elmaagacli et al. den Zusammenhang zwischen *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) im Genom für den NOD2-Rezeptor von sowohl Empfängern als auch Spendern mit einer erhöhten Mortalität durch die GvH-Reaktion zeigen [100, 109, 110]. Ferner wurden SNPs im NOD2-Gen mit geringeren Konzentrationen von CD4⁺ T-Zellen sowie erhöhter Sekretion inflammatorischer Zytokine über NFκB-Aktivierung und erniedrigter Produktion des immunmodulatorischen Zytokins IL-10 assoziiert [61, 111].

Andererseits gibt es zahlreiche Studien, die keine signifikante Assoziation zwischen dem NOD2-Gen und der Inzidenz von GvHD beobachten konnten [112–114]. Das lässt sich aber durch abweichende Behandlungsprotokolle sowie unterschiedliche Mutationen im NOD2-Gen erklären [71, 100]. Zusammenfassend scheint sich der NOD2-Signalweg protektiv auf die Graft-versus-Host Reaktion auszuwirken [71].

1.2.2 Vitamin D₃ und seine Wirkung auf die GvHD

Vitamin D₃ ist neben seinen Effekten auf den Knochen- und Mineralienstoffwechsel bekannt für seine immunmodulierende Wirkung [3, 115]. Es wird in der Haut abhängig von der Lichteinstrahlung (speziell Ultraviolettlicht mit einer Wellenlänge von 270-300 nm) aus 7-Dehydrocholesterol synthetisiert. In der Leber wird Vitamin D₃ zu 25-Hydroxyvitamin D₃ (25(OH) Vitamin D₃) überführt, welches als inaktiver Metabolit im Körper zirkuliert. Anschließend erfolgt die Konversion zu 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂ Vitamin D₃), der biologisch aktiven Form von Vitamin D₃, in der Niere [116]. Interessant ist, dass die Synthese von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ durch die 25-Hydroxyvitamin D₃-1α-Hydroxylase (CYP27B1) nicht nur in der Niere, sondern auch in Zellen des Immunsystems, insbesondere Monozyten und dendritischen Zellen, erfolgt [117–121]. In seiner immunmodulatorischen Wirkung zielt 1,25-(OH)₂ Vitamin D₃ sowohl auf dendritische Zellen als auch auf CD4⁺ T-Zellen. Eine Behandlung unreifer dendritischer Zellen mit 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ sowie mit seinem Vorgänger 25(OH) Vitamin D₃ führt zu einem persistierenden unreifen Phänotyp der DCs mit verminderter Expression von MHC II und kostimulatorischen Molekülen, verminderte Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie IL-12 sowie verminderter Reaktion auf Kontakt zu bakteriellen Liganden [115, 119, 122–124]. Darüber hinaus induzieren dendritische Zellen, die unter 1,25-Dihydroxyvitamin D₃- oder Vitamin D₃-Rezeptor-Agonisten-Zugabe kultiviert wurden, T_H2- und T_{reg}-

Zellen [125–129]. Da eine schwere GvHD mit geringen Konzentrationen an regulatorischen T-Zellen assoziiert ist und T_{reg} -Zellen in Studien eine Graft-versus-Host Reaktion hinauszögern und sogar verhindern können, könnte die Serumkonzentration von $1,25(\text{OH})_2$ Vitamin D_3 bzw. $25(\text{OH})$ Vitamin D_3 relevant für die Ausprägung der GvHD sein [130–135]. Außerdem besitzen sowohl $1,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 als auch 25 -Hydroxyvitamin D_3 einen direkten anti-inflammatorischen Effekt durch die Inhibition der IL-2- und IFN- γ -Produktion allogener T-Zellen [116, 136, 137].

Die positive Wirkung von Vitamin D_3 auf die Graft-versus-Host Reaktion wurde 2001 von Pakkala et al. beobachtet, die zeigen konnten, dass ein synthetisches Vitamin D-Analogon die histologische Ausprägung der intestinalen GvHD deutlich reduzieren kann [138]. Polymorphismen (SNPs) im Genom für den Vitamin D-Rezeptor gehen einher mit einem erhöhten Risiko für eine schwere GvH Reaktion [139, 140]. Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass eine aggravierte Graft-versus-Host Reaktion nicht nur mit niedrigen Serumkonzentrationen von $1,25$ -Dihydroxyvitamin D_3 , sondern auch von 25 -Hydroxyvitamin D_3 einhergeht [135].

1.2.3 Vitamin A und seine Wirkung auf die GvHD

Neben Vitamin D_3 hat auch die aktive Form von Vitamin A, Retinsäure (*retinoic acid*, RA), Einfluss auf das Immunsystem. Eine Vitamin A-Defizienz ist mit einer erhöhten Infektanfälligkeit sowie Defekten in sowohl adaptiver als auch angeborener Immunantwort assoziiert [141, 142]. Diätetisch aufgenommenes Vitamin A (Retinol) wird mittels einer Alkoholdehydrogenase zu Retin-Aldehyd (Retinal) oxidiert. Im Anschluss können dendritische Zellen und Makrophagen Retin-Aldehyd zu dem aktiven Metaboliten *all-trans* Retinsäure mittels Retin-Aldehyddehydrogenasen umwandeln [39, 143, 144]. Das menschliche Genom besitzt 19 Gene, die für unterschiedliche Retin-Aldehyddehydrogenasen kodieren [145]. Hierunter zählen *RALDH1* (*ALDH1A1*), *RALDH2* (*ALDH1A2*), *RALDH3* (*ALDH1A3*) sowie weitere Enzyme, die je nach DC-Subpopulation unterschiedlich stark exprimiert werden. Die Expression der aktivsten Isoform der *ALDH1A*-Familie, *ALDH1A2*, wird synergistisch von GM-CSF und Interleukin 4 induziert. Eine weitere Steigerung können auch TLR-Liganden bewirken [143, 146, 147]. Auch Retinsäure selbst kann durch die Bindung an seine beiden Rezeptoren *retinoic acid receptor* (RAR) sowie *retinoid x receptor* (RXR) die Expression der *RALDH*-Familien induzieren [25].

Retinsäure werden sowohl immunsuppressive als auch inflammatorische Eigenschaften zugeschrieben. Im Rahmen seiner immunmodulatorischen Wirkung fördert Retinsäure mit TGF- β einerseits die Differenzierung tolerogener DCs, die regulatorische T-Zellen induzieren können [146, 148–150]. Andererseits kann RA in Kom-

bination mit TGF- β direkt die Konversion naiver T-Zellen zu FOXP3⁺ T_{regs} herbeiführen [14, 151]. Ohne TGF- β zeigt sich kein Einfluss von RA auf die direkte Differenzierung regulatorischer T-Zellen [38, 152]. Außerdem inhibiert Retinsäure die Differenzierung von T_H1- und T_H17-Zellen [14, 153–155].

In einer inflammatorischen Umgebung jedoch fördert Retinsäure die Differenzierung von T_H1- [156], T_H17- und anderen Effektor-T-Zellen [39, 157–159].

Trotz der einschlägigen Literatur über die immunsuppressiven Eigenschaften von Retinsäure, haben Chen et al. und Aoyama et al. die Beobachtung gemacht, dass Retinsäure eine intestinale GvH-Reaktion in Mäusen verstärkt und zu einer erhöhten Mortalität führt [75, 160]. Übereinstimmend stellten Koenecke et al. einen milderen Verlauf der GvH-Reaktion sowie ein verlängertes Überleben bei Vitamin A-armer Ernährung in Mäusen fest [161]. Ferner konnten Hurst et al. eine IL-6-abhängige gastrointestinale Inflammation durch Am80, einen synthetischen RAR-Rezeptor-Agonisten, zeigen [162]. Interessanterweise haben aber Nishimori et al. unter Administration von Am80 eine Abmilderung einer chronischen Graft-versus-Host Reaktion beobachtet. Unter der Behandlung mit Am80 wurde die Aktivität von T_H1- und T_H17-Zellen deutlich reduziert [163].

1.2.4 Die Effekte von TGF- β auf das Immunsystem und die GvHD

Transforming Growth Factor- β (TGF- β) ist ein heterodimeres Protein, das von CD4⁺ regulatorischen T-Zellen, aktivierten Makrophagen und anderen Zellen sezerniert wird. Es hat sowohl immunmodulatorische als auch inflammatorische Effekte [28]. TGF- β wirkt anti-inflammatorisch, indem es die Aktivierung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Endothelzellen inhibiert. Ferner induziert es sowohl alleine als auch in Kombination mit Retinsäure die Differenzierung von regulatorischen T-Zellen [40, 149, 151, 164, 165]. Bei TGF- β -Rezeptor-Defizienz entwickeln Mäuse letale Multiorgan-Autoimmunitäten und weisen eine gestörte Aktivierung ihrer T_{reg}-Zellen auf [166, 167]. Die Zugabe von TGF- β sowohl zu T-Lymphozyten als auch zu unreifen dendritischen Zellen bewirkt eine im Vergleich zu pro-inflammatorischen Zytokinen erhöhte Sekretion von IL-10 und macht eine tolerogene Immunantwort möglich [41, 168]. Des Weiteren sezernieren reife dendritische Zellen, die mit Lipopolysaccharid stimuliert wurden, unter TGF- β -Einfluss geringere Mengen des proinflammatorischen Zytokins IL-12 [169].

Mou et al. zeigten, dass bei einer Stammzelltransplantation eine Kotransplantation TGF- β -behandelter, unreifer dendritischer Zellen des Empfängers im Vergleich zu reifen dendritischen Zellen eine GvHD hinauszögert [170]. Li et al. sowie Yang et al. konnten auch den positiven Effekt von TGF- β -vorbehandelten tolerogenen dendriti-

schen Zellen eines Dritten auf die Graft-versus-Host Reaktion beobachten [168, 171]. Außerdem konnte ein Zusammenhang zwischen Polymorphismen im TGF- β 1-Gen und dem Risiko, eine akute oder chronische Graft-versus-Host Reaktion zu entwickeln, beobachtet werden [172].

Andererseits kann TGF- β in Kombination mit den inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und IL-6 die Differenzierung von T_H17 begünstigen [173, 174]. Des Weiteren stimuliert es auch Angiogenese und Gewebereparatur durch die Aktivierung von Fibroblasten [175].

2 Zielsetzung

Die Graft-versus-Host Reaktion ist eine der schwersten Komplikationen bei Knochenmark- und Stammzelltransplantationen. Da dendritische Zellen entscheidend für die Induktion dieser Erkrankung sind, stellen sie ein vielversprechendes therapeutisches Ziel dar, um die Immunantwort zu modulieren. Ziel dieser Arbeit war deswegen die Analyse unterschiedlicher Aspekte zur Generierung tolerogener dendritischer Zellen. Da dendritische Zellen des Gastrointestinaltraktes stets mit einer Vielzahl an unterschiedlichen Bakterien und Fremdstoffen in Kontakt stehen, wurde der Einfluss unterschiedlicher bakterieller Liganden auf die Tolerogenität dendritischer Zellen analysiert. Neben TLR- und NOD-Liganden kamen auch Retinsäure- und Vitamin D-Metaboliten sowie TGF- β zum Einsatz, da sie eine potente immunmodulierende Wirkung besitzen.

3 Material

3.1 Geräte

Gerät	Firma, Ort
Autoklav	Walter, Greislingen
Becton Dickinson BD LSR II	BD Biosciences, Heidelberg
Durchflusszytometer	
CASY Zellzählgerät	Schärfe System, Reutlingen
Densitometer „Molecular Dynamics“	GE Healthcare, München
Durchflusszytometer FACSCalibur	BD Biosciences, Heidelberg
Elektrophoreseapparaturen	Biometra, Göttingen
Elutriator Avanti J-20XP	Beckmann Coulter, Krefeld
Halbtrockenzelle für Western Blots	Biometra, Göttingen
Inkubatoren BBD 6220	Heraeus, Osterode
Kamera AxioCam HRc	Zeiss, Jena
Magnetrührer MR 3001 K	Heidolph, Schwabach
Mikroskope	Zeiss, Jena
Mikrotiterplatten-Waschgerät	Thermo Electron Corporation
Mikrowelle Privileg 8020	Privileg, Fürth
Multipipettor Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
NanoDrop ND1000	PeqLab, Erlangen
Netzgeräte	Biometra, Göttingen
Neubauerzählkammer	Marienfeld, Lauda-Königshofen
PCR-Thermocycler Modell PTC-200	MJ-Research/Biometra, Göttingen
pH-Meter	Knick, Berlin
pH-Meter, tragbar	Hanna Instruments, Kehl am Rhein
Photometer	MWG-Biotech, Ebersberg
Picofuge	Heraeus, Osterode
Realplex Mastercycler epGradient S	Eppendorf, Hamburg
Schweißgerät für PCR-Platten	Fermant 400 Josten & Kettenbaum, Bensberg
Sterilbank Lamin Air HA 2472	Heraeus, Osterode
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg
Trennkammer für Gegenstrom- zentrifugation	Beckmann, München

Vortexer	Scientific Industries, New York, USA
Waage LP1200S	Sartorius, Göttingen
Wallac-Betaplate Counter	PerkinElmer, Rodgau
Wallac-Harvester	PerkinElmer, Rodgau
Wasseraufbereitungsanlage	Millipore, Eschborn
Western-Blot-Kammer	Biometra, Göttingen
Zentrifuge Avanti J-20XP; Rotor JE 5.0	Beckmann, München
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus, Osterode
Zentrifuge J6M-E	Beckmann, München
Zentrifuge Megafuge 3,0 R	Heraeus, Osterode
Zentrifuge Sigma 2	Sartorius, Göttingen

3.2 Verbrauchsmaterial

Material	Firma, Ort
Adhäsionsobjektträger	Marienfeld, Lauda-Königshofen
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen
dickwandige Reaktionsgefäße (0,1 ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Dispenserspitzen für Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Einmalkanülen	Becton Dickinson, Heidelberg
Einmalpipetten	Costar, Cambridge, USA
Einmalspritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Filterpapier 3MM	Whatman, Dassel
Fotofilm Hyperfilm ECL	Amersham, Braunschweig
Heat sealing film	Eppendorf, Hamburg
Mikrotiterplatten (6, 12, 96 Vertiefungen)	Falcon, Heidelberg
Mikrotiterplatten für ELISA	Costar, Cambridge, USA
PCR-Platten Twin.tec (96 Vertiefungen)	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg
Polystyrolröhrchen	Falcon, Heidelberg
PVDF-Membran (5 μ m)	GE Osmonics, Minnetoka, USA
Reaktionsgefäße (0,5 ml; 1,5 ml; 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Spritzen	Becton Dickinson, Heidelberg
Sterilfilter	Millipore, Eschborn
TopSeal-A Folien	Perkin Elmar, Rodgau
UniFilterplatten	Perkin-Elmer, Rodgau

Zellkulturflaschen und -pipetten	Costar, Cambridge, USA
Zentrifugenröhrchen	Falcon, Heidelberg

3.3 Chemikalien

Chemikalie	Firma, Ort
[Methyl 3H] Thymidin	Amersham, Braunschweig
PFA-Pulver	Merck, Darmstadt
AB-Serum	Rotes Kreuz, Regensburg
Dulbecco's PBS	PAA, Pasching, Österreich
Ficoll 400	Pharmacia, Uppsala, Schweden
Flagellin	Invitrogen, Karlsruhe
Fötale Kälberserum	PAA, Pasching, Österreich
GM-CSF	Berlex, Leverkusen
IgG	Biotest AG, Dreieich
IL-4	Promokine, Heidelberg
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
Ionomycin	BD, Heidelberg
Lipopolysaccharid	Alexis, Farmingdale, USA
Lipoteichonsäure	Sigma, Deisenhofen
Muramyldipeptid	Sigma, Deisenhofen
Natrium-Azid	Merck, Darmstadt
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Eggenstein
PMA	BD, Heidelberg
QuantiFast SYBR-Green	Qiagen, Hilden
Random-Decamer-Primer	Ambion, Darmstadt
RPMI 1640	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Szintillationslösung	Perkin Elmar, Rodgau
TGF- β	Peptotech, Hamburg

3.4 Inhibitoren, Enzyme und Kits

Kit	Firma, Ort
ALDEFLUOR™ Kit	Stemcell Technologies, Grenoble, France
BD Cytotfix/Cytoperm™-Plus- /Fixation/Permeabilization Kit	BD, Heidelberg
DuoSet ELISA	R&D Systems, Wiesbaden
FOXP3 Fix/Perm Buffer Set	BioLegend, San Diego, USA
dNTPs	NEB, Frankfurt
ECL-Detection-Kit	Amersham, Braunschweig
Quantifast SYBR Green-Kit	Qiagen, Hilden
Random-Decamer-Primer	Ambion, Darmstadt
reverse Transkriptase M-MLV	Promega, Mannheim
RNeasy Midi- und Mini-Kit	Qiagen, Hilden

3.5 Software und Datenbanken

Software	Hyperlink
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org
Microsoft Office 2010	Microsoft Redmond, USA
PubMed	www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez
USCS Genome-Browser (BLAT, in silico-PCR)	www.genome.uscs.edu
Perlprimer Vision 1.1.19	http://perlprimer.sourceforge.net
FACSDiva Software	BD Biosciences, Heidelberg
FlowJo Software	TreeStar Inc., Ashton, USA
Corel Draw X3	Universität Regensburg
SPSS	Universität Regensburg
GraphPad	http://graphpad.com/prism
GNU R	http://www.r-project.org
L ^A T _E X	http://www.latex-project.org

3.6 Antikörper

3.6.1 Western Blot

Antikörper	Herkunft	Firma
anti- β -Aktin (human)	Kaninchen (IgG)	Sigma, Deisenhofen
anti-phospho-Akt (Ser473) (human)	Maus (IgG)	Cell Signaling Technology, Boston, USA
anti-phospho-p38 (Thr180/Thr182) (human)	Kaninchen (IgG)	Cell Signaling Technology, Boston, USA
anti- $i\kappa$ B α (human)	Kaninchen (IgG)	Cell Signaling Technology, Boston, USA
anti-IgG (HRP-konjugiert) (rabbit)	Ziege (IgG)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg
anti-IgG (HRP-konjugiert) (mouse)	Ziege (IgG)	Dako Deutschland GmbH, Hamburg

3.6.2 Durchflusszytometrie

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugation	Firma
CD1a	IgG ₁	T6	Maus	PE	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
CD14	IgG _{2b}	My4	Maus	FITC	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
CD3	IgG ₁	UCHT1	Maus	APC	BD Biosciences, Heidelberg
CD4	IgG ₁	RPA-T4	Maus	V450	BD Biosciences, Heidelberg
CD8	IgG ₁	SK1	Maus	PE/Cy7	BioLegend GmbH, Fell
CD25	IgG ₁	2A3	Maus	APC	BD Biosciences, Heidelberg
CD80	IgM	BB1	Maus	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
CD83	IgG _{2b}	HB15a	Maus	FITC	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
CD86	IgG ₁	2331 (FUN-1)	Maus	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
FOXP3	IgG _{2a}	PCH101	Ratte	PE	eBioscience, Frankfurt
FOXP3 – Isotype Contr.	IgG _{2a}	PCH101	Ratte	PE	eBioscience, Frankfurt
HLA-DR	IgG _{2b}	B8.12.2	Maus	FITC	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
IFN	IgG ₁	B27	Maus	FITC	BD Biosciences, Heidelberg
IL-2	IgG _{2a}	MQ1-17H12	Ratte	PE	BD Biosciences, Heidelberg
Isotyp IgG ₁	IgG ₁	X40	Maus	PE	BD Biosciences, Heidelberg
Isotyp IgG _{ges.}	IgG _{ges.}	MS- IgG	Maus	FITC	Beckman Coulter GmbH, Krefeld
Isotyp IgM	IgM	GC323	Maus	FITC	Beckman Coulter GmbH, Krefeld

3.6.3 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden freundlicherweise von Dr. Michael Kastenberger entworfen und von der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg) bezogen.

Gen		Sequenz 5' → 3'
<i>18S rRNA</i>	sense	ACCGATTGGATGGTTTAGTGAG
	antisense	CCTACGGAAACCTTGTTACGAC
<i>ALDH1A1</i>	sense	GGCTTATCAGCAGGAGTGTTTACCA
	antisense	GCACTTACCACGCCATAGCA
<i>ALDH1A2</i>	sense	CAATGCAAGCTGGGACTGTTTGG
	antisense	CTTTACTGTCACCGTCTTAACTTCTGAG
<i>ALDH1A3</i>	sense	GAGCGAATAGCACCGACTATGGAC
	antisense	TAAAGCCACCAAATGGAGCCTG

4 Methoden

4.1 Zellbiologische Methoden

4.1.1 Gewinnung humaner Monozyten

Gesunden Spendern wurden durch Leukapherese Blutzellen entnommen. Anschließend wurden mononukleäre Blutzellen (*mononuclear cells*, MNCs) mittels einer Dichtegradientenzentrifugation über Ficoll/Hypaque (PAN Biotech, Aidenbach) isoliert. Dafür wurden 50 ml Blut mit 150 ml PBS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) verdünnt. Daraufhin wurden 15 ml der „Biocoll Separating Solution“ in einem 50 ml Falcon mit 25 ml verdünntem Blut überschichtet und bei 700 g 30 Minuten lang zentrifugiert. Nach der Zentrifugation wurde die Interphase mit den mononukleären Zellen abgenommen, in ein 200 ml Falcon überführt und dreimal mit PBS gewaschen. Im nächsten Schritt wurden die MNCs mit Hilfe einer Gegenstromzentrifugation in einer 50 ml-Trennkammer entsprechend ihrer Größen und Dichten in verschiedene Fraktionen getrennt. Hierzu wurden zunächst die Kammer und die mit ihr verbundenen Schläuche 20 Minuten mit 6% H₂O₂ sterilisiert, mit PBS gespült und von Luftblasen befreit. Das System wurde bei 600 g und 4°C mit Hank's BSS (PAA Laboratories, Pasching, Österreich) geeicht und danach mit MNCs bei einer Flussrate von 52 ml pro Minute gefüllt. Durch die schrittweise Erhöhung der Flussrate des Systems wurden unterschiedliche Zellfraktionen gesammelt [176]. Diese Fraktionen und die verwendete Flussrate sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

Die gewonnenen Monozyten wurden bei 300 g und 4 °C für 7 Minuten zentrifugiert, in RPMI 1640 resuspendiert und gezählt. Ihre Ausbeute, auf die eingesetzte Menge an MNCs bezogen, lag zwischen 10 und 20% und war spenderabhängig. Die Reinheit der erhaltenen Monozytenfraktion betrug im Durchschnitt $\geq 85\%$. Dies wurde mittels Mikroskop sowie durch die Analyse der CD14 (*cluster differentiation*)-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometer überprüft. Des Weiteren wurde routinemäßig der Stimulierungsgrad der Monozyten durch die Bestimmung der IL-6-Konzentration in Zellkulturüberständen (1 x 10⁶ Monozyten / 2 ml RPMI 1640, 2% humanes AB-Serum) nach Übernachtinkubation kontrolliert. Dieses Vorgehen diente der Sicherstellung, dass nur unstimulierte Monozyten für die nachfolgenden Experimente eingesetzt wurden.

Fraktion	Volumen (ml)	Flussrate (ml/min)	enthaltender Zelltyp
Ia	1000	52	Thrombozyten
Ib	1000	57	B - und T -Lymphozyten, Natürliche Killerzellen
IIa	1000	64	
IIb	500	74	
IIc	400	82	
IId	400	92	
III	800	130	Monozyten

Tabelle 4.1: Elutriationsparameter und die daraus gewonnenen Zelltypen

4.1.2 Waschen und Ernten

Soweit nicht anders beschrieben, erfolgte die Zentrifugation bei 300 g und 4°C für 7 Minuten.

4.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zellzahl und Vitalität der kultivierten Zellen wurden mittels einer Neubauer-Zellzählkammer im Trypanblau-Ausschlusstest bestimmt. Die Zellsuspension wurde im 1:1-Verhältnis mit 0,2% Trypanblaulösung verdünnt und auf die Neubauer-Zählkammer aufgetragen. Im Lichtmikroskop wurde die Vitalität der Zellen beurteilt. Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte unter Auszählung der Großquadrate und Berechnung nach der aufgeführten Formel.

$$\text{Zellzahl} = N \times V \times 10^4$$

N = Mittelwert der ungefärbten oder gefärbten Zellen pro Großquadrat

V = Verdünnungsfaktor

benötigte Lösungen:

Trypanblaulösung	0,2% (w/v) [0,2g]	Trypanblau
	ad 100 ml	NaCl-Lösung

4.1.4 Differenzierung humaner dendritischer Zellen

Aus der Elutriation gewonnene humane Monozyten wurden 7 Tage lang bei 37°C, 94,4% relativer Luftfeuchtigkeit und 5% CO₂ inkubiert. Dabei wurden je 20 Millionen Zellen in 30 ml Medium, RPMI 1640, das mit 10% FCS, 2 mmol/l L-Glutamin, 50 U/ml Penicillin und 50 µg/ml Streptomycin versetzt war, überführt. GM-CSF wurde in einer Konzentration von 224 U/ml und IL-4 in 144 U/ml hinzugefügt [5].

4.1.5 Reifung humaner dendritischer Zellen

Zur Reifung wurden iDCs zwei Tage lang mit unterschiedlichen bakteriellen Bestandteilen stimuliert [177]. Die Stimulation erfolgte, falls nicht anders beschrieben, nach dem im Folgenden aufgeführten Schema.

Stimulus	Endkonzentration
Lipopolysaccharid (LPS)	10 ng/ml
Flagellin (Flag)	100 ng/ml
Muramyl-dipeptid (MDP)	100 ng/ml
Lipoteichonsäure (LTA)	100 μ g/ml
TGF- β	5 μ g/ml

4.2 Proteinbiochemische Methoden

4.2.1 Isolierung von Proteinen

Zur Isolierung von Proteinen wurden dendritische Zellen gemäß Kapitel 4.1.4 differenziert. Am Tag sieben wurden sie in 6-well-Platten ausplattiert und mit den bakteriellen Bestandteilen LPS, Flag, MDP und LTA einzeln sowie in Kombination in oben genannten Konzentrationen für 0, 10 und 30 Minuten gereift. Anschließend wurden die Platten auf Eis gestellt und die unterschiedlich stimulierten Zellen in 15 ml-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellkulturen wurden bei 300 g und 4 °C 7 Minuten lang zentrifugiert und ihre Überstände verworfen. Nachdem die reifen DCs nun in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt worden waren, wurden sie zwei Mal mit eiskaltem PBS gewaschen und in je 500 μ l Puffer B gelöst. Nach erneutem Abzentrifugieren wurde der Puffer vorsichtig abgesaugt, das verbleibende Zellpellet in 150 μ l Puffer C aufsuspendiert und für 10 Minuten auf Eis gestellt. Danach wurden die Proben mit je 150 μ l Puffer D versetzt und 10 Minuten lang bei 95°C gekocht und währenddessen geschüttelt. Danach wurden sie auf kleine Aliquots verteilt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Benötigte Lösungen für die Proteinisolierung:

Puffer A	Tris/HCl (pH 7,9)	10 mM	1 μ l
	KCl	60 mM	447 mg
	EDTA	1 mM	37 mg

bei 4°C mehrere Monate haltbar

Puffer B	EDTA pH 8,0	1,5 mM	3 μ l
	DTT	1 mM	10 μ l
	EGTA	1 mM	5 μ l
	β -Glycerophosphat	50 mM	50 μ l
	NaF	50 mM	50 μ l
	NaPyrophosphat	25 mM	100 μ l
	NaOrthovanadat	1 mM	5 μ l
	Leupeptin	2 μ g/ml	2 μ l
	Pepstatin A	2 μ g/ml	2 μ l
	Aprotinin	2 μ g/ml	1 μ l
	Puffer A		772 μ l

vor jeder Anwendung frisch hergestellt

Puffer C	NP40	0,40%	40 μ l
	Chymostatin	100 μ g/ml	5 μ l
	Bestatin	10 μ g/ml	2 μ l
	E64	3 μ g/ml	1 μ l
	1,10 Phenathrolin	1mM	1 μ l
	Puffer B		951 μ l

vor jeder Anwendung frisch hergestellt

Puffer D	Glycerin	20%	10 ml
	Tris/HCl (pH 6,8)	125 mM	5 ml
	SDS	4%	2 g
	2-Mercaptoethanol	10%	5 ml
	Bromphenolblau	0,02%	10 mg
	ad H ₂ O _{bidest}		50 ml

4.2.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Zur Auftrennung von Proteinen wurde die diskontinuierlichen Gelelektrophorese nach Laemmli verwendet [178]. Üblicherweise erfolgte die Herstellung der SDS-Gele am Vortag der Elektrophorese. In der vorliegenden Arbeit wurden Stammlösungen von Trenngel mit einer Acrylamidkonzentration von 12,5 % (v/v) und von Sammelgele mit einer Konzentration von 5 % (v/v) verwendet. Die Herstellung der Trenn- und Sammelgele erfolgte nach unten aufgeführtem Schema.

Benötigte Lösungen für die Herstellung von Trenn- und Sammelgelen:

zugegebene Lösung	12% Trenngel	5% Sammelgel
Trenngelstammlösung (12 %)	6 ml	
Sammelgelstammlösung (5 %)		5 ml
TEMED	6 μ l	5 μ l
APS (10%)	30 μ l	40 μ l

Für die Anfertigung des Trenngels wurde die Trenngelstammlösung mit Ammoniumpersulfat (APS) und N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED) vermischt. Die Lösung wurde unverzüglich in eine hierfür vorbereitete Gelkammer überführt, mit Isopropanol überschichtet und für 30 Minuten ruhen lassen. Im Anschluss wurde das Isopropanol abgegossen, die verbleibenden Reste wurden mit Filterpapier aufgesogen. Das Sammelgel wurde nach dem oben aufgeführten Schema hergestellt und luftblasenfrei auf das nun verfestigte Trenngel gegossen. In das Gel wurde zur Formung von Probetaschen ein Kamm gedrückt und erneut für 30 Minuten ruhen lassen. Anschließend wurde die Gelkammer mit dem Kamm in feuchte Papierhandtücher geschlagen und über Nacht im Kühlschrank zur vollständigen Polymerisierung aufbewahrt. Am nachfolgenden Tag wurden die feuchten Tücher entfernt und die Gelkammer in eine Elektrophoresekammer eingespannt. Die Kammer wurde mit Laemmli-Elektrodenpuffer (1x) gefüllt, der Kamm vorsichtig entfernt und die Probetaschen mit dem Puffer ausgespült. Die zuvor bei -80°C gelagerten Proteinlysate wurden aufgetaut, 10 Minuten lang bei 95°C erhitzt, gevortext und auf Eis gestellt. Entsprechende Mengen der Proben wurden in die entsprechenden Probetaschen des Gels aufgetragen, als Molekulargewichtsstandard dienten 5 μ l „Kaleidoscope Prestained Standard“. Zum Einlaufen in das Sammelgel wurde eine Spannung von 60 V angelegt, danach wurde auf 100 V erhöht. Sobald die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten, wurde die Spannung auf 110-120 V angehoben. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Lauffront den unteren Rand des Gels erreicht hatte.

Benötigte Lösungen für SDS-Polyacrylamid-Gele:

Sammelgelpuffer	Tris/HCl (pH 8,8)	0,5 M	30 g
	H ₂ O _{bidest}		ad 500 ml
Trenngelpuffer	Tris/HCl (pH 8,8)	1,5 M	90,83 g
	H ₂ O _{bidest}		ad 500 ml
SDS (10 %)	SDS	10%	10 g
	H ₂ O _{bidest}		ad 100 ml

Ammoniumpersulfat (10%)	Ammoniumpersulfat	10%	100 mg
	H ₂ O _{bidest}		ad 1 ml
vor jeder Anwendung frisch hergestellt			
Laemmli-Elektrodenpuffer (5-fach)	Tris	40 mM	15 g
	Glycin	0,95 M	216 g
	SDS	0,50%	15 g
	H ₂ O _{bidest}		ad 3000 ml
Trenngelstammlösung 12%	Sammelgelpuffer		-
	Trenngelpuffer		25 ml
	SDS	10%	1 ml
	Acrylamid	30%	40 ml
	H ₂ O _{bidest}		ad 100 ml
Sammelgelstammlösung 5%	Sammelgelpuffer		25 ml
	Trenngelpuffer		-
	SDS	10%	1 ml
	Acrylamid	30%	16,65 ml
	H ₂ O _{bidest}		ad 100 ml

4.2.3 Western Blot

Der Western Blot ist ein Verfahren, wodurch Proteine auf eine Trägermembran transferiert werden. Hierbei wird das mittels SDS-PAGE aufgetrennte Proteingemisch mit Hilfe eines Halbtrockenverfahren auf eine Polyvinylidendifluorid (PVDF) - Membran übertragen [179]. Hierzu wurde eine Halbtrockenzelle von Biometra (Göttingen, Deutschland) verwendet. Die PVDF-Membran sowie Filterpapiere wurden auf die Größe des SDS-Gels zurechtgeschnitten. Die Filterpapiere wurden jeweils in Puffern A, B und C getränkt, die PVDF-Membran 2 Minuten lang in Methanol geschwenkt und mit Puffer B angefeuchtet. Es wurden auf die Anode, also den unteren Teil der Halbtrockenzelle, drei Lagen in Puffer A, dann drei Lagen in Puffer B getränkter Filterpapiere und die PVDF-Membran aufeinander gelegt. Anschließend wurde das aus der Gelkammer vorsichtig gelöste SDS-Gel auf die Membran gebettet und mit drei Lagen in Puffer C getränktem Filterpapier bedeckt. Dabei wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen zwischen den einzelnen Schichten verbleiben. Die Schichten wurden mit der Kathode, dem oberen Teil der Halbtrockenzelle, verschlos-

sen und eine Stromstärke von 0,8 mA/cm² der Gelfläche für 30-45 Minuten angelegt.

Benötigte Lösungen für den Western Blot:

Puffer A	Tris/HCl (pH 10,4)	0,3 M	36,3 g
	Methanol	20%	200 ml
	H ₂ O _{bidest}		ad 1000 ml
Puffer B	Tris/HCl (pH 10,4)	25 mM	3,03 g
	Methanol	20%	200 ml
	H ₂ O _{bidest}		ad 1000 ml
Puffer C	Capronsäure (pH 7,6)	4 mM	5,2 g
	Methanol	20%	200 ml
	H ₂ O _{bidest}		ad 1000 ml

4.2.4 Immunfärbung von Western Blots

Nachdem der Transfer des gelelektrophoretisch aufgetrennten Proteingemisches auf die PVDF-Membran erfolgt war, wurde die Membran vorsichtig von den Filterpapieren genommen, sofort in eine 5 %-ige Magermilchlösung überführt und über Nacht bei 4 °C inkubiert. Die Immunfärbung erfolgte am nächsten Tag. Die PVDF-Membran wurde mit in 5%-iger Magermilchlösung verdünntem Primärantikörper 1,5 Stunden geschwenkt und im Anschluss drei Mal 10 Minuten in „Tris-buffered saline (TBS) and Tween 20“ (TBST)-Puffer gewaschen. Der sekundäre Antikörper, der für den Isotyp des primären Antikörpers spezifisch und Peroxidase-gekoppelt war, auch mit 5 %-iger Magermilchlösung verdünnt und die Membran darin für eine Stunde geschwenkt und im Anschluss wieder drei Mal 10 Minuten mit TBST-Puffer gewaschen.

Benötigte Antikörper für die Immunfärbung:

Antikörper	Verdünnung
anti- β -Aktin (human)	1 : 2500
anti-phospho-Akt (Ser473) (human)	1 : 2000
anti-phospho-p38 MAP-Kinase (Thr180/Thr182) (human)	1 : 2000
anti- $i\kappa$ B α (human)	1 : 2000
anti-IgG (HRP-konjugiert) (rabbit)	1 : 2000
anti-IgG (HRP-konjugiert) (mouse)	1 : 2000

Die ECL (*enhanced chemiluminescence*)-Arbeitslösung wurde wie unten aufgeführt hergestellt und die PVDF-Membran nach dem letzten Waschschrift für 1,5 Minuten ihr zugegeben. Die durch diesen Vorgang ausgelöste Chemilumineszenz wurde durch das Auflegen eines Films, je nach Signalstärke für 1 Sekunde bis 30 Minuten, detektiert.

Benötigte Lösungen für die ECL-Färbung

TBS-Puffer (10-fach)	Tris/HCl (pH 7,4) H_2O_{bidest}	0,38 M	45,8 g ad 2000 ml
TBST-Puffer	TBS-Puffer (10-fach) Tween 20 H_2O_{bidest}	0,10%	100 ml 1 ml ad 1000 ml
Magermilch 5%	Magermilchpulver TBST-Puffer	5%	5 g ad 100 ml
ECL - Lösung A	Luminol H_2O_{bidest}	250 mM	100 mg ad 2 ml
ECL - Lösung B	p-Coumarinsäure DMSO	90 mM	14,76 mg ad 1 ml
ECL - Lösung C	Tris/HCl (pH 8,5) H_2O_{bidest}	1 M	12,11 g ad 100 ml
ECL - Mix	ECL-Lösung A ECL-Lösung B ECL-Lösung C H_2O_{bidest}		2 ml 0,89 ml 20 ml ad 200 ml
ECL - Entwicklungslösung	ECL- Mix Wasserstoffperoxid H_2O_2	30%	5 ml 1,5 μ l
Re-Blot Mild Solution (1-fach)	Re-Blot Mild Solution (10-fach) H_2O_{bidest}		1 ml ad 10 ml

4.2.5 Densitometrische Auswertung der Western Blots

Nach Entwicklung der Filme wurde mit Hilfe des Densitometers „Molecular Dynamics“ (GE Healthcare, München) die Stärke der Chemilumineszenz-induzierten Filmfärbung relativ zur Hintergrundfärbung ermittelt.

4.3 Immunologische Methoden

4.3.1 Bestimmung von Zytokinen im Zellkulturüberstand

Zur Bestimmung von Zytokinen in Zellkulturüberständen wurden „sandwich“-ELISAs verwendet. Bei dieser Art des ELISAs ist eine feste Phase, beispielsweise eine Mikrotiterplatte, mit einem Primärantikörper, an den das zu untersuchende Antigen spezifisch bindet, beschichtet. Hierdurch wird das Antigen an die feste Phase fixiert. Ein Enzym-konjugierter Detektionsantikörper wird nun hinzugegeben, der wiederum selbst spezifisch an das gesuchte Antigen bindet. Unspezifisch gebundene Detektionsantikörper werden durch einen Waschschrift entfernt. Ein zugegebenes chromogenes Substrat wird vom Enzym zu Farbstoff umgewandelt. Die Farbintensität gibt Rückschluss auf die Konzentration des zu detektierenden Antigens [180]. Hierfür wurden die Kulturüberstände reifer dendritischer Zellen abgenommen und bis zur Bestimmung bei -20°C eingefroren. Die Analyse erfolgte mittels „DuoSet ELISA“ nach Angaben des Herstellers (R&D Systems, Wiesbaden). Diese Experimente erfolgten mit freundlicher Unterstützung von Alice Peuker aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Marina Kreutz, Universität Regensburg.

4.3.2 Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)

Bei der allogenen hämapoetischen Stammzelltransplantation (HSZT) erkennen fremde Spender-T-Lymphozyten die HLA-Antigene der antigenpräsentierenden Zellen des Empfängers. Unter diesen Umständen wird die T-Zelle aktiviert und proliferiert unter Sekretion proinflammatorischer Zytokine [82, 86]. Diese Situation lässt sich *in vitro* mit Hilfe der Gemischten Lymphozytenreaktion (*mixed lymphocyte reaction*, MLR) konstruieren [181]. Hierzu werden antigenpräsentierende Zellen wie zum Beispiel reife dendritische Zellen (DC) als Stimulator- mit allogenen T-Lymphozyten als Effektorzellen zusammen inkubiert. Sowohl die dendritischen Zellen als auch die T-Lymphozyten wurden aus Leukapherisaten gewonnen. DCs wurden aus Monozyten aus Fraktion III der Gegenstromzentrifugation laut Kapitel 4.1.4 differenziert, allogene T-Lymphozyten wurden aus Fraktion IIa der Gegenstromzentrifugation gewonnen (siehe Kapitel 4.1.1). Für die MLR wurden reife dendritische Zellen in

einer 1:2 -Verdünnungsreihe in eine 96-well-Platte ausgesät und je 10^5 allogene T-Lymphozyten hinzugefügt. Zur Kontrolle wurden dendritische bzw. T-Zellen allein kokultiviert. Um den Einfluss verschiedener Substanzen auf die Proliferation der T-Zellen zu testen, wurden die Vitaminvorstufen von Vitaminen A und D entsprechend der unten aufgeführten Konzentrationen hinzugefügt. Die Platten wurden abzentrifugiert und anschließend für fünf Tage bei 37 °C und 5% CO₂ inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde zu den Kokulturen ³H-Thymidin in einer Dosis von je 0,5 mCi pro well gegeben und weitere 18 Stunden inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen mittels einem Wallac-Harvester auf 96-well-UniFilter-Platten übertragen, die freie Radioaktivität durch Waschen der Filter entfernt, mit 50 µl Szintillationslösung überschichtet und mit TopSeal-A-Folien verschlossen. Die Analyse der Proliferationsrate erfolgte mit Hilfe des Wallac Betaplate-Counter. Diese Experimente wurden freundlicherweise mit Unterstützung von Alice Peuker aus der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Marina Kreutz durchgeführt.

Hinzugegebene Vitaminkonzentrationen:

- 25(OH) Vitamin D₃ 5×10^{-8} M/ml
- Retinol 10^{-6} M/ml
- Retinal 10^{-6} M/ml

4.3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist ein Verfahren zur Analyse von Zellgröße, -granularität und unterschiedlichen phänotypischen Eigenschaften. Hierfür werden die Zellen und ihre zu analysierenden Bestandteile im Vorfeld mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt. Die Zellen werden vom Durchflusszytometer einzeln angesaugt und fließen hintereinander durch eine „Flusszelle“, die mit fokussiertem Licht angestrahlt wird. Je nach Größe, Granularität und angefärbter Farbe lenken die Zellen dann den Lichtstrahl um, was von Laserdetektoren registriert wird. Diese Lichtstreuung wird dann aufgezeichnet und in Diagramme verarbeitet, wonach man Rückschlüsse auf verschiedene Eigenschaften der Zelle ziehen kann [182].

4.3.3.1 Aldehyddehydrogenasefärbung

Zum quantitativen Nachweis der Aldehyddehydrogenase-Aktivität in dendritischen Zellen wurde das ALDEFLUORTM-Kit der Firma Stemcell Technologies, Grenoble, verwendet. Die Zellen wurden sieben Tage lang mit GM-CSF und IL-4 differenziert und im Anschluss für zwei Tage mit verschiedenen bakteriellen Bestandteilen ein-

zeln oder in Kombination für zwei Tage inkubiert. Das Kit beinhaltet das Reagenz BODIPYTM - Aminoacetaldehyd (BAAA), welches ein fluoreszierendes, nichttoxisches Substrat für die Aldehyddehydrogenase (ALDH) ist und frei durch die Wand intakter und lebender Zellen diffundiert. Im Anwesenheit von ALDH wird das Substrat BAAA zu BODIPYTM- Aminoacetat (BAA) umgesetzt, welches nicht mehr aus der Zelle diffundieren kann und sich ansammelt. Die Menge des Fluoreszenzreaktionsprodukts ist proportional zur ALDH-Aktivität der Zellen und wird mittels Durchflusszytometrie gemessen. Ein ALDH-Inhibitor, Diethylaminobenzaldehyd (DEAB), wurde zu den Kontrollproben hinzugegeben, um die Hintergrundfluoreszenz messen zu können. Das aktivierte BAAA-Reagenz wurde strikt nach Produktanweisung hergestellt. Dabei wurde das inaktive BODIPYTM- Aminoacetaldehyd-Diethylacetat (BAAA-DA) in die aktive Form BODIPYTM- Aminoacetaldehyd (BAAA) überführt und in 20 μ l Aliquots bei -20 °C eingefroren. Die gewaschenen stimulierten dendritischen Zellen wurden in jeweils zwei Polystyrolröhrchen mit der Endmenge von 0,5 Millionen überführt. Je eines der beiden Röhrchen wurde mit dem ALDH-Inhibitor DEAB versetzt und diente der Kontrolle. Anschließend wurde in alle Röhrchen das aktive Substrat BAAA hinzugefügt, kurz aufsuspendiert und dann für 45 Minuten bei 37 °C im Dunkeln inkubiert. Daraufhin wurden die Zellen bei 300 g und 4 °C für sieben Minuten abzentrifugiert. Nachdem der Überstand verworfen wurde, wurden die Zellen in je 500 μ l Aldefluor Assay Buffer aufgenommen und bis zur Messung auf Eis gestellt. Die Messung wurde mit dem Durchflusszytometer LSR II von BD Biosciences und in freundlicher Unterstützung von Dr. Katrin Singer und Andrea Kaiser der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Marina Kreutz, Universität Regensburg, durchgeführt.

4.3.3.2 Analyse von T-Lymphozyten

Zur durchflusszytometrischen Analyse von T-Zellen wurden einerseits die Oberflächenantigene CD3, CD4, CD8 sowie CD25 und das intrazelluläre FOXP3, andererseits wurden als Aktivitätsmarker intrazelluläre Zytokine bestimmt. Mit 10 ng/ml Lipopolysaccharid gereifte dendritische Zellen (10^4) mit allogenen T-Lymphozyten (10^5) in 96-well-Mikrotiterplatten in RPMI 1640 mit 5%-igem AB-Serum verteilt. 5×10^{-8} M/ml 25(OH) Vitamin D₃, 10^{-7} M/ml Retinal und 10^{-7} M/ml Retinol wurden hinzugefügt, mit Hilfe von einer Pipette aufsuspendiert und für fünf bis sieben Tage bei 37 °C inkubiert. Am Tag der Färbung wurde ein Teil der Zellen geerntet, bei 400 g für 4 Minuten zentrifugiert, gezählt und je 0,5 Millionen Zellen in 5 ml Polystyrolröhrchen überführt und mit FACS-Puffer gewaschen. Für die Zytokinfärbung wurden T-Zellen mit PMA (20 ng/ml) und Ionomycin (1 μ g/ml) aus dem „BD CytoFix/CytopermTM-Plus-/Fixation/Permeabilization Kit“ (BD Biosciences,

Heidelberg), welche die Zellen zur Zytokinproduktion stimulierten, versetzt. Durch die Zugabe von GolgiStop wurde die Freisetzung der Zytokine verhindert. Nach fünf Stunden Inkubationszeit bei 37 °C wurden die Zellen geerntet, mit FACS-Puffer gewaschen und für die Oberflächen- und intrazelluläre Zytokinfärbung in Polystyrolröhrchen bereitgestellt.

Benötigte Antikörper für die Färbung von T-Lymphozyten; „FACS-Panel“ :

Färbung	FITC	PE	APC	V450	PE-Cy7
Oberflächenfärbung	CD3	CD1a	CD25	CD4	CD8
Zytokinfärbung	IFN γ	IL2	CD3	CD4	CD8
FOXP3-Färbung	CD3	FOXP3	CD25	CD4	CD8
FOXP3-Isotypkontrolle	CD3	RatIgG _{2a}	CD25	CD4	CD8

Antikörper und ihre Menge für die Färbung von T-Lymphozyten:

Spezifität	Isotyp	Klon	Herkunft	Konjugation	Menge
CD1a	IgG ₁	T6	Maus	PE	1,5 μ l
CD3	IgG ₁	UCHT1	Maus	APC	10 μ l
CD4	IgG ₁	RPA-T4	Maus	V450	5 μ l
CD8	IgG ₁	SK1	Maus	PE/Cy7	1,5 μ l
CD25	IgG ₁	2A3	Maus	APC	5 μ l
FOXP3	IgG _{2a}	PCH101	Ratte	PE	2,5 μ l
FOXP3-Isotyp-Kontrolle	IgG _{2a}	PCH101	Ratte	PE	2,5 μ l
IFN γ	IgG ₁	B27	Maus	FITC	2,5 μ l
IL-2	IgG _{2a}	MQ1-17H12	Ratte	PE	2,5 μ l

4.3.3.2.1 Oberflächenantigenfärbung Zur Oberflächenfärbung von T-Lymphozyten wurde ein Mastermix für die benötigte Anzahl der Proben aus den benötigten Antikörpern hergestellt und dann auf alle T-Zellen verteilt. Die Proben wurden für 30 Minuten bei 4 °C im Dunkeln inkubiert und anschließend mit FACS-Puffer gewaschen. Nach diesem Schritt war die Oberflächenfärbung fertig, auf die dann die Intrazellulärfärbung folgte.

Benötigte Lösungen zur Herstellung des FACS-Puffers:

FACS-Puffer	PBS	500 ml
	AB-Serum-Pool 2%	10 ml

4.3.3.2 Intrazelluläre FOXP3-Färbung Zur Färbung des intrazellulären FOXP3-Proteins, eines Transkriptionsfaktors, der charakteristisch für T_{reg} -Lymphozyten ist, wurden die oberflächengefärbten Zellen mit je 1 ml der Fix/Perm-Lösung des „FOXP3 Fix/Perm Buffer Sets“ von BioLegend, San Diego, versetzt und für 20 Minuten bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Röhrchen abzentrifugiert, der Überstand verworfen und die Zellen mit 1 ml Perm-Puffer, nach Herstelleranleitung angefertigt, gewaschen. Eine Hälfte der Röhrchen wurde mit dem FOXP3-Antikörper, die andere Hälfte mit dem IgG2a Isotyp versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C wurden die Zellen zweifach mit je 1 ml Perm-Puffer gewaschen, in 500 μ l FACS-Puffer aufgenommen und bis zur Messung auf Eis verwahrt.

4.3.3.3 Intrazelluläre Zytokinfärbung Nach der Oberflächenfärbung (s.o.) wurden die Zellen mit 500 μ l Fixation/Permeabilisation-Lösung versetzt und bei 4°C für 30 Minuten inkubiert. Danach wurden alle Zellen mit dem Perm/Wash-Puffer gewaschen und mit den fluoreszenzmarkierten Antikörpern gegen IL-2 und IFN- γ versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 4°C wurden die Zellen erneut mit Perm/Wash-Puffer gewaschen und anschließend in 500 μ l FACS-Puffer aufgenommen. Bis zur Messung wurden die Proben auf Eis aufbewahrt. Die Zytokinfärbung erfolgte mit Hilfe des „BD CytoFix/CytopermTM-Plus-/Fixation/Permeabilization Kits“ (BD Biosciences, Heidelberg). Der Perm/Wash-Puffer wurde nach Gebrauchsanleitung angefertigt.

4.4 Molekularbiologische Methoden

4.4.1 Isolierung RNA

Für die Analyse der Genexpression reifer dendritischer Zellen erfolgte zunächst eine RNA-Isolierung. Hierfür wurden reife DCs in 15 ml überführt und bei 4°C und 300 g für sieben Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen wurden mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1,5 ml-Reaktionsgefäße überführt. Mit Hilfe des „RNeasy Mini-Kits“ oder des „RNeasy Midi-Kits“ wurde nach Hersteller-

angaben (Qiagen, Hilden) die RNA isoliert. Mittels Nanodrop ND 1000 wurde die Konzentration der isolierten RNA photometrisch untersucht.

4.4.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Durch das Verfahren der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden sequenzspezifische DNA-Fragmente *in vitro* amplifiziert. Während wiederholtem Erhitzen und Abkühlen werden mit Hilfe einer hitzestabilen DNA-Polymerase, sequenzspezifischen Oligonukleotid-Primern und einer DNA-Vorlage (*template*) zahlreiche Kopien des zu untersuchenden DNA-Abschnitts generiert [183]. In der vorliegenden Arbeit wurde zur quantitativen Analyse der Genexpression eine spezielle Form der Polymerase-Kettenreaktion verwendet - die *real-time* quantitative Polymerase-Kettenreaktion (RT-qPCR). Hierfür wurde die in DCs exprimierte RNA durch eine reverse Transkription (RT) in komplementäre (*copy*) DNA (cDNA) umgeschrieben, da die bei der PCR eingesetzten DNA-Polymerasen keine RNA amplifizieren können.

4.4.2.1 Reverse Transkription

Um komplementäre DNA (cDNA) zu generieren, wurde die isolierte Gesamt-RNA dendritischer Zellen mit einer reversen Transkriptase (aus einem murinen Leukämievirus, Stamm Moloney, M-MLV), unterschiedlichen DekaNucleotid-Primern mit zufälliger Sequenz (*random-decamer-Primer*) und 2'-Desoxyribonucleosid-5'-triphosphaten (dNTPs) mit einem Gesamtvolumen von 20 μl in einem PCR-Thermocycler inkubiert.

Reaktionszusammenstellung für die Reverse Transkription:

<u>RT-Reaktion:</u>	Gesamt-RNA	0,5 μg
	<i>random-decamer-Primer</i>	1 μl
	dNTPs (je 10 μM)	1 μl
	H ₂ O _{USB}	ad 15 μl

5 Minuten bei 65 °C inkubiert, auf Eis gestellt, abzentrifugiert.

M-MLV-Puffer (5 x)	4 μl
--------------------	-----------------

2 Minuten bei 42 °C inkubiert.

M-MLV Reverse Transkriptase	1 μl
-----------------------------	-----------------

50 Minuten bei 42 °C, anschließend 15 Minuten bei 70 °C inkubiert.

4.4.2.2 „real time“ quantitative PCR

Nach der Generierung von cDNA erfolgte die RT-qPCR. Bei dieser Methode wird ein Farbstoff verwendet, der sich in doppelsträngige DNA einlagert und gebunden fluoresziert. Nach jedem PCR-Zyklus wird die Fluoreszenz, die proportional zur Menge der amplifizierten DNA ist, mittels eines PCR-Geräts ermittelt. Für jede gemessene Probe berechnet das PCR-Gerät einen Wert, bei dem die Fluoreszenz signifikant den Wert der Hintergrundfluoreszenz übersteigt. Dieser Wert wird „cycle threshold“ (ct)-Wert genannt. Durch die Ermittlung von ct-Werten in Proben mit bekannten cDNA-Mengen wurde eine Standardgerade erstellt, anhand welcher dem ct-Wert der Proben eine relative cDNA-Menge zugeordnet werden konnte.

4.4.2.2.1 Reaktionsansatz von RT-qPCR Für die RT-qPCR wurde der „Quantifast SYBR Green-Kit“ (Qiagen, Hilden) verwendet. cDNA wurde in einem Verhältnis von 1:5 bzw. 1:10 in H_2O_{USB} verdünnt und nach dem unten aufgeführten Pipettierschema in PCR-Platten mit 96 Vertiefungen in einem Volumen von 10 μ l angesetzt.

Die PCR-Platte wurde mit einer Siegelfolie verschweißt, kurz abzentrifugiert und im Realplex Mastercycler EpGradient S verschlossen. Die RT-qPCR wurde dann nach dem unten aufgeführten Programm durchgeführt. Dieses Experiment wurde mit freundlicher Unterstützung von Frau Romy Freund der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Marina Kreutz, Universität Regensburg, durchgeführt.

Reaktionsansatz für die RT-qPCR-Reaktion:

RT-qPCR-Reaktion

QuantiFast SYBR Green-Mischung (2 x)		5 μ l
cDNA (1 : 5 bzw. 1 : 10 verdünnt)		1 μ l
Sense-Primer	10 μ M	0,5 μ l
Antisense-Primer	10 μ M	0,5 μ l
H_2O_{USB}		3 μ l

Programm für die „real-time“ quantitative Polymerase Kettenreaktion:

	PCR-Schritt	Temperatur	Zeit
1 Zyklus	Initiales Aufschmelzen	95°C	5 min
45 Zyklen	Aufschmelzen	95°C	8 s
	Hybridisierung, Elongation	60°C	20 s
1 Zyklus	Schmelzkurve	95°C	15s
		65°C	15 s
		65-95°C	10 min

4.5 Statistische Auswertung

Aus den erhaltenen Messwerten wurden Mittelwerte gebildet und Standardfehler der Mittelwerte (*standard error of means*, SEM) errechnet. Zur Berechnung der Signifikanz zwischen zwei unabhängigen Stichproben wurde der ungepaarte Student's t-test mittels der Software „GraphPad Prism 5“ verwendet. p-Werte $> 0,05$ wurden als nicht signifikant (n.s.) gewertet. Ein p-Wert von $< 0,05$ galt als statistisch signifikant (*), $< 0,01$ als sehr signifikant (**), $< 0,001$ als hochsignifikant (***)

5 Ergebnisse

5.1 Einfluss bakterieller Bestandteile auf die Funktion dendritischer Zellen

Reife dendritische Zellen spielen eine entscheidende Rolle in der Induktion der Graft-versus-Host Reaktion [82, 89, 90]. Da sie im Gastrointestinaltrakt in Kontakt mit unterschiedlichen Bakterien kommen, wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, welchen Einfluss bakterielle Komponenten einzeln bzw. in Kombination auf dendritische Zellen besitzen. Hierfür wurden humane Monozyten *in vitro* sieben Tage mit IL-4 und GM-CSF sowie in An- und Abwesenheit von TGF- β zu unreifen dendritischen Zellen (iDCs) kultiviert. Im Anschluss wurden die bakteriellen Bestandteile Lipopolysaccharid (LPS), Flagellin (Flag), Muramyl-dipeptid (MDP) und Lipoteichonsäure (LTA) und ihre Kombinationen hinzugegeben und die Zellen für zwei Tage inkubiert.

Im Folgenden werden reife dendritische Zellen je nach verwendetem bakteriellen Stimulus benannt: „LPS-DCs“, „Flag-DCs“, „MDP-DCs“, „LTA-DCs“, „LPS+Flag-DCs“, „LPS+MDP-DCs“, „LPS+LTA-DCs“, „MDP+Flag-DCs“ und „MDP+LTA-DCs“.

5.1.1 Zytokinanalysen

Dendritische Zellen sezernieren nach Kontakt zu bakteriellen Zellbestandteilen verstärkt pro- und anti-inflammatorische Zytokine [10]. Bei diesen Zytokinen handelt es sich unter anderem um die Interleukine (IL-) 12, IL-6 und IL-8 sowie Tumornekrosefaktor- α (TNF- α), die eine verstärkte zelluläre Immunantwort induzieren [9, 14, 15, 21, 22, 184]. Das Interleukin 10 hingegen ist ein Modulator des Immunsystems und supprimiert die Sekretion von IL-12 [16–20]. Für die Analyse der Zytokinsekretion wurden humane Monozyten mit 224 U/ml GM-CSF sowie 144 U/ml IL-4 zu unreifen dendritischen Zellen kultiviert und im Anschluss für zwei Tage mit 10 ng/ml LPS, 100 ng/ml Flag, 100 ng/ml MDP und 100 μ g/ml LTA einzeln sowie in der Kombination mit LPS bzw. MDP inkubiert. Danach wurden die Zellkulturen abzentrifugiert und der Überstand mittels „sandwich“-ELISAs quantitativ auf die Zytokine IL-12, IL-10, IL-6, IL-8 und TNF- α untersucht.

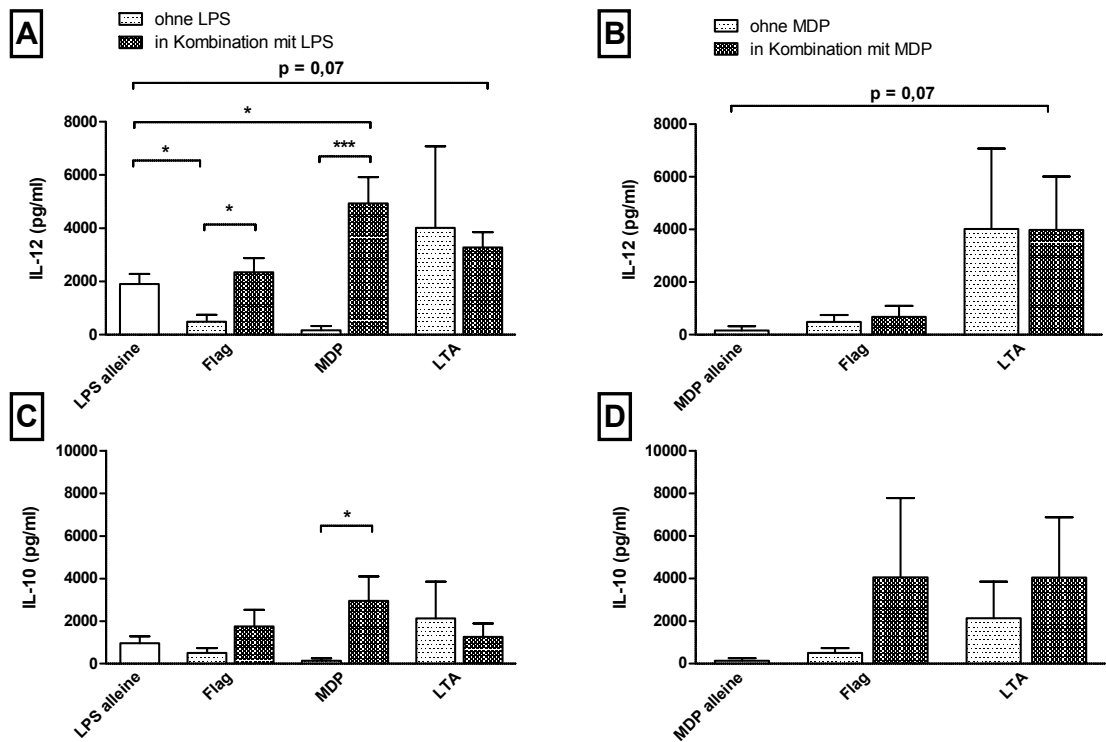


Abb. 5.1: IL-12- und IL-10-Sekretion nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen Aus Monozyten differenzierte iDCs wurden 48 h mit 10 ng/ml LPS, 100 ng/ml Flag, 100 ng/ml MDP und 100 μ g/ml LTA einzeln und in Kombination inkubiert. Im Kulturüberstand wurden die Zytokine mittels ELISA bestimmt. IL-12- und IL-10-Sekretion nach kombinierter Stimulation mit LPS (A) + (C) bzw. MDP (B) + (D). Dargestellt sind die Mittelwerte aus $n = 6$ Experimenten \pm SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-test (unpaired, two-tailed; * $p < 0,05$; *** $p < 0,001$.)

Wie Abbildung 5.1 A verdeutlicht, führte die Kombination von LPS mit verschiedenen bakteriellen Stimuli nur bei MDP zu einer signifikanten Steigerung der IL-12-Sekretion in dendritischen Zellen relativ zu LPS-DCs; LPS+MDP-DCs sezernierten sowohl zu MDP als auch LPS alleine signifikant vermehrt IL-12. Die Kostimulation mit LPS+Flag führte zwar zu einer signifikanten Erhöhung der IL-12-Sekretion im Vergleich zu Flag alleine, gegenüber LPS hingegen ließ sich kein Unterschied in der Produktion von IL-12 beobachten. Die Kombination von LTA mit LPS bewirkte eine zu LPS alleine tendenziell erhöhte IL-12-Konzentration in Zellkulturüberständen (Abb. 5.1 A). Die Kombination von MDP plus Flag bzw. LTA führte gegenüber Flag bzw. LTA alleine zu keiner Veränderung, MDP plus LTA hingegen induzierte im Verhältnis zu MDP alleine tendenziell höhere IL-12-Konzentrationen (Abb. 5.1 B).

Abbildung 5.1 C veranschaulicht, dass die Kombination von LPS mit Flag bzw. MDP eine gegenüber Flag bzw. MDP alleine leichte Erhöhung der IL-10-Konzentration

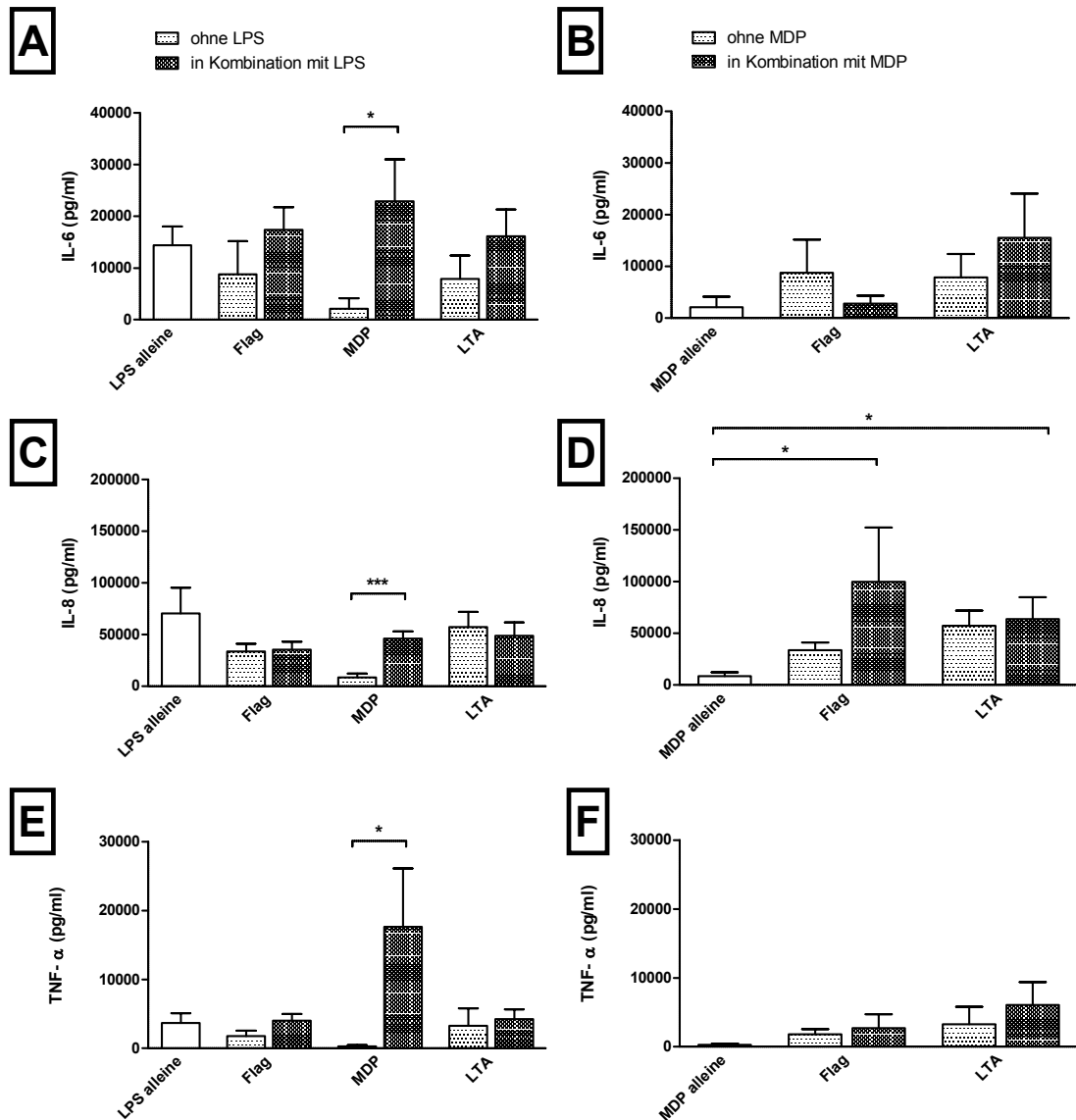


Abb. 5.2: IL-6-, IL-8 und TNF-Sekretion nach Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen Aus Monozyten differenzierte iDCs wurden 48 h mit 10 ng/ml LPS, 100 ng/ml Flag, 100 ng/ml MDP und 100 µg/ml LTA einzeln und in Kombination inkubiert. Im Kulturüberstand wurden die Zytokine mittels ELISAs bestimmt. IL-6-, IL-8 und TNF-Sekretion nach kombinierter Stimulation mit LPS (A) + (C) + (E) bzw. MDP (B) + (D) + (F). Dargestellt sind die Mittelwerte aus n = 6 Experimenten ± SEM. Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-test (unpaired, two-tailed; *p < 0,05.)

herbeiführte. Die Kombination von MDP plus Flag bzw. LTA bewirkte hingegen eine geringfügig gesteigerte IL-10-Produktion im Vergleich zu Flag bzw. LTA alleine (Abb. 5.1 D). Die IL-6-Konzentration in den Kulturüberständen wurde durch LPS plus Flag, MDP bzw. LTA im Vergleich zu Flag, MDP bzw. LTA alleine tendenziell erhöht (Abb. 5.2 A). MDP hingegen reduzierte in Kombination mit Flag und erhöhte in Kombination mit LTA die IL-6-Konzentration tendenziell im Vergleich zu

Flag bzw. LTA alleine (Abb. 5.2 B). Die Kostimulation LPS plus MDP steigerte die Sekretion von IL-8 im Vergleich zu MDP alleine hochsignifikant, während LPS in Kostimulation mit Flag bzw. LTA keinen Effekt auf die IL-8-Konzentration gegenüber den einzelnen bakteriellen Bestandteilen hatte (Abb. 5.2 C). Wie in Abbildung 5.2 D dargestellt, induzierte die Kombination von MDP mit Flag bzw. LTA eine signifikante Konzentrationssteigerung von IL-8 im Vergleich zu MDP, nicht jedoch zu Flag bzw. LTA alleine. Die Konzentration von TNF- α in Kulturüberständen wurde bei der Kombination von LPS mit MDP im Vergleich zu MDP alleine signifikant und im Vergleich zu LPS alleine tendenziell gesteigert. Im Vergleich zu den einzelnen Stimuli Flag bzw. LTA bewirkte die Kombination aus LPS mit Flag bzw. mit LTA keine Änderung der TNF- α -Sekretion (Abb. 5.2 E). Auch die kombinierte Stimulation von Flag bzw. LTA mit MDP verursachte keine Konzentrationsänderung im Vergleich zu Flag bzw. LTA alleine (Abb. 5.2 F).

Insgesamt ist LPS für die untersuchten Zytokine der potenteste Stimulus. Nur in Kombination mit MDP zeigte sich im Falle des IL-12 eine signifikante synergistische Steigerung. Ein Trend für diesen synergistischen Effekt konnte auch in der Sekretion von IL-10 sowie TNF- α , nicht aber bei IL-6 oder IL-8, beobachtet werden. Die Kombination von Flag bzw. LTA mit MDP bewirkte in der Zytokinsekretion keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zu den jeweiligen einzelnen Stimuli, im Verhältnis zu MDP alleine zeigte sich eine tendenziell höhere Produktion der untersuchten Zytokine.

5.1.2 Zytokinanalysen unter TGF- β -Einfluss

Da TGF- β ein wichtiger Faktor in der Induktion tolerogener DCs ist [42], wurde der Einfluss von TGF- β auf die Zytokinsekretion reifer DCs untersucht. Hierfür wurden humane Monozyten mit 224 U/ml GM-CSF, 144 U/ml IL-4 sowie in An- bzw. Abwesenheit von TGF- β sieben Tage lang kultiviert. Die so gewonnenen DCs wurden mit 10 ng/ml LPS, 100 ng/ml Flag, 100 ng/ml MDP und 100 μ g/ml LTA einzeln sowie in Kombination für 48 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurden die Zellkulturen abzentrifugiert und ihr Überstand mittels „sandwich“-ELISAs auf die Zytokine IL-12, IL-10, IL-6, IL-8 und TNF- α untersucht.

DCs, die unter dem Einfluss von TGF- β kultiviert worden sind, sezernierten, unabhängig von ihrer Stimulation mit bakteriellen Bestandteilen, kaum IL-12 (Abb. 5.3 A). Zwar wurde die IL-10-Sekretion durch DCs durch den Einfluss von TGF- β auch vermindert, es zeigte sich aber keine nahezu vollkommene Suppression wie bei IL-12. Daraus lässt sich folgern, dass die Einwirkung von TGF- β zu einer deutlichen Verschiebung des Verhältnisses von IL-12 zu IL-10 in Richtung IL-10 führt. TGF- β

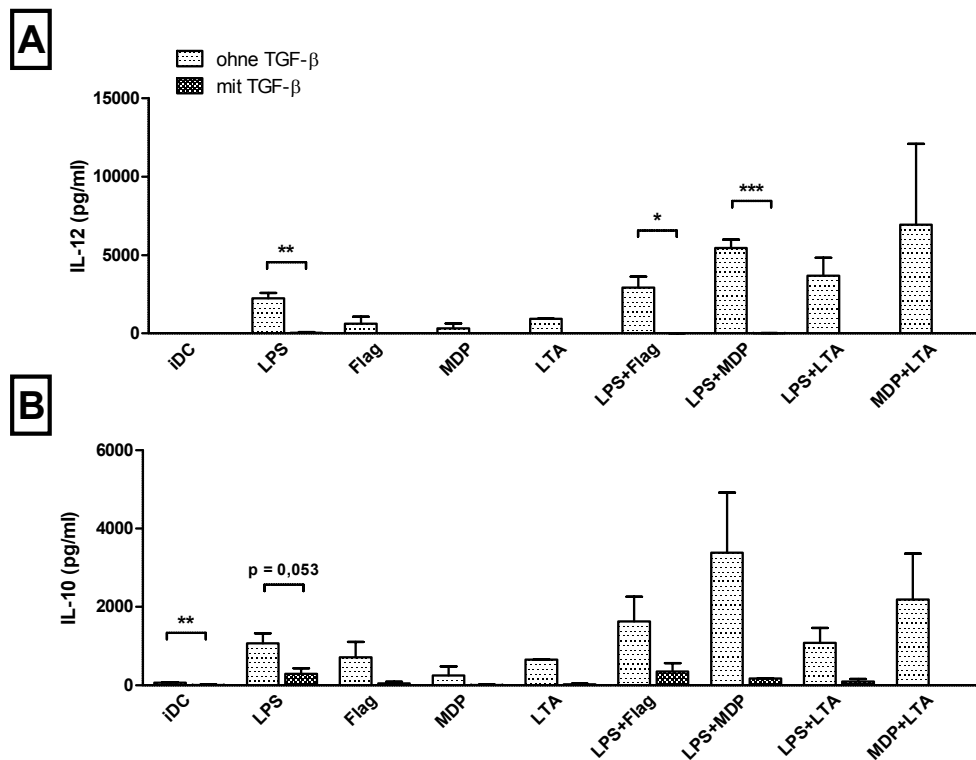


Abb. 5.3: IL-10- und IL-12-Sekretion in Abhängigkeit von der An- und Abwesenheit von TGF- β bei der Kultivierung von DCs Aus Monozyten differenzierte iDCs wurden 48 h mit LPS (10 ng/ml), Flag (100 ng/ml), MDP (100 ng/ml) und LTA (100 μ g/ml) einzeln und in Kombination inkubiert. Die Kulturüberstände wurden mittels ELISAs auf IL-12 (A) und IL-10 (B) analysiert. Abgebildet sind Mittelwerte aus n = 3 Experimenten (für LTA, LPS+LTA und LTA+MDP mit TGF- β n = 2). Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-test (*p < 0,05; **p < 0,01; ***p < 0,001).

zeigte eine schwächere supprimierende Wirkung auf die Sekretion der Zytokine IL-6 und IL-8 (Abb. 5.4 A und B). Die Sekretion von TNF- α durch TGF- β -behandelte DCs zeigte sich gegenüber unbehandelten DCs wiederum tendenziell vermindert (Abb. 5.4 C).

Zusammenfassend sezernierten DCs, die mit TGF- β kultiviert worden sind, deutlich geringere Mengen der untersuchten Zytokine, ausgenommen IL-6 und IL-8. Ferner zeigte sich eine gegenüber IL-12 höhere Sekretion von IL-10 als bei unbehandelten DCs.

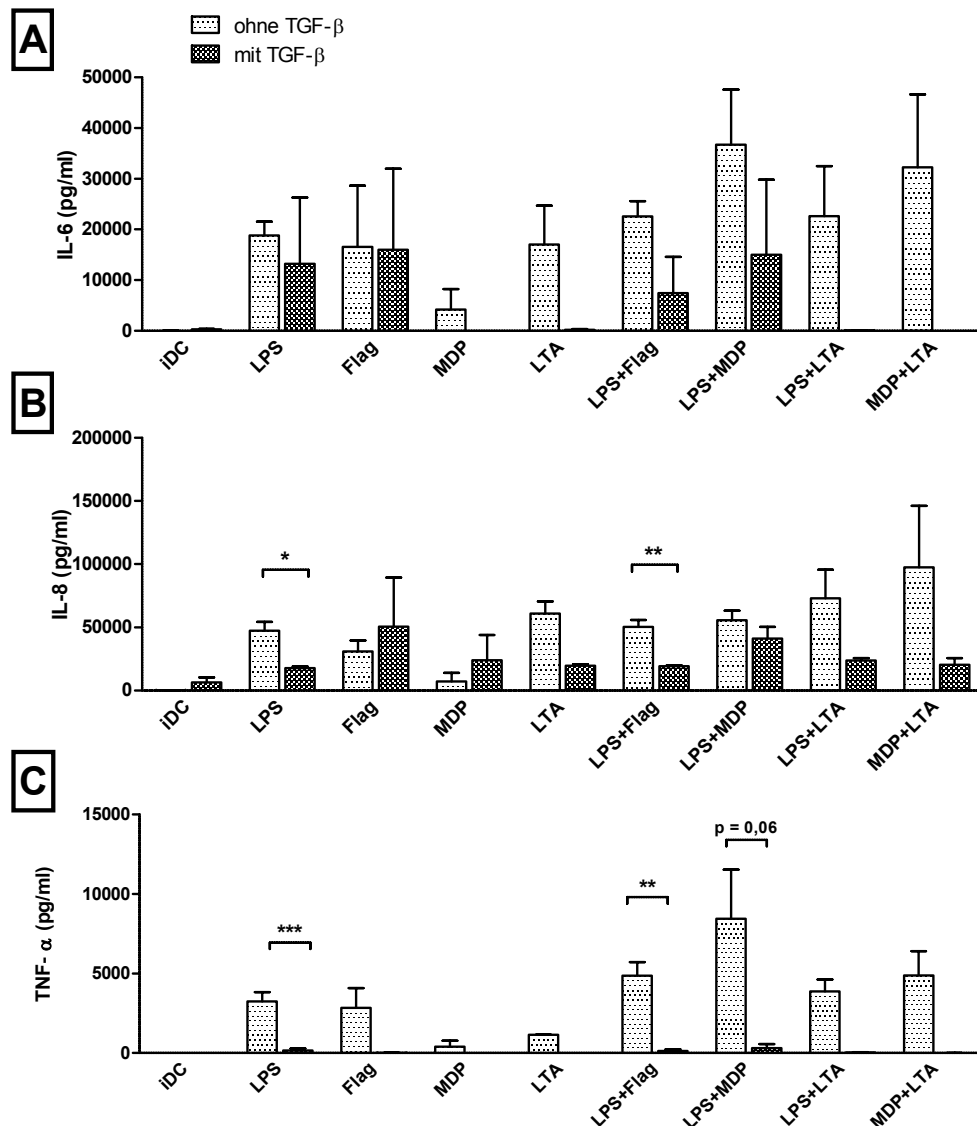


Abb. 5.4: IL6-, IL-8 und TNF-Sekretion dendritischer Zellen unter TGF- β -Einfluss Mit TGF- β 7 Tage lang differenzierte iDCs wurden 48 h mit den bakteriellen Stimuli 10 ng/ml LPS, 100 ng/ml Flag, 100 ng/ml MDP und 100 μ g/ml LTA einzeln und in Kombination gereift. Die Kulturüberstände wurden mittels ELISAs auf IL6, IL8 und TNF analysiert. Abgebildet sind Mittelwerte aus $n \geq 3$ Experimenten \pm SEM (für LTA, LPS+LTA und LTA+MDP mit TGF- β $n = 2$). Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$).

5.1.3 Untersuchung der Signalwege bakterieller Liganden

Der Inhibitor von κ B α ($I\kappa$ B α), die Mitogen-aktivierte Proteinkinase p38 und die Proteinkinase B (Akt) sind zentrale Bestandteile der Signalkaskaden von „Toll-like“ sowie NOD-like Rezeptoren und werden, je nach bakteriellem Liganden, unterschiedlich stark aktiviert. Dies resultiert im Folgenden in einer Aktivierung oder einer Suppression von Transkriptionsfaktoren [8, 44, 46, 48–53, 185]. Zur Analyse des Effekts

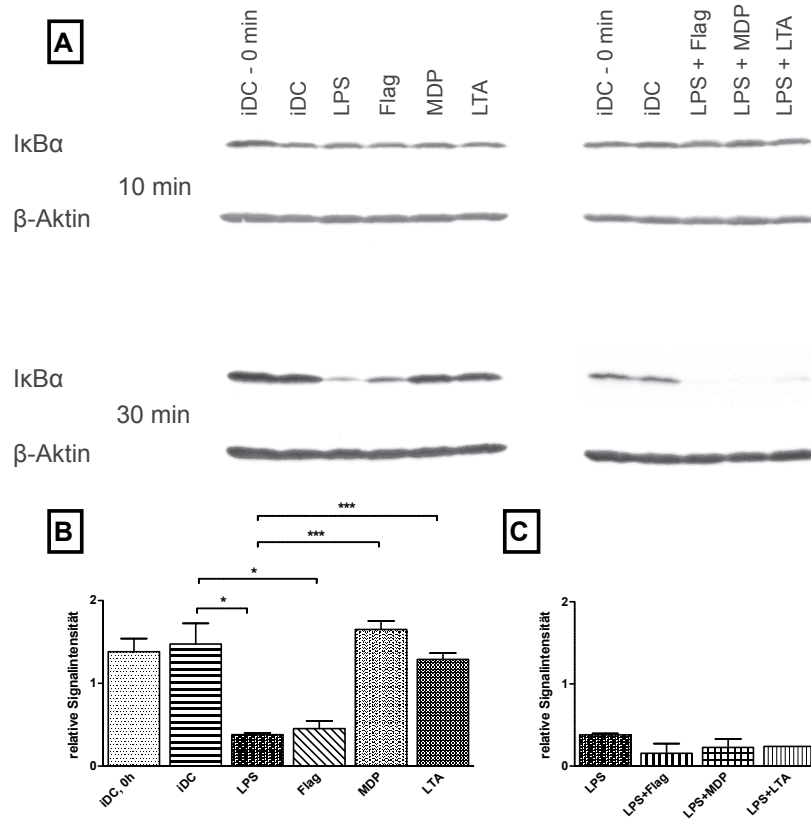


Abb. 5.5: Einfluss von TLR- und NOD2-Liganden auf die Expression von $I\kappa B\alpha$ Aus humanen Monozyten differenzierte iDCs wurden 10 und 30 min mit LPS, Flag, MDP und LTA einzeln und kombiniert gereift. Als Kontrollen dienten 0, 10 und 30 min inkubierte iDCs. Im Proteinlysat wurde die Expression von $I\kappa B\alpha$ mittels Western-Blots (A) analysiert. Densitometrische Analyse der Blots einzelner (B) und kombinierter Stimuli (C). Dargestellt sind Mittelwerte aus den zu β -Aktin relativen Signalintensitäten dreier Experimente \pm SEM (für LTA und LPS+LTA $n = 2$). Die statistische Berechnung erfolgte mittels Student's t-test (* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$).

unterschiedlicher bakterieller Bestandteile auf diese Signalmoleküle wurden aus humanen Monozyten mittels 224 U/ml GM-CSF und 144 U/ml IL-4 sieben Tage lang differenzierte iDCs mit 10 ng/ml LPS, 100 ng/ml Flag, 100 ng/ml MDP, 100 μ g/ml LTA einzeln sowie in Kombination für 10 und für 30 Minuten inkubiert. Als Kontrolle dienten iDCs, die 0, 10 und 30 Minuten ohne Zusatz inkubiert wurden. Danach erfolgte eine Proteinisolierung. Anschließend wurde mittels Western Blots die intrazellulären Mengen von $I\kappa B\alpha$, phospho-p38 (P-p38) sowie phospho-Akt (P-Akt) analysiert und densitometrisch ausgewertet.

Wie die Abbildungen 5.5 A, 5.6 A und 5.7 A verdeutlichen, zeigten sich Unterschiede in den intrazellulären Mengen der Signalproteine nach 30 Minuten am stärksten. Lipopolysaccharid und Flagellin induzierten eine zu iDCs signifikante Inhibition von $I\kappa B\alpha$ und eine deutliche Induktion von phospho-p38 sowie phospho-Akt (Abb. 5.5 B, 5.6 B und 5.7 B). Muramyldipeptid sowie Lipoteichonsäure bewirkten hingegen

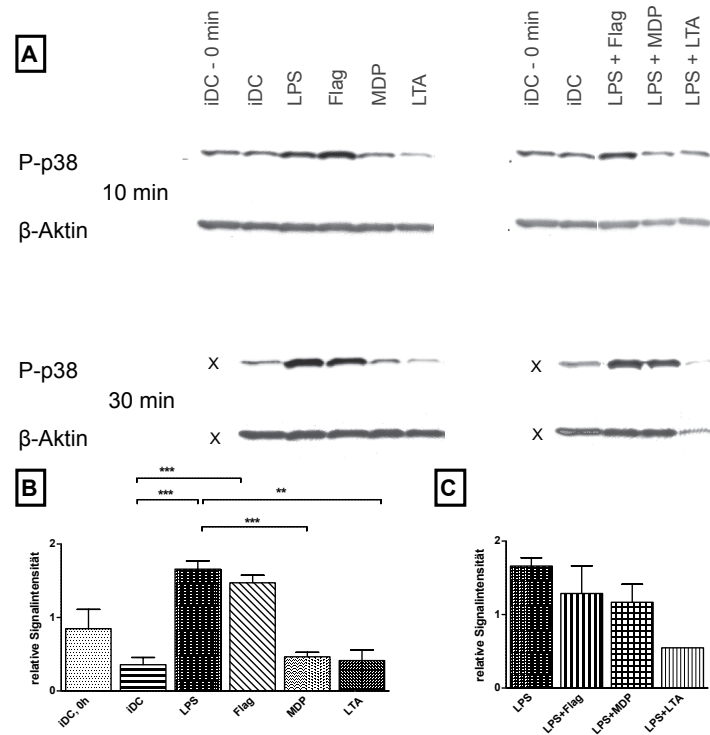


Abb. 5.6: Einfluss von TLR- und NOD2-Liganden auf die Expression von phospho-p38 Aus humanen Monozyten differenzierte iDCs wurden 10 und 30 min mit LPS, Flag, MDP und LTA einzeln und kombiniert gereift. Als Kontrollen dienten 0, 10 und 30 min inkubierte iDCs. Im Proteinlysate wurde die Expression von P-p38 mittels Western-Blots (A) analysiert. Densitometrische Analyse der Blots einzelner (B) und kombinierter Stimuli (C). Dargestellt sind Mittelwerte aus den zu β -Aktin relativen Signalintensitäten dreier Experimente \pm SEM (für LTA und LPS+LTA $n = 2$). Die statistische Berechnung erfolgte mittels Student's t-test (** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Im dargestellten Blot sind mit „X“ markierte Proben nicht gemessen worden.

eine zur unstimulierten Kontrollkultur ähnliche Menge der drei Signalproteine. Die Kombination von LPS mit Flag, MDP bzw. LTA rief ein zu LPS ähnliches Signal hervor (Abb. 5.5 C und 5.7 C). Interessanterweise konnte bei der Kostimulation LPS plus LTA gegenüber LPS alleine tendenziell weniger phospho-p38 detektiert werden, was für einen negativen Effekt von TLR2-Signalen auf den TLR4-induzierten p38-Signalweg spricht (Abb. 5.6 C).

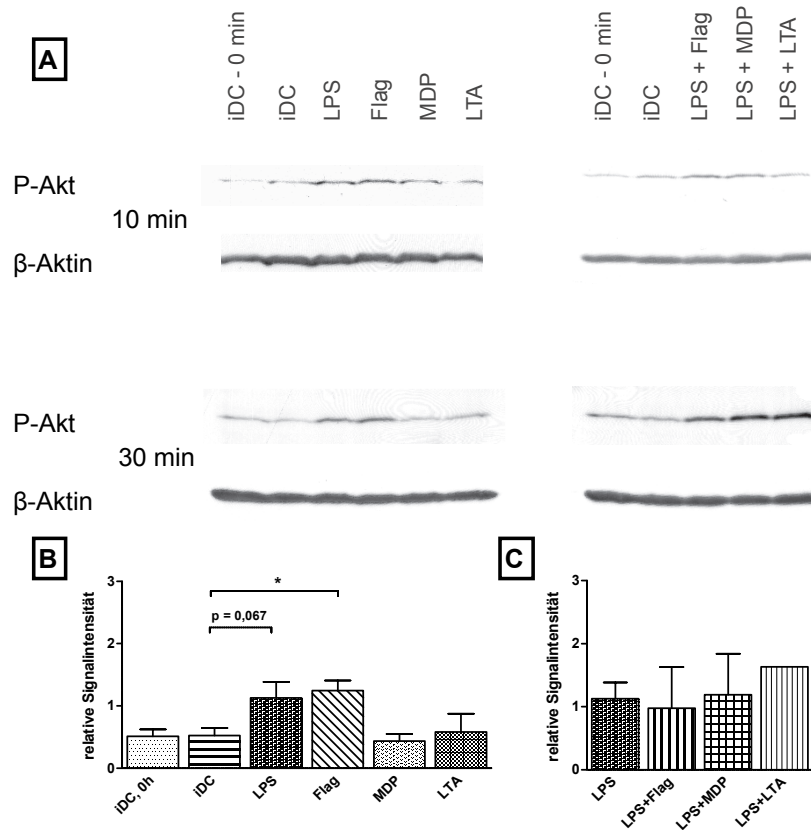


Abb. 5.7: Einfluss von TLR- und NOD2-Liganden auf die Expression von phospho-Akt Aus humanen Monozyten differenzierte DCs wurden 10 und 30 min mit LPS, Flag, MDP und LTA einzeln und kombiniert gereift. Als Kontrollen dienten 0, 10 und 30 min inkubierte iDCs. Im Proteinlysate wurde die Expression von P-Akt mittels Western-Blots (A) analysiert. Densitometrische Analyse der Blots einzelner (B) und kombinierter Stimuli (C). Dargestellt sind Mittelwerte aus den zu β -Aktin relativen Signalintensitäten dreier Experimente \pm SEM (für LTA und LPS+LTA $n = 2$). Die statistische Berechnung erfolgte mittels Student's t-test (* $p < 0,05$).

5.1.4 Analyse der Genexpression in dendritischen Zellen

Vitamin A wird in dendritischen Zellen durch eine Alkoholdehydrogenase zunächst zu Retinal umgewandelt. Um den aktiven Metaboliten Retinsäure aus Retinal herzustellen, exprimieren DCs Retin-Aldehyddehydrogenasen. Es wird zwischen den Retin-Aldehyddehydrogenasen 1 (*RALDH1* bzw. *ALDH1A1*), 2 (*RALDH2* bzw. *ALDH1A2*) und 3 (*RALDH3* bzw. *ALDH1A3*) unterschieden, deren Expression im Mausmodell unter anderem durch TLR-Liganden induziert werden kann [39, 143, 144, 146, 147]. Die dadurch produzierte Retinsäure kann sowohl auto- als auch parakrin die Sekretion pro-inflammatorischer Zytokine reduzieren und die Differenzierung regulatorischer T-Zellen fördern [146, 148, 150]. Ferner wird TGF- β mit Retinsäure ein synergistischer Effekt zugeschrieben [149]. Aus diesem Grund war es interessant, auch die Wirkung von TGF- β auf den Metabolismus von Vitamin A

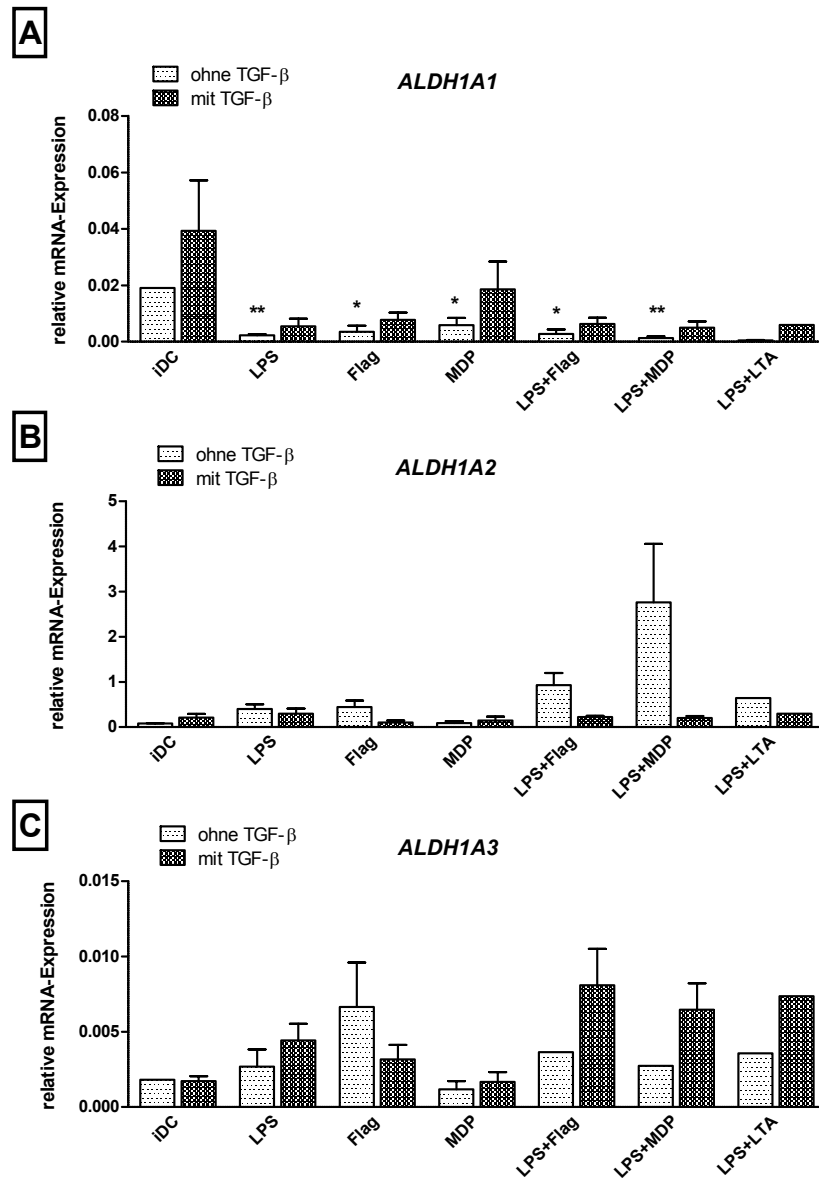


Abb. 5.8: Genexpression der Retin-Aldehyddehydrogenasen in reifen DCs in An- und Abwesenheit von TGF- β Aus humanen Monozyten in An- bzw. Abwesenheit von 10 ng/ml TGF- β 7 Tage lang differenzierte iDCs wurden mit 10 ng/ml LPS, 100 ng/ml Flag, 100 ng/ml MDP sowie 100 μ g/ml LTA einzeln und in Kombination für 48 h gereift. Danach erfolgten eine RNA-Isolierung und eine Polymerase-Kettenreaktion. Dargestellt sind Expressionen von *ALDH1A1* (A), *ALDH1A2* (B) und *ALDH1A3* (C), relativ zur *18S rRNA*-Expression. Abgebildet sind die Mittelwerte aus $n = 3$ Experimenten \pm SEM (für LTA und MDP+LTA $n = 1$). Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-test (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; relativ zu iDCs ohne TGF- β).

zu untersuchen. Um den Einfluss von bakteriellen Stimuli sowie von TGF- β auf die Genexpression der Aldehyddehydrogenasen zu analysieren, wurden humane Monozyten mit 224 U/ml GM-CSF, 144 U/ml IL-4 in An- bzw. Abwesenheit von 10 ng/ml TGF- β sieben Tage lang inkubiert. Die so differenzierten iDCs wurden mit 10 ng/ml LPS, 100 ng/ml Flag, 100 ng/ml MDP und 100 μ g/ml LTA einzeln sowie in Kombi-

nation für 48 Stunden inkubiert. Im Anschluss wurde ihre RNA isoliert und mittels „real-time“ quantitativer Polymerase-Kettenreaktion analysiert. Dabei wurden alle gemessenen Expressionslevel auf die Expression von *18S rRNA* normalisiert.

Alle bakteriellen Liganden lösten eine Herabregulation der *ALDH1A1*-Genexpression im Vergleich zur unstimulierten Kontrollgruppe aus (Abb. 5.8 A). TGF- β -behandelte dendritische Zellen exprimierten gegenüber unbehandelten DCs geringfügig höhere Mengen an *ALDH1A1*-RNA. Wie in Abbildung 5.8 B dargestellt, wurde von stimulierten DCs gegenüber iDCs, ausgenommen MDP-DCs, tendenziell mehr *ALDH1A2* exprimiert, im Vergleich hierzu wiesen TGF- β -behandelte dendritische Zellen weniger *ALDH1A2*-RNA auf. *ALDH1A3* wurde von dendritischen Zellen, die mit LPS oder Flag bzw. der Kombination mit LPS stimuliert wurden, im Vergleich zu iDCs tendenziell erhöht exprimiert. Die Genexpression von *ALDH1A3* wurde in LPS-DCs und LPS plus Flag, MDP bzw. LTA durch die Vorbehandlung mit TGF- β tendenziell weiter erhöht (Abb. 5.8 C). Insgesamt zeigte sich keine deutliche Regulation in der Genexpression von Aldehyddehydrogenasen durch bakterielle Komponenten bzw. TGF- β .

5.1.5 Aktivität von Aldehyddehydrogenasen

Durch die Expression von Retin-Aldehyddehydrogenasen können DCs Retinsäure produzieren, das eine wesentliche Rolle in der Modulation des Immunsystems einnimmt [39, 143, 144, 146, 147].

Anlehnend an die Analyse der Genexpression von Retin-Aldehyddehydrogenasen wurden in vorliegender Arbeit reife DCs auf die Aktivität der Aldehyddehydrogenasen in einer Kinetik untersucht. Hierfür wurden humane Monozyten mit 224 U/ml GM-CSF und 144 U/ml IL-4 sieben Tage lang kultiviert. Die so gewonnenen DCs wurden mit 10 ng/ml Lipopolysaccharid (LPS), 100 ng/ml Flagellin (Flag), 100 ng/ml Muramyldipeptid (MDP) und 100 μ g/ml Lipoteichonsäure (LTA) einzeln und in Kombination für einen, zwei bzw. drei Tage inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden die Zellen für die durchflusszytometrische Bestimmung der Aldehyddehydrogenasen-Aktivität aufgearbeitet. Das ALDEFLUORTM-Kit detektiert die Aktivität der unterschiedlichen ALDH-Familien unspezifisch und stellt sie somit kumulativ dar [145].

Wie Abbildungen 5.9 A und B verdeutlichen, besteht keine signifikante Aktivitätsänderung der Aldehyddehydrogenasen durch den Kontakt zu bakteriellen Bestandteilen. Die Untersuchung der Kinetik ergab eine tendenzielle Erhöhung der Aldehyddehydrogenase-Aktivität in zwei bzw. drei Tage gereiften DCs gegenüber DCs, die nur einen Tag stimuliert wurden. Diese Erhöhung fand sich hingegen nicht

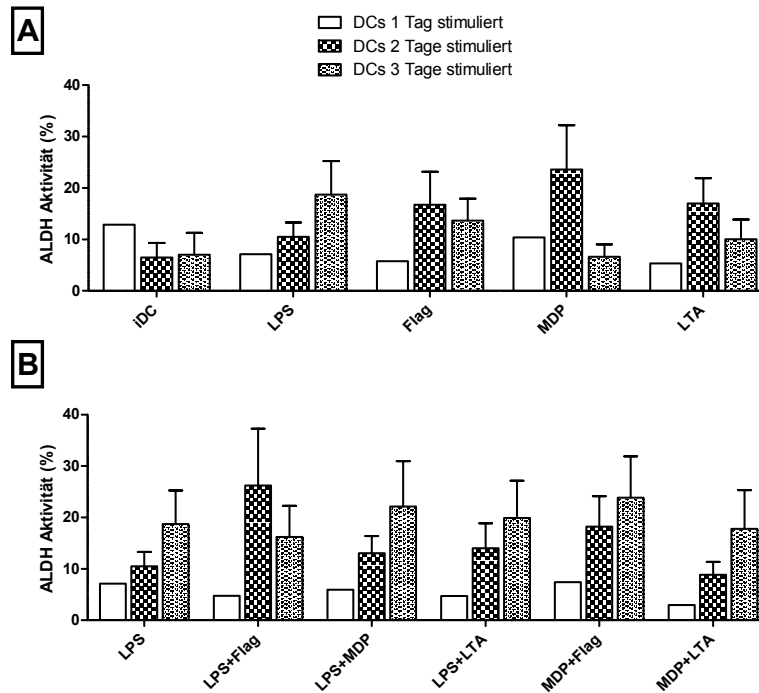


Abb. 5.9: Kinetik der Retin-Aldehyddehydrogenasen-Aktivität Aus humanen Monozyten differenzierte iDCs wurden mit LPS (10 ng/ml), Flag (100 ng/ml), MDP (100 ng/ml) und LTA (100 μ g/ml) und ihren Kombinationen 1, 2 bzw. 3 Tage lang gereift. Im Anschluss wurden die DCs mit Hilfe des ALDEFLUORTM-Assays gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Übersicht über die Kinetik der ALDH-Aktivität reifer DCs, die einzeln (**A**) bzw. in Kombination (**B**) stimuliert wurden. Dargestellt sind die Mittelwerte aus $n \geq 4$ Experimenten \pm SEM (für DCs mit einem Tag Stimulationsdauer $n = 2$). Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-test.

bei unreifen DCs sowie bei MDP-DCs. In Anbetracht der ermittelten *ALDH1A*-Genexpression konnte ferner kein nennenswerter Zusammenhang zwischen Expression und Aktivität der Aldehyddehydrogenasen festgestellt werden.

5.2 Analyse der allogenen T-Zell-Antwort

Reife dendritische Zellen induzieren Proliferation und Differenzierung naiver T-Lymphozyten. In der Graft-versus-Host Reaktion wirkt diese Interaktion zwischen den DCs des Empfängers und den allogenen T-Zellen zum Nachteil des SZT- bzw. KMT-Empfängers. Es kommt durch eine klonale Expansion von T_H1 -Zellen zur Inflammation und Destruktion körpereigener Gewebe [82, 86, 88]. Die vorliegende Arbeit beschäftigte sich aus diesem Grund mit der Möglichkeit, die T-Zell-Antwort zu modulieren. Hierzu wurden sowohl der Einfluss von TLR- und NOD-Liganden, von TGF- β und von den Vitaminvorstufen 25-Hydroxyvitamin D_3 , Retinal und Retinol auf die DC-vermittelte Proliferation und Differenzierung naiver T-Lymphozyten untersucht.

5.2.1 Analysen der T-Zell-Proliferation

5.2.1.1 DC-vermittelte T-Zell-Proliferation in Abhängigkeit von bakteriellen Liganden und Vitaminvorstufen

Im Gastrointestinaltrakt kommen dendritische Zellen in Kontakt mit verschiedenen bakteriellen Bestandteilen und reifen. Im Anschluss migrieren sie in sekundäre lymphatische Organe und induzieren über zellvermittelte Mechanismen sowie kostimulatorische Moleküle eine klonale Expansion der T-Lymphozyten [82–86].

Um den Einfluss der TLRs und des NOD2-Rezeptors auf die DC-vermittelte T-Zell-Proliferation zu untersuchen, wurden humane Monozyten sieben Tage lang mit 224 U/ml GM-CSF und 144 U/ml IL-4 kultiviert. Die so gewonnenen DCs wurden mit unterschiedlichen bakteriellen Bestandteilen (10 ng/ml LPS einzeln oder in Kombination mit 100 ng/ml Flag, 100 ng/ml MDP bzw. 100 μ g/ml LTA) zwei Tage lang inkubiert. Anschließend wurden die reifen DCs in absteigender Konzentration mit 10^5 allogenen T-Lymphozyten für fünf Tage in einer MLR kokultiviert. Da reife DCs wichtige Enzyme zur Produktion von 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 und Retinsäure exprimieren, wurden unter der Annahme, dass DCs Vitaminvorstufen zu ihren aktiven Metaboliten umsetzen [117, 143] und dadurch einen Einfluss auf die T-Zell-Proliferation besitzen könnten, 5×10^{-8} M/ml 25(OH) Vitamin D_3 , 10^{-7} M/ml Retinal, 10^{-7} M/ml Retinol zur Kokultur hinzugegeben. Als Kontrolle diente eine Kokultur aus DCs und T-Zellen. Die Proliferationsrate wurde anhand des ^3H -Thymidineinbaus gemessen. Die Durchführung und die Messung der Proliferationsraten wurden freundlicherweise von Alice Peuker aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Marina Kreutz übernommen.

Wie in Abbildung 5.10 A dargestellt, bewirken LPS-DCs sowie LPS+Flag-DCs, LPS+MDP-DCs bzw. LPS+LTA-DCs ähnliche T-Zell-Proliferationsraten. Auch der Zusatz von Vitaminvorstufen zu den Kokulturen bewirkt keine nennenswerte Än-

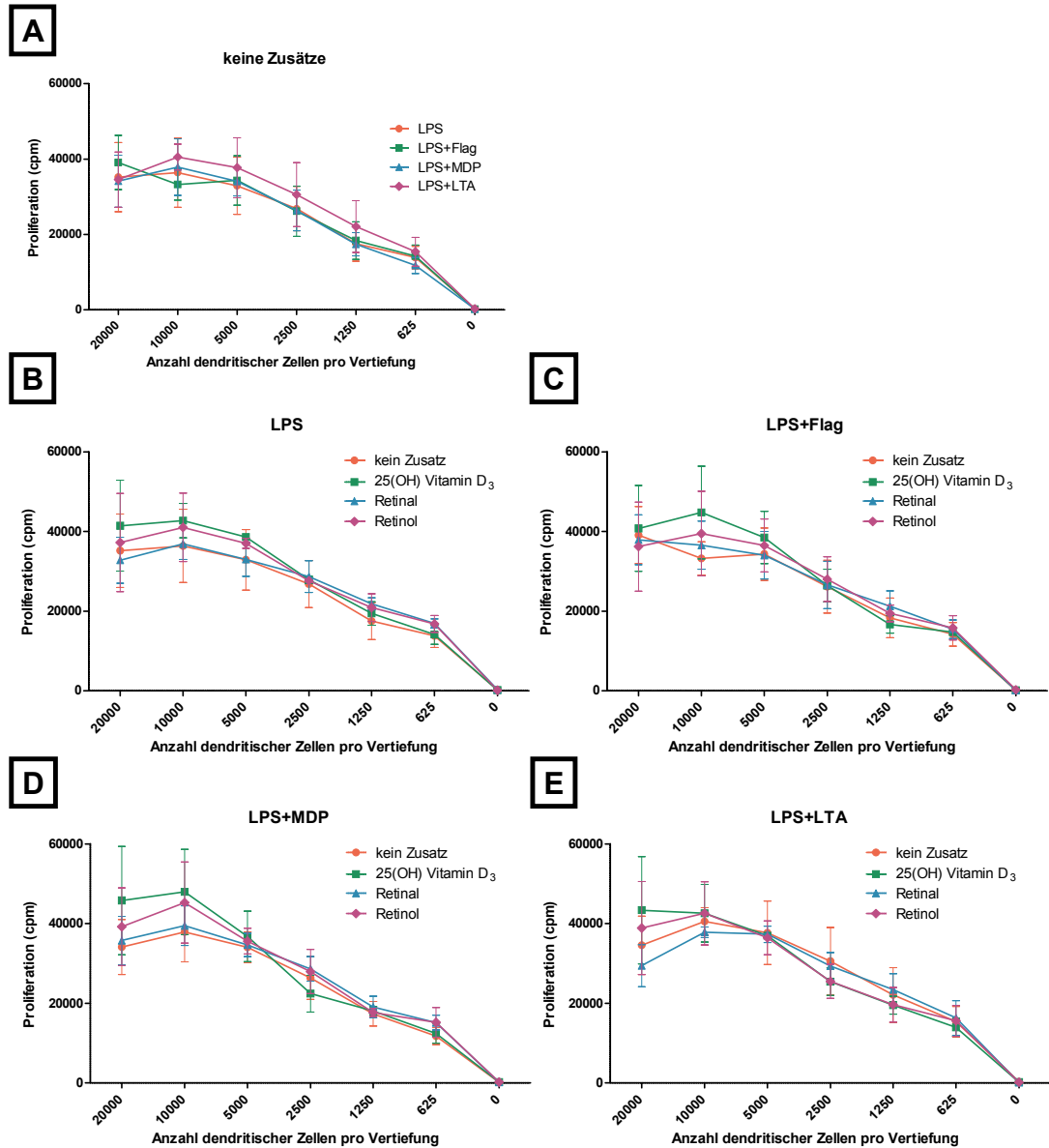


Abb. 5.10: T-Zell-Proliferation in Abhängigkeit von unterschiedlich gereifter DCs bei An- und Abwesenheit von Vitaminmetaboliten Aus humanen Monozyten differenzierte iDCs wurden 48 h mit LPS bzw. seiner Kombination mit Flag, MDP oder LTA gereift. Die reifen DCs wurden in absteigender Konzentration mit 10^5 allogenen T-Zellen und Vitaminvorstufen (25(OH) Vitamin D₃, Retinal, Retinol bzw. ohne Zusatz) 5 Tage kokultiviert. Die Proliferationsrate wurde anhand des ³H-Thymidineinbaus analysiert. Einfluss unterschiedlicher bakterieller Stimuli (**A**) sowie von Vitaminmetaboliten auf die DC-vermittelte T-Zell-Proliferation, abhängig von ihrer Reifung mit LPS (**B**), LPS+Flag (**C**), LPS+MDP (**D**), LPS+LTA (**E**). Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm SEM) von Triplikatmittelwerten aus $n \geq 3$ Experimenten.

derung der Proliferation allogener T-Lymphozyten, unabhängig von der Reifung dendritischer Zellen (Abb. 5.10 B, C, D und E).

5.2.1.2 Einfluss von TGF- β auf die T-Zell-Proliferation

Da TGF- β eine anti-inflammatorische Immunantwort begünstigt, war es an dieser Stelle interessant zu untersuchen, welchen Effekt TGF- β auf die DC-vermittelte klonale Expansion allogener T-Lymphozyten besitzt. Hierfür wurden humane Monozyten mit 224 U/ml GM-CSF und 144 U/ml IL-4 sowie in An- und Abwesenheit von 10 ng/ml TGF- β sieben Tage lang kultiviert und die so gewonnenen DCs im Anschluss mit 10 ng/ml LPS 48 Stunden lang inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurden 2×10^3 und 10^4 DCs mit 10^5 T-Zellen fünf Tage lang kokultiviert. Ferner wurde der Einfluss von Vitaminmetaboliten auf die T-Zell-Proliferation in Gegenwart von TGF- β untersucht, indem 5×10^{-8} M/ml 25(OH) Vitamin D₃, 10^{-7} M/ml Retinal, 10^{-7} M/ml Retinol zur MLR-Kokultur hinzugegeben wurden. Die T-Zell-Proliferation wurde anhand der ³H-Thymidineinbaurate ermittelt. Die Messung der Proliferationsraten wurde freundlicherweise von Alice Peuker aus der Arbeitsgruppe Prof. Dr. Marina Kreutz übernommen.

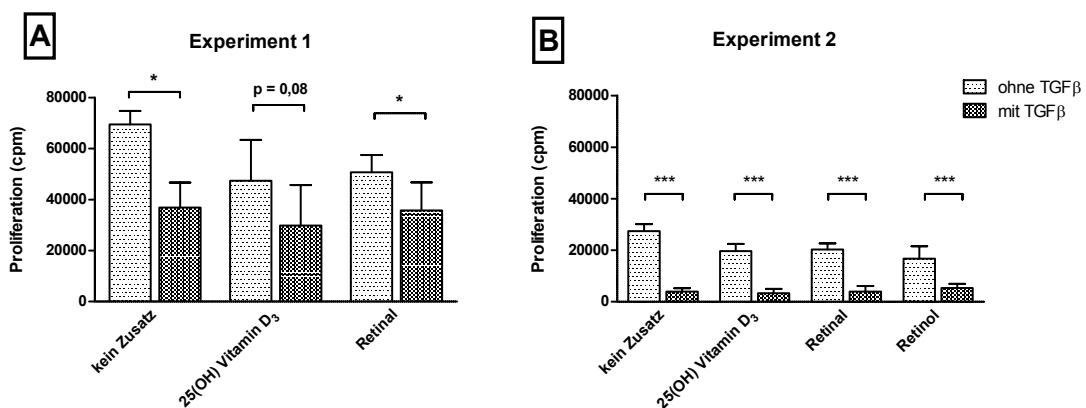


Abb. 5.11: Mit TGF- β kultivierte DCs inhibieren die T-Zell-Proliferation
Aus humanen Monozyten in An- und Abwesenheit von TGF- β differenzierte DCs wurden 48 h mit LPS gereift. Anschließend wurden 10^4 DCs mit 10^5 allogenen T-Lymphozyten und 25(OH) Vitamin D₃, Retinal bzw. Retinol für 5 Tage kokultiviert. Die Proliferationsrate wurde anhand des ³H-Thymidineinbaus analysiert. Dargestellt sind die Mittelwerte von technischen Replikaten (n = 6) zweier Experimente (A) + (B). Die statistische Analyse erfolgte mittels Student's t-test (*p < 0,05; ***p < 0,001)

Wie Abbildung 5.11 verdeutlicht, induzieren TGF- β -kultivierte DCs im Vergleich zu unbehandelten DCs einen deutlichen Unterschied in der T-Zell-Proliferation, unabhängig von den zugesetzten Vitaminvorstufen. Diese Wirkung zeigt sich ebenfalls bei T-Zellen, die mit einer geringeren Menge an DCs kokultiviert wurden (nicht ab-

gebildet). Die T-Zell-Proliferation wird durch den Zusatz der Vitaminmetaboliten hingegen nicht signifikant beeinflusst.

5.2.2 Der Einfluss von Vitaminvorstufen auf T-Zelldifferenzierung unter An- und Abwesenheit von TGF- β

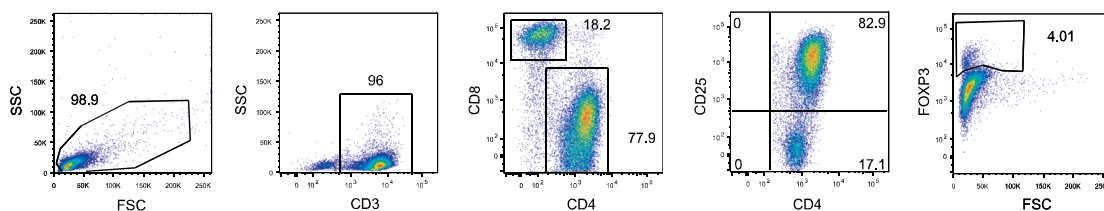


Abb. 5.12: Durchflusszytometrische Analyse von T-Zellen Aus humanen Monozyten differenzierte unreife dendritische Zellen wurden zwei Tage lang mit 10 ng/ml Lipopolysaccharid gereift. 10^4 reife dendritische Zellen wurden mit 10^5 allogenen T-Zellen kokultiviert, anschließend mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Abgebildet ist eine repräsentative Analyse des prozentualen Anteils $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ Zellen aus $n = 13$ unabhängigen Experimenten.

Die aktiven Vitaminmetaboliten 1,25-Dihydroxyvitamin D_3 und Retinsäure können von DCs selbstständig aus ihren Vorgängern 25-Hydroxyvitamin D_3 und Retinal bzw. Retinol synthetisiert werden [39, 119–121, 147, 148]. Beiden Metaboliten wird zugeschrieben, eine DC-vermittelte T_{reg} -Zell-Differenzierung zu induzieren und die Sekretion von IL-2 und IFN- γ zu hemmen [14, 125–129, 146, 149, 150].

Zur Untersuchung des Einflusses von Vitaminvorstufen und TGF- β auf die Differenzierung naiver T-Lymphozyten wurden humane Monozyten mit 224 U/ml GM-CSF, 144 U/ml IL-4 und in An- bzw. Abwesenheit von 10 ng/ml TGF- β sieben Tage lang differenziert. Die so gewonnenen DCs wurden 48 Stunden mit 10 ng/ml LPS inkubiert. Danach wurde eine MLR mit 10^4 LPS-DCs und 10^5 allogenen T-Zellen sowie mit 5×10^{-8} M/ml 25(OH) Vitamin D_3 , 10^{-7} M/ml Retinal, 10^{-7} M/ml Retinol bzw. keinem Zusatz für fünf bis sieben Tage durchgeführt. Im Anschluss wurde eine Antikörperfärbung durchgeführt und die prozentualen Anteile von $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ sowie IL-2 $^+$ und IFN- γ^+ der $CD4^+$ und $CD8^+$ T-Zellen durchflusszytometrisch ermittelt. Abbildung 5.12 zeigt eine repräsentative Analyse der durchflusszytometrischen Ergebnisse.

Wie Abbildung 5.13 A veranschaulicht, induzierte 25-Hydroxyvitamin D_3 eine gegenüber der Kontrollkultur tendenziell erhöhte Differenzierung von $CD4^+CD25^+FOXP3^+$ -Zellen. Ferner führte es zu einem tendenziell geringeren Anteil Interferon- γ^+ und Interleukin 2 $^+$ T-Zellen (Abb. 5.13 B, C und D). Die Vitamin A-Vorstufen Retinal und Retinol hatten keinen Effekt auf die T-Lymphozyten (Abb. 5.13).

Unter TGF- β differenzierte DCs induzierten unter CD4⁺ T-Zellen eine signifikante Erhöhung des Anteils CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ und einen deutlich geringeren Anteil IL-2⁺ sowie IFN- γ ⁺ CD4⁺ T-Zellen, unabhängig vom Zusatz (Abb. 5.13).

25-Hydroxyvitamin D₃ reduzierte den Anteil IL-2⁺ und IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen (Abb. 5.14). Retinal sowie Retinol hatten dagegen keinen Effekt. In den Kokulturen mit TGF- β -DCs waren tendenziell weniger IFN γ ⁺ bzw. IL-2⁺ CD8⁺ T-Zellen vorhanden (Abb. 5.14).

Des Weiteren wurde untersucht, ob eine vergleichbare Induktion FOXP3⁺ T-Zellen erreicht wird, wenn TGF- β statt zur DC-Differenzierung an Tag „0“ zur MLR-Kokultur an Tag „9“ hinzugegeben wird. Hierfür wurden humane Monozyten mit 224 U/ml GM-CSF, 144 U/ml IL-4 und in An- bzw. Abwesenheit von 10 ng/ml

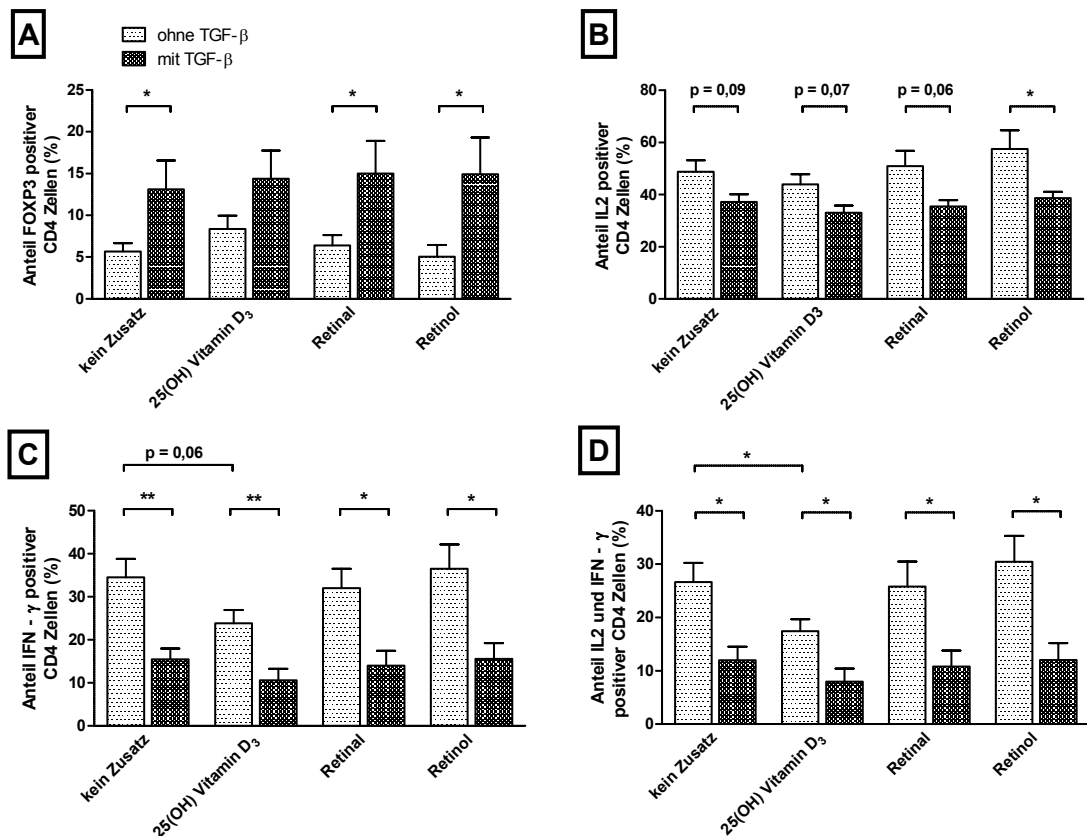


Abb. 5.13: TGF- β -behandelte DCs erhöhen den Anteil FOXP3⁺ Zellen und supprimieren den Anteil IL-2⁺ sowie IFN- γ ⁺ in CD4⁺ T-Zellen Aus humanen Monozyten in An- und Abwesenheit von 10 ng/ml TGF- β 7 Tage differenzierte DCs wurden 48 h mit LPS gereift. Danach wurden 10⁴ DCs und 10⁵ allogenen T-Zellen ohne Zusatz, mit 25(OH) Vitamin D₃, Retinal bzw. Retinol für 5 bis 7 Tage kokultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil FOXP3⁺ (A), IL-2⁺ (B), IFN- γ ⁺ (C) und IL-2 sowie IFN- γ ⁺ (D) CD4⁺ T-Zellen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus n \geq 6 Experimenten \pm SEM. Die statistische Berechnung erfolgte mittels Student's t-test (*p < 0,05; **p < 0,01).

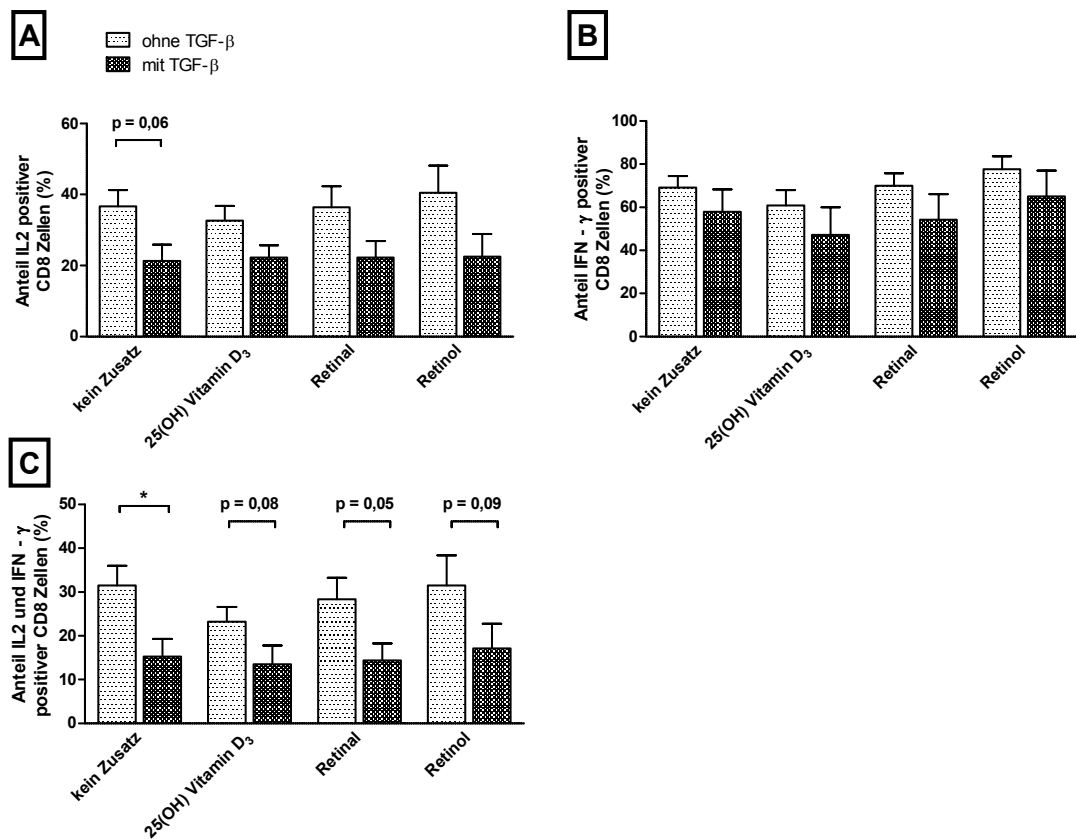


Abb. 5.14: TGF- β -behandelte DCs erniedrigen den Anteil von IL-2⁺ und IFN- γ ⁺ CD8⁺ T-Zellen Aus humanen Monozyten in An- und Abwesenheit von 10 ng/ml TGF- β differenzierte DCs wurden 48 h mit LPS gereift. Danach wurden 10⁴ DCs und 10⁵ allogenen T-Zellen mit keinem Zusatz, 25(OH) Vitamin D₃, Retinal bzw. Retinol für 5 bis 7 Tage kokultiviert. Im Anschluss wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Dargestellt ist der prozentuale Anteil IL-2⁺ (A), IFN- γ ⁺ (B) und sowohl IL-2 als auch IFN- γ ⁺ (C) CD8⁺ T-Zellen. Abgebildet sind die Mittelwerte aus n \geq 6 Experimenten \pm SEM. Die statistische Berechnung erfolgte mittels Student's t-test (*p < 0,05).

TGF- β (Zugabe an Tag „0“) sieben Tage inkubiert. Die differenzierten DCs wurden 48 Stunden mit 10 ng/ml LPS gereift. Daraufhin wurden 10⁴ TGF- β -DCs bzw. 10⁴ ohne TGF- β differenzierte DCs mit 10⁵ allogenen T-Zellen mit unterschiedlichen Zusätzen (5×10^{-8} M/ml 25(OH) Vitamin D₃, 10⁻⁷ M/ml Retinal bzw. 10⁻⁷ M/ml Retinol) und in An- oder Abwesenheit von TGF- β (Zugabe an Tag „9“) kokultiviert. Nach fünf bis sieben Tagen Inkubationszeit erfolgte eine Antikörperfärbung und eine durchflusszytometrische Analyse auf CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ T-Zellen.

Wie Abb. 5.15 darstellt, induzierten TGF- β -behandelte DCs eine deutlich erhöhte Differenzierung FOXP3⁺ T-Zellen, als DCs, denen TGF- β erst an Tag „9“ zur MLR-Kultur zugegeben worden ist. Diese Ergebnisse implizieren, dass TGF- β durch den Einfluss auf die DC-Differenzierung einen maßgeblichen tolerogenen Effekt auf die

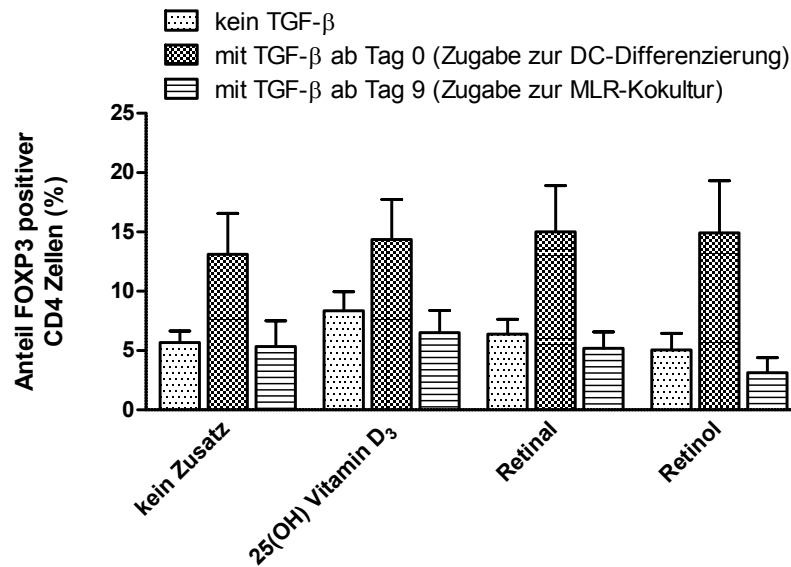


Abb. 5.15: Der Effekt von TGF- β auf die Differenzierung von T_{reg} Zellen in Abhängigkeit vom Zeitpunkt der Zugabe Aus humanen Monozyten differenzierte DCs wurden 48 h mit LPS gereift. Im Anschluss wurden 10^4 DCs und 10^5 allogene T-Zellen mit 25(OH) Vitamin D₃, Retinal, Retinol bzw. keinem Zusatz kokultiviert. TGF- β wurde entweder an Tag „0“ zur DC- oder an Tag „9“ zur MLR-Kultur hinzugegeben. Als Kontrolle dienten DC- und MLR-Kulturen ohne TGF- β -Zusatz. Im Anschluss wurden die Zellen mit Antikörpern gefärbt und durchflusszytometrisch analysiert. Die Abbildungen zeigen den prozentualen Anteil IL-2⁺ (A), IFN- γ ⁺ (B) sowie IL-2⁺IFN- γ ⁺ (C) CD8⁺ T-Zellen abhängig vom Zeitpunkt der TGF- β -Zugabe. Abgebildet sind Mittelwerte aus $n \geq 3$ Experimenten \pm SEM.

allogene T-Zell-Reaktion besitzt. Die Zugabe von TGF- β zur Interaktion zwischen DCs und T-Zellen und somit zur T-Zell-Aktivierung führt zu keinem kurzzeitigen Effekt auf die zellvermittelte Immunantwort.

Insgesamt zeigt TGF- β den größten Einfluss auf die DC-vermittelte T-Zell-Antwort durch seine Wirkung auf die Differenzierung dendritischer Zellen. Im Vergleich zu reifen DCs bewirken TGF- β -behandelte DCs keine Erhöhung der T-Zell-Proliferation. Ferner reduzieren die den Anteil der für die inflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-2 positiven CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen und induzieren eine erhöhte Differenzierung FOXP3⁺, also T_{reg} -Zellen. Einen vergleichbaren Effekt konnten weder 25(OH) Vitamin D₃, noch Retinal bzw. Retinol hervorrufen. LPS und seine Kombination mit anderen TLR- und NOD2-Liganden zeigten keinen Einfluss auf die T-Zell-Proliferation.

6 Diskussion

Bis heute ist die Graft-versus-Host Reaktion (GvH-Reaktion, GvHD) eine gefürchtete Komplikation von Stammzellen- und Knochenmarktransplantationen. Dabei spielt die Translokation bakterieller Komponenten durch eine geschädigte Epithelbarriere und die durch sie induzierte Reifung dendritischer Zellen (*dendritic cells*, DCs) eine wesentliche Rolle in der Induktion der GVH-Reaktion [82]. Im Folgenden induzieren diese reifen dendritischen Zellen die allogene T-Zell-Antwort, die für den zytotoxischen Gewebeuntergang verantwortlich ist. Den reifen DCs stehen tolerogene DCs (tDCs) gegenüber, die eine überschießende Immunreaktion reduzieren oder sogar verhindern können [23–26].

Aus diesem Grund befasste sich die vorliegende Arbeit mit der Generierung tolerogener dendritischer Zellen *in vitro*. Hierbei wurden die Effekte von kombinierten bakteriellen Bestandteilen auf die Funktion dendritischer Zellen, die Wirkung von Vitamin A-Metaboliten auf die DC-vermittelte T-Zell-Antwort sowie der Einfluss von TGF- β auf die Tolerogenität dendritischer Zellen untersucht.

6.1 Einfluss bakterieller Liganden auf die Reifung dendritischer Zellen

Durch den Kontakt zu bakteriellen Bestandteilen reifen dendritische Zellen und führen zu einer inflammatorischen T-Zell-Antwort. Da *in vivo* zumeist Mischpopulationen unterschiedlicher Bakterien vorzufinden sind, lag es nahe, den Effekt von kombinierten bakteriellen Komponenten auf dendritische Zellen zu analysieren. Dabei wurden die Zytokinsekretion der pro-inflammatorischen Zytokine Interleukin (IL-) 12, IL-6, IL-8 sowie Tumornekrosefaktor (TNF-) α und des anti-inflammatorischen Zytokins IL-10 untersucht. Des Weiteren wurde der Einfluss der bakteriellen Stimuli auf die Aktivierung der NF κ B-, MAP-Kinase p38- sowie Proteinkinase B (Akt)-Signalwege analysiert.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass der TLR4-Ligand Lipopolysaccharid (LPS) am effizientesten die Reifung von Monozyten abstammenden dendritischer Zellen bezüglich der Sekretion inflammatorischer Zytokine sowie der Induktion der oben genannten Signalkaskaden beeinflusste. Dies steht in Einklang mit bisher publizierten Arbeiten, die in der Literatur zu finden sind [66, 186–188]. Flagellin

(Flag, TLR5-Ligand) induzierte in unseren Versuchen eine gegenüber LPS stark verminderte Zytokinsekretion, was mit den Ergebnissen von Means et al. und Dowling et al. übereinstimmt [187, 189]. Zwar konnten Tsujimoto et al. zeigen, dass Flagellin ein potenter Stimulus zur DC-Reifung ist, sie setzten jedoch murine Knochenmark-abstammende DCs (*bone marrow-derived dendritic cells*, BMDCs) und eine zehnbis hundertfach höhere Flag-Konzentration in ihren Versuchen ein [190]. Die Untersuchung des Effektes des NOD2-Rezeptorliganden Muramyldipeptid (MDP) alleine auf dendritische Zellen zeigte keine deutliche Induktion von pro-inflammatorischen Zytokinen sowie Induktion unterschiedlicher Signalwege. Das impliziert die wichtige Rolle von MDP in der Erhaltung eines unreifen Phänotyps dendritischer Zellen und somit ihrer Tolerogenität. Diese Erkenntnisse korrespondieren mit der aktuellen Literatur [66, 68]. Lipoteichonsäure (LTA, TLR2-Ligand) zeigte eine zu LPS ähnliche Induktion der Signalprotein- und Zytokinproduktion in DCs. Im Gegensatz hierzu fanden Kim et al. unter LTA-Stimulation unreifer dendritischer Zellen fehlende Reifungsmerkmale sowie geringe Produktion der Zytokine TNF- α , IL-12 und IL-10 [65]. Im Unterschied zu unseren Versuchen jedoch zogen Kim et al. andere Kultivierungs- und Differenzierungsschemata sowie eine gegenüber unseren Experimenten zehnbis hundertfach geringere Konzentration an LTA heran.

In unseren Experimenten resultierte die Kombination von LPS mit Flag in zu LPS vergleichbaren Zytokinprofil sowie Expression der Signalproteine. Dies entspricht den Beobachtungen von Mäkelä et al., obwohl im Vergleich zu uns in ihren Versuchen LPS in einer zehnfach und Flag in einer fünffach höheren Konzentration eingesetzt worden ist [191].

In den Arbeiten von Fritz et al., Tada et al. und Magalhaes et al. wurde eine synergistische Induktion der pro-inflammatorischen Zytokinsekretion von dendritischen Zellen durch LPS+MDP verzeichnet [66, 68, 192]. Unsere Untersuchungen zeigen auch eine tendenzielle synergistische Induktion von IL-12 und TNF- α sowie IL-10, obgleich die genannten Arbeitsgruppen entweder verschiedene Zellpopulationen oder einen anderen Stimulus einsetzten (Fritz et al. verwendeten myeloide DCs [66], Magalhaes et al. murine DCs [68] und Tada et al. das synthetische Lipid A als TLR4-Liganden [192]).

Die Kombination LPS+LTA bewirkte in unseren Experimenten eine zu LPS-DCs ähnliche Zytokinproduktion sowie Aktivierung der NF κ B- und Akt-Signalkaskaden. Die Kostimulation induzierte jedoch eine gegenüber LPS alleine geringere Induktion der MAP-Kinase p38, was eine inhibitorische Wirkung von LTA auf diesen LPS-induzierten Signalweg impliziert. Sato et al. konnten feststellen, dass der TLR2-Signalweg die Expression von TLR4 in Makrophagen herunterreguliert [47]. Dies

bestätigt, wenn auch in einem anderen Zelltyp, unsere Ergebnisse. Dem gegenüber stehen die Daten von Hirata et al., die im Vergleich zur alleinigen TLR4-Stimulation eine synergistisch erhöhte Induktion der p38-MAP-Kinase und der IL-10-Sekretion durch die kombinierte Stimulation dendritischer Zellen mit TLR4- und TLR2-Liganden feststellten. Jedoch wurden in den genannten Arbeiten murine BMDCs und Pam₃CSK₄ als TLR2-Ligand eingesetzt [64].

Die Kombination MDP+LTA bewirkte eine im Vergleich zu MDP alleine erhöhte und zu LTA alleine ähnliche Zytokinsekretion. Synergistische Effekte dieser Kombination, wie sie von Kim et al. und Netea et al. beschrieben werden, konnten nicht festgestellt werden. Allerdings setzten Kim et al. LTA in einer zehnfach bis hundertfach geringerer und MDP in einer bis zu zehnfach höherer Konzentration als wir und Netea et al. den TLR2-Liganden Pam₃Cys-KKKK ein [65, 67].

Die Fähigkeit, durch den Kontakt zu einzelnen TLR-Liganden gereifter dendritischer Zellen T-Zellen zu aktivieren und ihre Expansion zu induzieren, wurde von unterschiedlichen Autoren beschrieben [45, 193–195]. Im Bezug auf diese T-Zell-Interaktion war es von Interesse, den Effekt von kombinierten bakteriellen Komponenten auf die DC-vermittelte Proliferation allogener T-Zellen mittels einer *mixed lymphocyte reaction* (MLR) zu untersuchen. Hierbei konnten im Vergleich zu LPS keine synergistischen Effekte auf die T-Zell-Proliferation durch LPS+Flag, LPS+MDP bzw. LPS+LTA festgestellt werden. Dies impliziert, dass die T-Zell-Interaktion durch LPS nicht durch die anderen bakteriellen Bestandteile verstärkt oder vermindert werden kann.

6.2 Vitamin A/D-Metabolismus in humanen dendritischen Zellen und sein Einfluss auf die T-Zell-Antwort

Retinsäure werden unterschiedliche Eigenschaften zugeschrieben. Einerseits kann es pro-inflammatorische Immunreaktionen unterstützen [39, 156–159], andererseits wurden anti-inflammatorische Effekte beobachtet [14, 146, 148–151, 153–155]. Im Rahmen der Graft-versus-Host Reaktion bestehen bezüglich Retinsäure auch gegensätzliche Aussagen. Einerseits zeigt sich in den Experimenten von Chen et al. unter dem Einfluss des Retinsäure-Agonisten eine Exazerbation [75], andererseits wurde bei Nishimori et al. durch denselben Agonisten auch eine Abschwächung der gastrointestinalen GvH-Reaktion beschrieben [163]. Beide Studien wurden an Mausmodellen durchgeführt, Chen et al. untersuchten dabei den Effekt von Retinsäure auf die akute, Nishimori et al. auf die chronische GvH-Reaktion. Aufgrund der wi-

dersprüchlichen Aussagen bleibt die Untersuchung von Vitamin A Mittelpunkt zahlreicher Studien.

Durch die Expression der 25-Hydroxyvitamin D₃-1 α -Hydroxylase auf den Kontakt zu bakteriellen Bestandteilen hin besitzen DCs die Fähigkeit, 25(OH) Vitamin D₃ zu 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ umzuwandeln [118, 120, 196]. Der Einfluss der Vitamin D-Metaboliten befähigt sie, regulatorische T-Zellen zu induzieren und die T_H1-Zell-Antwort zu inhibieren [16]. Bezüglich humaner dendritischer Zellen und der Wirkung der Vitamin A-Metaboliten Retinal und Retinol gibt die aktuelle Literatur wenig Aufschluss. Aus diesem Grund war es interessant, den Metabolismus von Vitamin A in DCs und seinen Effekten auf die allogene T-Zell-Antwort zu untersuchen. Unterschiedliche Autoren beschreiben eine durch den Kontakt zu bakteriellen Bestandteilen ausgelöste Induktion der Kapazität dendritischer Zellen, Retinsäure zu produzieren [39, 143, 147, 197]. Manicassamy et al. konnten eine TLR2-, aber nicht TLR4-abhängige Induktion der *ALDH1A1* und *1A2*-Genexpression sowie eine Produktionserhöhung von Retinsäure durch DCs feststellen [146]. Allerdings wurden in ihren Versuchen murine DCs und Zymosan als TLR-Ligand eingesetzt. Villablanca et al. konnten eine Induktion der *ALDH1A2*-Expression durch den TLR2-Liganden Pam₃CSK₄ in murinen DCs zeigen [197]. Hurst et al. hingegen konnten in murinen dendritischen Zellen eine Herunterregulation der *ALDH1A*-Genexpression sowie der Aktivität der Aldehyddehydrogenasen als Reaktion auf den Kontakt zu parasitären Bestandteilen verzeichnen [198].

Die im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Experimente zeigten, dass durch die Reifung humaner dendritischer Zellen, im Unterschied zu Vitamin D, keine nennenswerte Regulation des Vitamin A-Metabolismus stattfindet. Es fand sich keine deutliche Korrelation zwischen der Reifung dendritischer Zellen und der Genexpression sowie der Aktivität der Retin-Aldehyddehydrogenasen. Dies konnte auch von der Arbeitsgruppe Molenaar et al. festgestellt werden, die murine BMDCs auf die TLR-induzierte *RALDH*-Expression untersuchten [199]. In unseren Versuchen veränderte sich die ALDH-Aktivität ferner nicht in Abhängigkeit der ein-, zwei- bzw. dreitägigen Stimulationsdauer mit bakteriellen Liganden. Zwar konnten Hurst et al. in Mäusen, die einer parasitäre Infektion ausgesetzt worden sind, eine zeitlich abhängige Aktivitätsänderung der Aldehyddehydrogenasen beobachten, diese fand jedoch erst nach 42 Tagen *post infectionem* statt [198]. Überdies stellten sie fest, dass sich der Anteil ALDH⁺ DCs nicht signifikant veränderte, wenn eine zu geringe Konzentration an parasitären Bestandteilen eingesetzt worden ist [198]. In Anbetracht dieser Tatsache wäre es für zukünftige Untersuchungen interessant, die

durch TLR- und NOD-Liganden induzierte ALDH-Aktivität in Abhängigkeit der eingesetzten Konzentrationen zu untersuchen.

Darüber hinaus konnte in unseren Experimenten kein Einfluss der Retinsäure-Vorstufen Retinal und Retinol auf die T-Zell-Proliferation sowie die -Differenzierung festgestellt werden. In Zusammenschau der Ergebnisse ist anzunehmen, dass humane dendritische Zellen weder durch ihre Reifung noch durch das Beisein der Vitamin A-Vorstufen ausreichend Retinsäure produzieren, um eine Wirkung auf die T-Zell-Antwort zu besitzen. Die unterschiedlichen Aussagen der Literatur und der vorliegenden Dissertation implizieren, dass sich nicht alle Erkenntnisse bezüglich des Retinsäure-Metabolismus aus Mausmodellen problemlos auf den Menschen übertragen lassen [197, 200, 201].

Es ist bekannt, dass dendritische Zellen durch die Expression der 25-Hydroxyvitamin D₃-1 α -Hydroxylase 25-Hydroxyvitamin D₃ in seinen aktiven Metaboliten 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ überführen können [120, 196]. Unter dem Einfluss von 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ können dendritische Zellen eine verstärkte Induktion regulatorischer T-Zellen bewirken, die eine wesentliche Rolle in der Abmilderung der GvHD einnehmen [127, 128, 130–134, 202]. Ferner sind reduzierte Konzentrationen von sowohl 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ als auch seinem Vorgänger 25-Hydroxyvitamin D₃ mit einem erhöhten Risiko assoziiert, eine schwere GvH-Reaktion zu entwickeln [135, 203]. Im Hinblick auf diese Erkenntnisse untersuchten wir reife DCs auf ihre Fähigkeit hin, durch die Metabolisierung von 25(OH) Vitamin D₃ die T-Zell-Antwort zu modulieren.

Während sich bei der Untersuchung der DC-vermittelten T-Zell-Proliferation unter 25(OH) Vitamin D₃ kein nennenswerter Effekt beobachten ließ, konnte im Bezug auf die Differenzierung FOXP3⁺ T_{reg}-Zellen ein Trend zur Induktion durch den Vitaminmetaboliten festgestellt werden. Ferner induzierten DCs im Beisein von 25-Hydroxyvitamin D₃ eine deutlich geringere Sekretion von IL-2 und IFN- γ durch T-Lymphozyten als DCs ohne den Vitaminvorgänger. Jeffery et al. konnten auch eine DC-vermittelte erhöhte Induktion FOXP3⁺ T-Zellen sowie verminderte Produktion inflammatorischer Zytokine durch die Wirkung von 25-Hydroxyvitamin D₃ zeigen [136], Karthaus et al. hingegen konnten eine im Unterschied zu unseren Daten deutliche Inhibition der DC-induzierten T-Zell-Proliferation durch Vitamin D zeigen [204]. Dies kann aber durch die Verwendung eines anderen Zelltyps sowie des aktiven Metaboliten erklärt werden. Im Unterschied hierzu stellten Penna et al. durch den Zusatz von 1,25(OH)₂ Vitamin D₃ zur MLR bloß eine geringfügige Änderung der T-Zell-Proliferationsrate fest, während IFN- γ von CD4⁺ T-Zellen signifikant weniger sezerniert wurde [205]. Diese Diskrepanzen bezüglich der Proliferation allogener T-

Zellen lassen sich jeweils durch einen abweichenden Versuchsaufbau erklären, sodass sich trotzdem schlussfolgern lässt, dass der Vitamin D-Stoffwechsel im Menschen einen großen Einfluss auf die Modulation der Immunantwort besitzt.

6.3 Einfluss von TGF- β auf dendritische Zellen

TGF- β ist ein wichtiger Faktor in der Induktion sowohl tolerogener dendritischer als auch regulatorischer T-Zellen [25, 40, 41, 149, 151, 164, 165]. Mutationen im TGF- β -Signalweg gehen mit einer erhöhten Inflammation, letalen Multiorgan-Autoimmunitäten und mit akuten sowie chronischen Graft-versus-Host Reaktionen einher [166, 167, 172, 206]. Geissmann et al. und Aiba et al. zeigten, dass die Inkubation von Monozyten mit IL-4, GM-CSF und TGF- β zur Differenzierung sogenannter Langerhans-Zellen (*langerhans cells*, LCs) führt [207, 208]. LCs sind eine Subpopulation dendritischer Zellen, die vor allem in der Epidermis aufgrund des Einflusses TGF- β -sezernierender Keratinozyten vorzufinden sind [209, 210]. Sie exprimieren auf den Kontakt zu bakteriellen Bestandteilen hin wenig charakteristische Reifungsmerkmale wie das Oberflächenglykoprotein CD83 und die Sekretion des pro-inflammatorischen Zytokins IL-12, induzieren die Differenzierung von T_{reg}-Zellen und sind somit wichtig für Erhaltung der peripheren Toleranz [208, 211].

Auch die Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit bekräftigen die tolerogene Wirkung von TGF- β . Aus humanen Monozyten unter TGF- β differenzierte DCs (TGF- β -DCs), also LC-ähnliche Zellen, zeigten eine reduzierte Sekretion von IL-12, TNF- α sowie IL-8 und eine im Verhältnis zu IL-12 erhöhte IL-10-Produktion. Dies konnte auch in den Versuchen von Fantini et al., Li et al. und Fainaru et al. gezeigt werden [41, 168, 169].

Darüber hinaus konnten wir beobachten, dass durch TGF- β -DCs die Proliferation allogener T-Zellen ausblieb. Ferner induzierten TGF- β -behandelte DCs gegenüber unbehandelten DCs einen signifikant höheren Anteil CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ (T_{reg}-) Zellen. Dabei war der Zeitpunkt der TGF- β -Zugabe für die Induktion von regulatorischen T-Zellen relevant, denn die Kultivierung dendritischer Zellen mit TGF- β führte zu einem höheren Anteil von T_{reg}-Zellen und somit einem höheren immun-suppressiven Potenzial, als die Zugabe von TGF- β zu schon gereiften dendritischen Zellen. Eine Inhibition der T-Zell-Proliferation durch TGF- β -behandelte DCs konnte von Yang et al. [171], eine Induktion von T_{reg}-Zellen durch TGF- β -DCs konnte von van der Aar et al. beobachtet werden [212].

Die Rolle von TGF- β in der Tumorgenese wird in der aktuellen Literatur kontrovers diskutiert [213]. In unterschiedlichen Tumorgeweben konnten Mutationen in

dem Signalweg von TGF- β gezeigt werden [214]. Andererseits wurde schon vor 20 Jahren beschrieben, dass Tumorzellen selbst TGF- β sezernieren und dendritische Zellen zur TGF- β -Produktion stimulieren. Sie induzieren hierdurch eine lokale und systemische Immunsuppression, was eine Tumorerkrankung und -metastasierung begünstigt [215, 216]. Darüber hinaus ist eine hohe Serumkonzentration von TGF- β mit einer schlechten Prognose unterschiedlicher Tumorerkrankungen assoziiert [217–221].

Die Experimente von Rajkovic et al. bestärken die Hypothese, dass TGF- β -kultivierte DCs einen Einfluss auf die Tumorgenese besitzt. Sie konnten eine durch LCs (TGF- β -differenzierte DCs) im Vergleich zu unbehandelten DCs erhöhte IL-12-Produktion sowie eine LC-vermittelte Induktion der IFN- γ -Sekretion durch CD4⁺ T-Zellen beobachten. Daraus schlossen sie eine wichtige Funktion von LCs in der Tumorthherapie [222]. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können diese Theorie nicht stützen, da bei der Interaktion mit naiven T-Zellen TGF- β -kultivierte DCs, also LCs entsprechend, den Anteil der IL-2⁺ und IFN- γ ⁺ CD4⁺ sowie CD8⁺ T-Zellen reduzierten. Die Diskrepanz könnte damit erklärt werden, dass Rajkovic et al. TGF- β in geringerer Konzentration einsetzten und die so kultivierten LCs mit einem pro-inflammatorischen Zytokin-Cocktail stimulierten [222]. Unsere Arbeiten unterstützen die Aussage, dass TGF- β eine für das Tumorwachstum günstige immunsupprimierende Umgebung kreiert, insbesondere durch die Induktion tolerogener dendritischer Zellen bzw. Langerhans-Zellen.

Die Vitaminmetaboliten 25(OH) Vitamin D₃, Retinal und Retinol konnten keine zusätzliche tolerogene Wirkung auf die TGF- β -DC-induzierte T-Zell-Antwort bewirken. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass TGF- β das größtmöglich induzierbare tolerogene Potenzial dendritischer Zellen ausschöpft. Darüber hinaus konnte kein synergistischer Effekt, der Retinsäure mit TGF- β zugeschrieben wird, durch seine Vorgänger festgestellt werden [151]. Das lässt sich in Zusammenschau unserer Experimente darauf zurückführen, dass die Vitamin A-Metaboliten Retinal und Retinol von dendritischen Zellen nicht hinreichend zur metabolisch aktiven Retinsäure umgewandelt werden konnten.

Zusammenfassend ist in Anbetracht der Ergebnisse vorliegender Dissertation und der aktuellen Studienlage anzunehmen, dass tolerogene DCs am effizientesten durch TGF- β generiert werden können.

7 Zusammenfassung

Das Immunsystem ist tagtäglich an der Erhaltung eines Gleichgewichts zwischen pro- und anti-inflammatorischen Prozessen beteiligt. Unterschiedliche Faktoren, wie Infektionen, Tumore oder Allergene, können zu einer Dysbalance führen. Anhand der Graft-versus-Host Reaktion, in deren Induktion reife dendritische Zellen eine essenzielle Rolle einnehmen, wird ersichtlich, wie wichtig tolerogene dendritische Zellen in der Abschwächung einer Autoinflammation sind. Ziel der vorliegenden Arbeit war aus diesem Grund die Generierung tolerogener DCs zu untersuchen.

Durch die Erkennung bakterieller Bestandteile über „Toll-like“ und „NOD-like“ Rezeptoren (TLRs und NLRs) werden unterschiedliche Signalwege angestoßen, die zur pro-inflammatorischen Zytokinsekretion sowie zur Expression der Signalproteine NF κ B, MAP-Kinase p38 sowie Proteinkinase B (Akt) und damit zur Reifung dendritischer Zellen führen. Zusammenfassend zeigten die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass Lipopolysaccharid (LPS) im Vergleich zu Flagellin (Flag), Muramyl-dipeptid (MDP) bzw. Lipoteichonsäure (LTA) der effizienteste Induktor einer Inflammation ist. Zwar induzierten die Kombinationen LPS+Flag, LPS+MDP bzw. LPS+LTA gegenüber LPS alleine ähnliche Zytokinprofile, Signalwegaktivierungen und T-Zell-Proliferationen, LTA konnte jedoch eine tendenzielle Inhibition des MAP-Kinase p38-Signalwegs bewirken, was auf eine hemmende Wirkung des TLR2- auf den TLR4-Signalweg deutet. Der NOD2-Signalweg, der dafür bekannt ist, den unreifen Phänotyp dendritischer Zellen und damit ihre Tolerogenität zu erhalten, wurde von der TLR4-induzierten pro-inflammatorischen Immunantwort überlagert. Im Hinblick auf die Sekretion der Zytokine IL-12, TNF- α und IL-10 konnte sogar ein tendenziell synergistischer Effekt durch die Kombination LPS+MDP verzeichnet werden.

Unsere Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass reife dendritische Zellen 25-Hydroxyvitamin D₃ zu 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ metabolisieren und dadurch zu einer Induktion der T_{reg}- und einer Inhibition der T_H1-Zell-Antwort führen können. Da Retinsäure, wie auch 1,25(OH)₂ Vitamin D₃, tolerogene Effekte zugeschrieben werden, lag es nahe, den Einfluss des Vitamin A-Metabolismus auf dendritische Zellen zu untersuchen. Hierbei zeigte sich keine nennenswerte Regulation von Genexpression und Aktivität der Retin-Aldehyddehydrogenasen (*ALDH1A1*, *ALDH1A2* und *ALDH1A3*) durch bakterielle Liganden. Die Retinsäure-Vorstufen Retinal und Re-

tinol konnten keinen Einfluss auf die DC-vermittelte T-Zell-Proliferation und auf die -Differenzierung ausüben, was auf die nicht hinreichende Verstoffwechslung der beiden Substrate zu ihrem aktiven Metaboliten Retinsäure zurückzuführen ist. Da in der aktuellen Literatur hinsichtlich des Vitamin A-Metabolismus in Mausmodellen gegenüber unseren Erkenntnissen an humanen moDCs widersprüchliche Aussagen bestehen, deutet das darauf hin, dass diesbezüglich Spezies-spezifische Unterschiede existieren.

Transforming growth factor (TGF) - β zeigte in der vorliegenden Dissertation den effizientesten tolerogenen Effekt auf dendritische Zellen. TGF- β -behandelte DCs, die gemäß des verwendeten Kultivierungsschemas Langerhans-Zellen (LCs) entsprechen,

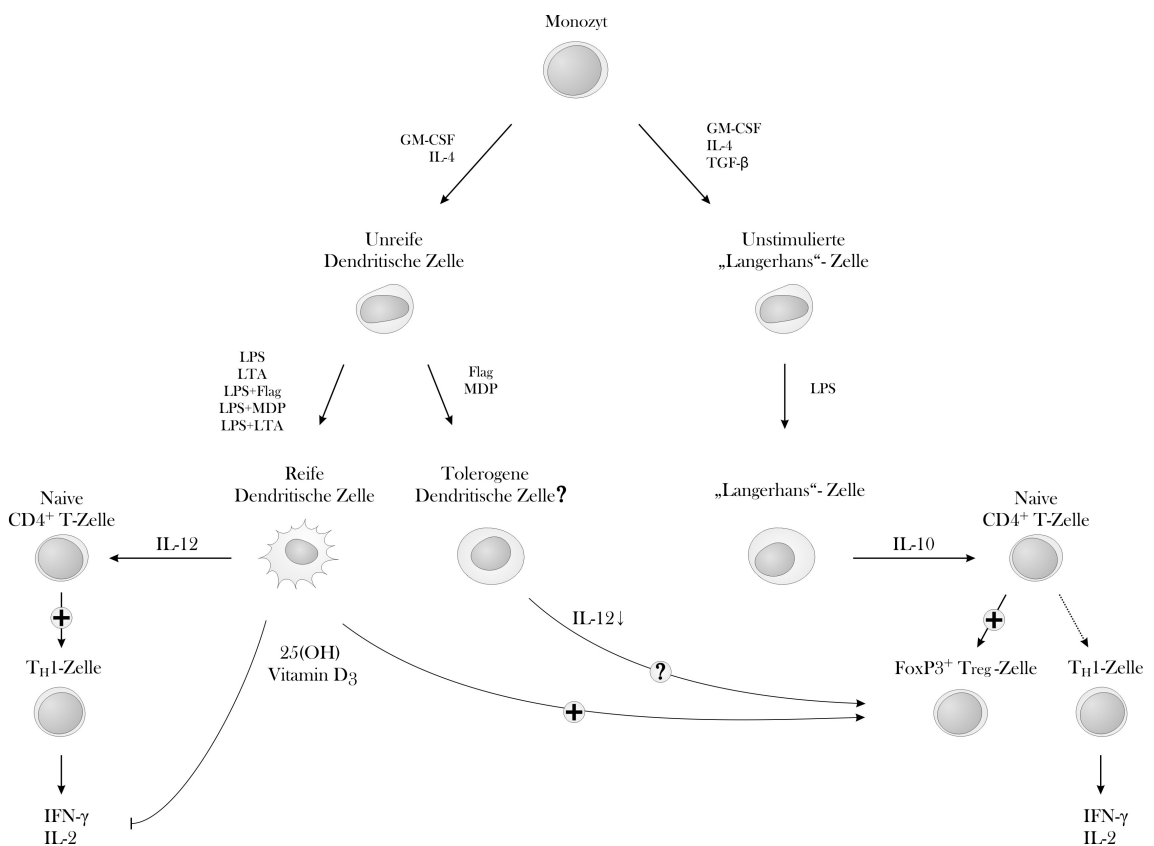


Abb. 7.1: Kultivierung reifer und tolerogener DCs und ihr Effekt in der Interaktion mit naiven T-Zellen Aus humanen Monozyten mittels GM-CSF und IL-4 differenzierte iDCs reifen durch den Kontakt mit LPS und LTA sowie der Kombination unterschiedlicher bakterieller Liganden mit LPS. Reife DCs induzieren über die Sekretion von IL-12 die Differenzierung naiver T-Zellen zu T_H1 -Zellen, die ihrerseits die proinflammatorischen Zytokine IFN- γ und IL-2 ausschütten. 25(OH) Vitamin D₃ kann diese Sekretion tendenziell vermindern und die Induktion von T_{reg} -Zellen fördern. Durch den Kontakt zu Flag bzw. MDP produzieren DCs deutlich geringere Mengen an IL-12. Hieraus ergibt sich die Frage, ob Flag und MDP zu einer Differenzierung von tolerogenen DCs führen, die Einfluss auf die Induktion von T_{reg} -Zellen nehmen könnten. Durch den Einfluss von TGF- β entwickeln sich aus humanen Monozyten LCs. Diese bewirken durch die im Vergleich zu IL-12 erhöhte Sekretion von IL-10 eine erhöhte Differenzierung von FOXP3⁺ T_{reg} -Zellen und eine geringe Produktion an IFN- γ und IL-2.

wiesen ein reduziertes inflammatorisches Zytokinprofil und eine im Vergleich zu IL-12 erhöhte Produktion des immunmodulierenden IL-10 auf. Sie bewirkten außerdem eine geringere Induktion der T-Zell-Proliferation und des Anteils IL-2⁺ und IFN- γ ⁺ CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen als reife unbehandelte DCs. Ferner führten TGF- β -kultivierte DCs zu einer erhöhten Differenzierung von regulatorischen T-Zellen (T_{reg} -Zellen) im Vergleich zu unbehandelten DCs und DCs, die erst während der T-Zell-Interaktion in Kontakt zu TGF- β traten. Dies zeigt die Relevanz des Zeitpunkts der TGF- β -Zugabe für die Generierung tolerogener DCs. Auf die Expression der Aldehyddehydrogenasen in reifen dendritischen Zellen zeigte TGF- β hingegen keine signifikante Wirkung.

Tumorgewebe sezerniert TGF- β und induziert eine immunsupprimierende Umgebung, die die Tumormetastasierung und -invasion begünstigt. Die vorliegende Dissertation stützt die Hypothese, dass Tumorzellen sich vor inflammatorischen Immunzellen schützen, indem sie durch die TGF- β -Produktion tolerogene dendritische sowie T_{reg} -Zellen induzieren und die T_H1 -Zell-Antwort inhibieren.

Diese aus humanen Zellen gewonnenen Erkenntnisse zeigen die zentrale Rolle tolerogener DCs in Inflammation und Tumor. Insbesondere TGF- β -DCs bieten in Zukunft interessante Ansätze zur Therapieentwicklung und zur Modulation der Graft-versus-Host Reaktion sowie unterschiedlicher Tumorerkrankungen.

Literatur

- [1] **SCHINDLER, W.** *PONS Praxiswörterbuch Latein*. PONS GmbH, 2011.
- [2] **ABBAS, Abul K., LICHTMAN, Andrew H. und PILLAI, Shiv.** *Immunology*. Elsevier Saunders, 2012.
- [3] **MURPHY, K., TRAVERS, P. und WALPORT, M.** *Immunologie*. 7. Aufl. Spektrum Akademischer Verlag, 2009.
- [4] **HAN, S. et al.** „Ex vivo development, expansion and in vivo analysis of a novel lineage of dendritic cells from hematopoietic stem cells“. *J Immune Based Ther Vaccines* (2010), 24;8:8.
- [5] **SALLUSTO, F. und 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(4):1109–18.
- [6] **TAKEUCHI, O. und AKIRA, S.** „Pattern recognition receptors and inflammation.“ *Cell* (2010), 140(6):805–20.
- [7] **O’NEILL, L.A., GOLENBOCK, D. und BOWIE, A.G.** „The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity“. *Nat Rev Immunol* (2013), 13(6): 453–60.
- [8] **LI, X., JIANG, S. und TAPPING, R.I.** „Toll-like receptor signaling in cell proliferation and survival“. *Cytokine* (2010), 49(1):1–9.
- [9] **LEVINE, J.E.** „Implications of TNF- α in the pathogenesis and management of GVHD“. *Int J Hematol* (2011), 93(5):571–7.
- [10] **TÜRECI, O. et al.** „Cascades of transcriptional induction during dendritic cell maturation revealed by genome-wide expression analysis“. *FASEB J* (2003), 17(8):836–47.
- [11] **SUNG, A.D. und CHAO, N.J.** „Concise review: acute graft-versus-host disease: immunobiology, prevention, and treatment“. *Stem Cells Transl Med* (2013), 2(1):25–32.

- [12] **AIBA**, S. „Maturation of dendritic cells induced by cytokines and haptens“. *Tohoku J Exp Med* (1998), 184(3):159–72.
- [13] **NAPOLITANI**, G., **RINALDI**, A., **BERTONI**, F., **SALLUSTO**, F. und **LANZAVECCHIA**, A. „Selected Toll-like receptor agonist combinations synergistically trigger a T helper type 1-polarizing program in dendritic cells“. *Nat Immunol* (2005), 6(8):769–76.
- [14] **NOLTING**, J. et al. „Retinoic acid can enhance conversion of naive into regulatory T cells independently of secreted cytokines“. *J Exp Med* (2009), 206(10):2131–9.
- [15] **PASARE**, C. und **MEDZHITOV**, R. „Toll pathway-dependent blockade of CD4⁺ CD25⁺ T cell-mediated suppression by dendritic cells“. *Science* (2003), 299 (5609):1033–6.
- [16] **PENNA**, G. et al. „Manipulating dendritic cells to induce regulatory T cells“. *Microbes Infect* (2005), 7(7–8):1033–9.
- [17] **DE VRIES**, J.E. „Immunosuppressive and anti-inflammatory properties of interleukin 10“. *Ann Med* (1995), 27(5):537–41.
- [18] **WANG**, X.N. et al. „Interleukin-10 modulation of alloreactivity and graft-versus-host reactions“. *Transplantation* (2002), 74(6):772–8.
- [19] **D’ANDREA**, A. et al. „Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells“. *J Exp Med* (1993), 178(3):1041–8.
- [20] **BOLGER**, A.P. et al. „Effect of interleukin-10 on the production of tumor necrosis factor-alpha by peripheral blood mononuclear cells from patients with chronic heart failure“. *Am J Cardiol* (2002), 90(4):384–9.
- [21] **BHATTACHARYYA**, S., **BORTHAKUR**, A., **PANT**, N., **DUDEJA**, P.K. und **TOBACMAN**, J.K. „Bcl10 mediates LPS-induced activation of NF-kappaB and IL-8 in human intestinal epithelial cells“. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2007), 293(2):G429–37.
- [22] **WALZ**, A., **PEVERI**, P., **ASCHAUER**, H. und **BAGGIOLINI**, M. „Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes“. *Biochem Biophys Res Commun* (1987), 149(2):755–61.

-
- [23] **WAKKACH**, A. et al. „Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo“. *Immunity* (2003), 18(5):605–17.
- [24] **THOMAS**, D.C., **WONG**, F.S., **ZACCONE**, P., **GREEN**, E.A. und **WÄLLBERG**, M. „Protection of islet grafts through transforming growth factor- β -induced tolerogenic dendritic cells“. *Diabetes* (2013), 62(9):3132–42.
- [25] **MALDONADO**, R.A. und **ANDRIAN**, U.H. von. „How tolerogenic dendritic cells induce regulatory T cells“. *Adv Immunol* (2010), 108:111–65.
- [26] **RUTELLA**, S., **DANESE**, S. und **LEONE**, G. „Tolerogenic dendritic cells: cytokine modulation comes of age“. *Blood* (2006), 108(5):1435–40.
- [27] **CHAMORRO**, S. et al. „TLR triggering on tolerogenic dendritic cells results in TLR2 up-regulation and a reduced proinflammatory immune program“. *J Immunol* (2009), 183(5):2984–94.
- [28] **LI**, M.O. und **FLAVELL**, R.A. „TGF- β : a master of all T cell trades“. *Cell* (2008), 134(3):392–404.
- [29] **MUCIDA**, D., **PARK**, Y. und **CHEROUTRE**, H. „From the diet to the nucleus: Vitamin A and TGF- β join efforts at the mucosal interface of the intestine“. *Semin Immunol* (2009), 21(1): 14–21.
- [30] **ILIEV**, I.D., **MILETI**, E., **MATTEOLI**, G., **CHIEPPA**, M. und **RESCIGNO**, M. „Intestinal epithelial cells promote colitis-protective regulatory T-cell differentiation through dendritic cell conditioning“. *Mucosal Immunol* (2009), 2(4):340–50.
- [31] **ROMAGNANI**, S. „T_H1/T_H2 cells“. *Inflamm Bowel Dis* (1999), 5(4):285–94.
- [32] **WILSON**, N.J. et al. „Development, cytokine profile and function of human interleukin 17-producing helper T cells“. *Nat Immunol* (2007), 8(9):950–7.
- [33] **WEI**, L., **LAURENCE**, A., **ELIAS**, K. M. und **O’SHEA**, J.J. „IL-21 is produced by Th17 cells and drives IL-17 production in a STAT3-dependent manner“. *J Biol Chem* (2007), 282(48): 34605–34610.
- [34] **MADDUR**, M.S., **MIOSSEC**, P., **KAVERI**, S.V. und **BAYRY**, J. „Th17 cells: biology, pathogenesis of autoimmune and inflammatory diseases, and therapeutic strategies“. *Am J Pathol* (2012), 181(1):8–18.
- [35] **WILKE**, C.M., **BISHOP**, K., **FOX**, D. und **ZOU**, W. „Deciphering the role of Th17 cells in human disease“. *Trends Immunol* (2011), 32(12):603–11.

-
- [36] **DASGUPTA, A.** und **SAXENA, R.** „Regulatory T cells: a review“. *Natl Med J India* (2012), 25(6):341–51.
- [37] **HILL, J.A., BENOIST, C.** und **MATHIS, D.** „T_{reg} cells: guardians for life“. *Nat Immunol* (2007), 8(2):124–5.
- [38] **SUN, C.M.** et al. „Small intestine lamina propria dendritic cells promote de novo generation of Foxp3 T_{reg} cells via retinoic acid“. *J Exp Med* (2007), 204(8):1775–85.
- [39] **RAVERDEAU, M.** und **MILLS, K.H.** „Modulation of T cell and innate immune responses by retinoic Acid“. *J Immunol* (2014), 192(7):2953–8.
- [40] **CHEN, W.** et al. „Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3“. *J Exp Med* (2003), 198(12):1875–86.
- [41] **FANTINI, M.C.** et al. „Cutting edge: TGF- β induces a regulatory phenotype in CD4+CD25- T cells through Foxp3 induction and down-regulation of Smad7“. *J Immunol* (2004), 172(9):5149–53.
- [42] **MISRA, N., BAYRY, J., LACROIX-DESMAZES, S., KAZATCHKINE, M.D.** und **KAVERI, S.V.** „Cutting Edge: Human CD4+CD25+ T Cells Restrain the Maturation and Antigen-Presenting Function of Dendritic Cells“. *J Immunol* (2004), 172(8):4676–80.
- [43] **UEMATSU, S.** et al. „Regulation of humoral and cellular gut immunity by lamina propria dendritic cells expressing Toll-like receptor 5“. *Nat Immunol* (2008), 9(7):769–76.
- [44] **AKIRA, S., UEMATSU, S.** und **TAKEUCHI, O.** „Pathogen Recognition and Innate Immunity“. *Cell* (2006), 124(4):783–801.
- [45] **DEIFL, S.** et al. „Differential activation of dendritic cells by toll-like receptors causes diverse differentiation of naïve CD4+ T cells from allergic patients“. *Allergy* (2014), S. 12501.
- [46] **KAWAI, T.** und **AKIRA, S.** „TLR signaling“. *Cell Death Differ* (2006), 13(5): 816–25.
- [47] **SATO, S.** et al. „Synergy and cross-tolerance between toll-like receptor (TLR) 2- and TLR4-mediated signaling pathways“. *J Immunol* (2000), 165(12):7096–101.

-
- [48] **KAWAI**, T. und **AKIRA**, S. „The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors“. *Nat Immunol* (2010), 11(5):373–84.
- [49] **SHIN**, O.S. und **HARRIS**, J.B. „Innate immunity and transplantation tolerance: the potential role of TLRs/NLRs in GVHD“. *Korean J Hematol* (2011), 46(2):69–79.
- [50] **ZHONG**, J. und **KYRIAKIS**, J.M. „Dissection of a signaling pathway by which pathogen-associated molecular patterns recruit the JNK and p38 MAPKs and trigger cytokine release“. *J Biol Chem* (2007), 282(33):24246–54.
- [51] **ZHANG**, W. und **LIU**, H.T. „MAPK signal pathways in the regulation of cell proliferation in mammalian cells“. *Cell Res* (2002), 12(1):9–18.
- [52] **GÜNZL**, P. und **SCHABBAUER**, G. „Recent advances in the genetic analysis of PTEN and PI3K innate immune properties“. *Immunobiology* (2008), 213(9–10):759–65.
- [53] **YU**, Y. et al. „TLR5-mediated phosphoinositide 3-kinase activation negatively regulates flagellin-induced proinflammatory gene expression“. *J Immunol* (2006), 176(10):6194–201.
- [54] **FUKAO**, T. et al. „PI3K-mediated negative feedback regulation of IL-12 production in DCs“. *Nat Immunol* (2002), 3(9):875–81.
- [55] **VAN DE LAAR**, L., **COFFER**, P.J. und **WOLTMAN**, A.M. „Regulation of dendritic cell development by GM-CSF: molecular control and implications for immune homeostasis and therapy“. *Blood* (2012), 119(15):3383–93.
- [56] **SAXENA**, M. und **YERETSSIAN**, G. „NOD-Like Receptors: Master Regulators of Inflammation and Cancer“. *Front Immunol* (2014), 5:327.
- [57] **BOURHIS**, L.L. und **WERTS**, C. „Role of Nods in bacterial infection“. *Microbes Infect* (2007), 9(5):629–36.
- [58] **GIRARDIN**, S.E. et al. „Nod2 is a general sensor of peptidoglycan through muramyl dipeptide (MDP) detection“. *J Biol Chem* (2003), 278(11):8869–72.
- [59] **YERETSSIAN**, G. „Effector functions of NLRs in the intestine: innate sensing, cell death, and disease“. *Immunol Res* (2012), 54(1–3):25–36.
- [60] **TING**, J.P. et al. „The NLR gene family: a standard nomenclature“. *Immunity* (2008), 28(3):285–7.

-
- [61] **ABREU**, M.T., **FUKATA**, M. und **ARDITI**, M. „TLR signaling in the gut in health and disease“. *J Immunol* (2005), 174(8):4453–60.
- [62] **PARK**, J.H. et al. „RICK/RIP2 mediates innate immune responses induced through Nod1 and Nod2 but not TLRs“. *J Immunol* (2007), 178(4):2380–6.
- [63] **NAVAS**, T.A., **BALDWIN**, D.T. und **STEWART**, T.A. „RIP2 is a Raf1-activated mitogen-activated protein kinase kinase“. *J Biol Chem* (1999), 274(47):33684–90.
- [64] **HIRATA**, N. et al. „Selective synergy in anti-inflammatory cytokine production upon cooperated signaling via TLR4 and TLR2 in murine conventional dendritic cells“. *Mol Immunol* (2008), 45(10):2734–42.
- [65] **KIM**, H.J. et al. „Lipoteichoic acid and muramyl dipeptide synergistically induce maturation of human dendritic cells and concurrent expression of proinflammatory cytokines“. *J Leukoc Biol* (2007), 81(4):983–9.
- [66] **FRITZ**, J.H. et al. „Synergistic stimulation of human monocytes and dendritic cells by Toll-like receptor 4 and NOD1- and NOD2-activating agonists“. *Eur J Immunol* (2005), 35(8):2459–70.
- [67] **NETEA**, M.G. et al. „NOD2 mediates anti-inflammatory signals induced by TLR2 ligands: implications for Crohn’s disease“. *Eur J Immunol* (2004), 34(7): 2052–9.
- [68] **MAGALHAES**, J.G. et al. „Nod2-dependent T_H2 polarization of antigen-specific immunity“. *J Immunol* (2008), 181(11):7925–35.
- [69] **FERRARA**, J.L.M., **LEVINE**, J.E., **REDDY**, P. und **HOLLER**, E. „Graft-versus-Host Disease“. *The Lancet* (2009), 373(9674):1550–61.
- [70] **JACOBSON**, D.A. und **VOGELSANG**, G.B. „Acute graft versus host disease“. *Orphanet J Rare Dis* (2007), 2:35.
- [71] **HEIDEGGER**, S., **VAN DEN BRINK**, M.R., **HAAS**, T. und **POECK**, H. „The role of pattern-recognition receptors in graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia after allogeneic stem cell transplantation“. *Front Immunol* (2014), 5:337.
- [72] **WEISDORF**, D.J. et al. „Acute upper gastrointestinal graft-versus-host disease: clinical significance and response to immunosuppressive therapy“. *Blood* (1990), 76(3):624–9.

- [73] **MALARD, F.** und **MOHTY, M.** „New insight for the diagnosis of gastrointestinal acute graft-versus-host disease“. *Mediators Inflamm* (2014), 2014:701013.
- [74] **COX, G.J.** et al. „Etiology and outcome of diarrhea after marrow transplantation: a prospective study“. *Gastroenterology* (1994), 107(5):1398–407.
- [75] **CHEN, X., DODGE, J., KOMOROWSKI, R.** und **DROBYSKI, W.R.** „A critical role for the retinoic acid signaling pathway in the pathophysiology of gastrointestinal graft-versus-host disease“. *Blood* (2013), 121(19):3970–80.
- [76] **MCDONALD, G.B.** „Review article: management of hepatic disease following haematopoietic cell transplant“. *Aliment Pharmacol Ther* (2006), 24(3):441–52.
- [77] **KAMBHAM, N., HIGGINS, J.P., SUNDRAM, U.** und **TROXELL, M.L.** „Hematopoietic stem cell transplantation: graft versus host disease and pathology of gastrointestinal tract, liver, and lung“. *Adv Anat Pathol* (2014), 21(5):301–20.
- [78] **BLAZAR, B.R., MURPHY, W.J.** und **ABEDI, M.** „Advances in graft-versus-host disease biology and therapy“. *Nat Rev Immunol* (2012), 12(6):443–58.
- [79] **HOLLER, E.** et al. „Increased serum levels of tumor necrosis factor alpha precede major complications of bone marrow transplantation“. *Blood* (1990), 75(4):1011–6.
- [80] **CHOI, S.W.** et al. „Change in plasma tumor necrosis factor receptor 1 levels in the first week after myeloablative allogeneic transplantation correlates with severity and incidence of GVHD and survival“. *Blood* (2008), 112(4):1539–42.
- [81] **KITKO, C.L.** et al. „Plasma elevations of tumor necrosis factor-receptor-1 at day 7 postallogeneic transplant correlate with graft-versus-host disease severity and overall survival in pediatric patients“. *Biol Blood Marrow Transplant* (2008), 14(7):759–65.
- [82] **CHAKRAVERTY, R.** und **SYKES, M.** „The role of antigen-presenting cells in triggering graft-versus-host disease and graft-versus-leukemia“. *Blood* (2007), 110(1):9–17.
- [83] **ZHANG, Y., LOUBOUTIN, J.-P., ZHU, J., RIVERA, A. J.** und **EMERSON, S. G.** „Preterminal host dendritic cells in irradiated mice prime CD8+ T cell-mediated acute graft-versus-host disease“. *J Clin Invest.* (2002), 109(10):1335–1344.

-
- [84] **HILL, G.R., KRENGER, W. und FERRARA, J.L.** „The role of cytokines in acute graft-versus-host disease“. *Cytokines Cell Mol Ther* (1997), 3(4):257–66.
- [85] **COOKE, K.R. et al.** „Tumor necrosis factor- alpha production to lipopolysaccharide stimulation by donor cells predicts the severity of experimental acute graft-versus-host disease“. *J Clin Invest* (1998), 102(10):1882–91.
- [86] **REDDY, P. und FERRARA, J.L.** „Immunobiology of acute graft-versus-host disease“. *Blood Rev* (2003), 17(4):187–94.
- [87] **SHLOMCHIK, W.D.** „Graft-versus-host disease“. *Nat Rev Immunol* (2007), 7(5):340–52.
- [88] **BRAUN, M.Y., LOWIN, B., FRENCH, L., ACHA-ORBEA, H. und TSCHOPP, J.** „Cytotoxic T cells deficient in both functional fas ligand and perforin show residual cytolytic activity yet lose their capacity to induce lethal acute graft-versus-host disease“. *J Exp Med* (1996), 183(2):657–61.
- [89] **SHLOMCHIK, W.D. et al.** „Prevention of graft versus host disease by inactivation of host antigen-presenting cells“. *Science* (1999), 285(5426):412–5.
- [90] **LAU, J. et al.** „Activated circulating dendritic cells after hematopoietic stem cell transplantation predict acute graft-versus-host disease“. *Transplantation* (2007), 83(7):839–46.
- [91] **VAN BEKKUM, D.W. und KNAAN, S.** „Role of bacterial microflora in development of intestinal lesions from graft-versus-host reaction“. *J Natl Cancer Inst* (1977), 58(3):787–90.
- [92] **VAN BEKKUM, D.W., ROODENBURG, J., HEIDT, P.J. und VAN DER WAAIJ, D.** „Mitigation of secondary disease of allogeneic mouse radiation chimeras by modification of the intestinal microflora“. *J Natl Cancer Inst* (1974), 52(2):401–4.
- [93] **LAMPERT, I.A., MOORE, R.H., HUBY, R. und COHEN, J.** „Observations on the role of endotoxin in graft-versus-host disease“. *Prog Clin Biol Res* (1988), 272:351–9.
- [94] **KRÜGER, W.H. et al.** „Antimicrobial prophylaxis in allogeneic bone marrow transplantation. Guidelines of the infectious diseases working party (AGIHO) of the german society of haematology and oncology“. *Ann Oncol* (2005), 16(8):1381–90.

-
- [95] **PULENDRAN, B., TANG, H. und MANICASSAMY, S.** „Programming dendritic cells to induce T_H2 and tolerogenic responses“. *Nat Immunol* (2010), 11(8):647–55.
- [96] **STEINMAN, R.M. und NUSSENZWEIG, M.C.** „Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance“. *Proc Natl Acad Sci U S A* 8;99(1):351-8 (2002), 8;99(1):351–8.
- [97] **STEINMAN, R.M., HAWIGER, D. und NUSSENZWEIG, M.C.** „Tolerogenic dendritic cells“. *Annu Rev Immunol* (2003), 21:685–711.
- [98] **MANICASSAMY, S. und PULENDRAN, B.** „Dendritic cell control of tolerogenic responses“. *Immunol Rev* (2011), 241(1):206–27.
- [99] **COOKE, K.R. et al.** „LPS antagonism reduces graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia activity after experimental bone marrow transplantation“. *J Clin Invest* (2001), 107(12):1581–9.
- [100] **HOLLER, E., LANDFRIED, K., MEIER, J., HAUSMANN, M. und ROGLER, G.** „The role of bacteria and pattern recognition receptors in GVHD“. *Int J Inflam* (2010), 2010:814326.
- [101] **ZHAO, Y. et al.** „TLR4 inactivation protects from graft-versus-host disease after allogeneic hematopoietic stem cell transplantation“. *Cell Mol Immunol* (2013), 10(2):165–75.
- [102] **HEIMESAAT, M.M. et al.** „MyD88/TLR9 mediated immunopathology and gut microbiota dynamics in a novel murine model of intestinal graft-versus-host disease“. *Gut* (2010), 59(8):1079–87.
- [103] **HOSSAIN, M.S. et al.** „Flagellin, a TLR5 agonist, reduces graft-versus-host disease in allogeneic hematopoietic stem cell transplantation recipients while enhancing antiviral immunity“. *J Immunol* (2011), 187(10):5130–40.
- [104] **SUN, J., FEGAN, P.E., DESAI, A.S., MADARA, J.L. und HOBERT, M.E.** „Flagellin-induced tolerance of the Toll-like receptor 5 signaling pathway in polarized intestinal epithelial cells“. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* (2007), 292(3):G767–78.
- [105] **CUTHBERT, A.P. et al.** „The contribution of NOD2 gene mutations to the risk and site of disease in inflammatory bowel disease“. *Gastroenterology* (2002), 122(4):867–74.
- [106] **DE ZOETE, M.R. und FLAVELL, R.A.** „Interactions between Nod-Like Receptors and Intestinal Bacteria“. *Front Immunol* (2013), 4:462.

-
- [107] **PENACK, O., HOLLER, E. und VAN DEN BRINK., M.R.** „Graft-versus-host disease: regulation by microbe-associated molecules and innate immune receptors“. *Blood* (2010), 115(10):1865–72.
- [108] **PENACK, O. et al.** „NOD2 regulates hematopoietic cell function during graft-versus-host disease“. *J Exp Med* (2009), 206(10):2101–10.
- [109] **HOLLER, E. et al.** „Prognostic significance of NOD2/CARD15 variants in HLA-identical sibling hematopoietic stem cell transplantation: effect on long-term outcome is confirmed in 2 independent cohorts and may be modulated by the type of gastrointestinal decontamination“. *Blood* (2006), 107(10):4189–93.
- [110] **ELMAAGACLI, A.H. et al.** „Mutations in innate immune system NOD2/CARD 15 and TLR-4 (Thr399Ile) genes influence the risk for severe acute graft-versus-host disease in patients who underwent an allogeneic transplantation“. *Transplantation* (2006), 81(2):247–54.
- [111] **LANDFRIED, K. et al.** „Recipient NOD2/CARD15 status affects cellular infiltrates in human intestinal graft-versus-host disease“. *Clin Exp Immunol* (2010), 159(1):87–92.
- [112] **VAN DER STRAATEN, H.M. et al.** „NOD2/CARD15 variants are not a risk factor for clinical outcome after nonmyeloablative allogeneic stem cell transplantation“. *Biol Blood Marrow Transplant* (2011), 17(8):1231–6.
- [113] **NGUYEN, Y. et al.** „Insufficient evidence for association of NOD2/CARD15 or other inflammatory bowel disease-associated markers on GVHD incidence or other adverse outcomes in T-replete, unrelated donor transplantation“. *Blood* (2010), 115(17):3625–31.
- [114] **SAIRAFI, D., UZUNEL, M., REMBERGER, M., RINGDÉN, O. und MATTS-SON, J.** „No impact of NOD2/CARD15 on outcome after SCT“. *Bone Marrow Transplant* (2008), 41(11):961–4.
- [115] **VAN ETTEN, E. und MATHIEU, C.** „Immunoregulation by 1,25-dihydroxy-vitamin D₃: basic concepts“. *J Steroid Biochem Mol Biol* (2005), 97(1–2):93–101.
- [116] **MORA, J.R., IWATA, M. und ANDRIAN, U.H. von.** „Vitamin effects on the immune system: vitamins A and D take centre stage“. *Nat Rev Immunol* (2008), 8(9):685–98.

- [117] **STOFFELS**, K. et al. „Immune regulation of 25-hydroxyvitamin-D₃-1alpha-hydroxylase in human monocytes“. *J Bone Miner Res* (2006), 21(1):37–47.
- [118] **LIU**, P.T. et al. „Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response“. *Science* (2006), 311(5768):1770–3.
- [119] **HEWISON**, M. et al. „Differential regulation of vitamin D receptor and its ligand in human monocyte-derived dendritic cells“. *J Immunol* (2003), 170(11):5382–90.
- [120] **FRITSCH**, J., **MONDAL**, K., **EHRNSPERGER**, A., **ANDREESSEN**, R. und **KREUTZ**, M. „Regulation of 25-hydroxyvitamin D₃-1 alpha-hydroxylase and production of 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ by human dendritic cells“. *Blood* (2003), 102(9):3314–6.
- [121] **ZEHNDER**, D. et al. „Extrarenal expression of 25-hydroxyvitamin d₃-1 alpha-hydroxylase“. *J Clin Endocrinol Metab* (2001), 86(2):888–94.
- [122] **FERREIRA**, G.B. et al. „1,25-Dihydroxyvitamin D₃ alters murine dendritic cell behaviour in vitro and in vivo“. *Diabetes Metab Res Rev* (2011), 27(8):933–41.
- [123] **GRIFFIN**, M.D. et al. „Dendritic cell modulation by 1alpha,25 dihydroxyvitamin D₃ and its analogs: a vitamin D receptor-dependent pathway that promotes a persistent state of immaturity in vitro and in vivo“. *Proc Natl Acad Sci U S A* (2001), 98(12):6800–5.
- [124] **GRIFFIN**, M.D. et al. „Potent inhibition of dendritic cell differentiation and maturation by vitamin D analogs“. *Biochem Biophys Res Commun* (2000), 270(3):701–8.
- [125] **KREUTZ**, M. et al. „Whole-body UVB irradiation during allogeneic hematopoietic cell transplantation is safe and decreases acute graft-versus-host disease“. *J Invest Dermatol* (2012), 132(1):179–87.
- [126] **URETA**, G. et al. „Generation of dendritic cells with regulatory properties“. *Transplant Proc* (2007), 39(3):633–7.
- [127] **UNGER**, W.W., **LABAN**, S., **KLEIJWEGT**, F.S., **SLIK**, A.R. van der und **ROEP**, B.O. „Induction of T_{reg} by monocyte-derived DC modulated by vitamin D₃ or dexamethasone: differential role for PD-L1“. *Eur J Immunol* (2009), 39(11):3147–59.
- [128] **ADORINI**, L. und **PENNA**, G. „Induction of tolerogenic dendritic cells by vitamin D receptor agonists“. *Handb Exp Pharmacol* (2009), (188):251–73.

-
- [129] **ADORINI, L.** und **PENNA, G.** „Dendritic cell tolerogenicity: a key mechanism in immunomodulation by vitamin D receptor agonists“. *Hum Immunol* (2009), 70(5):345–52.
- [130] **COHEN, J.L., TRENADO, A., VASEY, D., KLATZMANN, D.** und **SALOMON, B.L.** „CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T Cells: new therapeutics for graft-versus-host disease“. *J Exp Med* (2002), 196(3):401–6.
- [131] **RIEGER, K.** et al. „Mucosal FOXP3+ regulatory T cells are numerically deficient in acute and chronic GvHD“. *Blood* (2006), 107(4):1717–23.
- [132] **TAYLOR, P.A., LEES, C.J.** und **BLAZAR, B.R.** „The infusion of ex vivo activated and expanded CD4(+)CD25(+) immune regulatory cells inhibits graft-versus-host disease lethality“. *Blood* (2002), 99(10):3493–9.
- [133] **HOFFMANN, P., ERMANN, J., EDINGER, M., FATHMAN, C.G.** und **STROBER, S.** „Donor-type CD4(+)CD25(+) regulatory T cells suppress lethal acute graft-versus-host disease after allogeneic bone marrow transplantation“. *J Exp Med* (2002), 196(3):389–99.
- [134] **COLSON, Y.L.** et al. „Absence of clinical GVHD and the in vivo induction of regulatory T cells after transplantation of facilitating cells“. *Blood* (2004), 104(12):3829–35.
- [135] **KREUTZ, M.** et al. „Variations in 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D₃ and 25-hydroxyvitamin D₃ serum levels during allogeneic bone marrow transplantation“. *Bone Marrow Transplant* (2004), 33(8):871–3.
- [136] **JEFFERY, L.E.** et al. „Availability of 25-hydroxyvitamin D(3) to APCs controls the balance between regulatory and inflammatory T cell responses“. *J Immunol* (2012), 189(11):5155–64.
- [137] **JEFFERY, L.E.** et al. „1,25-Dihydroxyvitamin D₃ and IL-2 combine to inhibit T cell production of inflammatory cytokines and promote development of regulatory T cells expressing CTLA-4 and FoxP3“. *J Immunol* (2009), 183(9):5458–67.
- [138] **PAKKALA, I., TASKINEN, E., PAKKALA, S.** und **RÄISÄNEN-SOKOLOWSKI, A.** „MC1288, a vitamin D analog, prevents acute graft-versus-host disease in rat bone marrow transplantation“. *Bone Marrow Transplant* (2001), 27(8):863–7.
- [139] **BOGUNIA-KUBIK, K., MIDDLETON, P., NORDEN, J., DICKINSON, A.** und **LANGE, A.** „Association of vitamin D receptor polymorphisms with

- the outcome of allogeneic haematopoietic stem cell transplantation“. *Int J Immunogenet* (2008), 35(3):207–13.
- [140] **MIDDLETON**, P.G. et al. „Vitamin D receptor gene polymorphism associates with graft-versus-host disease and survival in HLA-matched sibling allogeneic bone marrow transplantation“. *Bone Marrow Transplant* (2002), 30(4):223–8.
- [141] **MANICASSAMY**, S. und **PULENDRAN**, B. „Retinoic acid-dependent regulation of immune responses by dendritic cells and macrophages“. *Semin Immunol* (2009), 21(1):22–7.
- [142] **KRISHNAN**, S., **BHUYAN**, U. N., **TALWAR**, G. P. und **RAMALINGASWAMI**, V. „Effect of vitamin A and protein-calorie undernutrition on immune responses“. *Immunology* (1974), 27(3): 383–392.
- [143] **IWATA**, M. und **YOKOTA**, A. „Retinoic acid production by intestinal dendritic cells“. *Vitam Horm* (2011), 86:127–52.
- [144] **IWATA**, M. et al. „Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells“. *Immunity* (2004), 21(4):527–38.
- [145] **MOREB**, J.S. et al. „The enzymatic activity of human aldehyde dehydrogenases 1A2 and 2 (ALDH1A2 and ALDH2) is detected by Aldefluor, inhibited by diethylaminobenzaldehyde and has significant effects on cell proliferation and drug resistance“. *Chem Biol Interact* (2012), 195(1):52–60.
- [146] **MANICASSAMY**, S. et al. „Toll-like receptor 2-dependent induction of vitamin A-metabolizing enzymes in dendritic cells promotes T regulatory responses and inhibits autoimmunity“. *Nat Med* (2009), 15(4):401–9.
- [147] **YOKOTA**, A. et al. „GM-CSF and IL-4 synergistically trigger dendritic cells to acquire retinoic acid-producing capacity“. *Int Immunol* (2009), 21(4):361–77.
- [148] **DE KIVIT**, S., **TOBIN**, M.C., **FORSYTH**, C.B., **KESHAVARZIAN**, A. und **LANDAY**, A.L. „Regulation of Intestinal Immune Responses through TLR Activation: Implications for Pro- and Prebiotics“. *Front Immunol* (2014), 5:60.
- [149] **COOMBES**, J.L. et al. „A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF- β and retinoic acid-dependent mechanism“. *J Exp Med* (2007), 204(8):1757–64.

-
- [150] **KANG, S.G., LIM, H.W., ANDRISANI, O.M., BROXMEYER, H.E. und KIM, C.H.** „Vitamin A metabolites induce gut-homing FoxP3⁺ regulatory T cells“. *J Immunol* (2007), 179(6):3724–33.
- [151] **MUCIDA, D. et al.** „Retinoic acid can directly promote TGF- β -mediated Foxp3⁺ T_{reg} cell conversion of naive T cells“. *Immunity* (2009), 30(4):471–2.
- [152] **BENSON, M.J., PINO-LAGOS, K., ROSEMBLATT, M. und NOELLE, R.J.** „All-trans retinoic acid mediates enhanced T_{reg} cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation“. *J Exp Med* (2007), 204(8):1765–74.
- [153] **HOAG, K.A., NASHOLD, F.E., GOVERMAN, J. und HAYES, C.E.** „Retinoic acid enhances the T helper 2 cell development that is essential for robust antibody responses through its action on antigen-presenting cells“. *J Nutr* (2002), 132(12):3736–9.
- [154] **IWATA, M., ESHIMA, Y. und KAGECHIKA, H.** „Retinoic acids exert direct effects on T cells to suppress Th1 development and enhance Th2 development via retinoic acid receptors“. *Int Immunol* (2003), 15(8):1017–25.
- [155] **STEPHENSEN, C.B. et al.** „Vitamin A enhances in vitro Th2 development via retinoid X receptor pathway“. *J Immunol* (2002), 168(9):4495–503.
- [156] **AHMAD, S.M., HASKELL, M.J., RAQIB, R. und STEPHENSEN, C.B.** „Markers of innate immune function are associated with vitamin a stores in men.“ *J Nutr* (2009), 139(2):377–85.
- [157] **DEPAOLO, R.W. et al.** „Co-adjuvant effects of retinoic acid and IL-15 induce inflammatory immunity to dietary antigens“. *Nature* (2011), 471(7337):220–4.
- [158] **PINO-LAGOS, K. et al.** „A retinoic acid-dependent checkpoint in the development of CD4⁺ T cell-mediated immunity“. *J Exp Med* (2011), 208(9):1767–75.
- [159] **HALL, J.A. et al.** „Essential role for retinoic acid in the promotion of CD4(+) T cell effector responses via retinoic acid receptor alpha“. *Immunity* (2011), 34(3):435–47.
- [160] **AOYAMA, K. et al.** „Inhibiting retinoic acid signaling ameliorates graft-versus-host disease by modifying T-cell differentiation and intestinal migration“. *Blood* (2013), 122(12):2125–34.

-
- [161] **KOENECKE**, C. et al. „Shift of graft-versus-host-disease target organ tropism by dietary vitamin A“. *PLoS One* (2012), 7(5):e38252.
- [162] **HURST**, R.J., **DE CAUL**, A., **LITTLE**, M.C., **KAGECHIKA**, H. und **ELSE**, K.J. „The retinoic acid receptor agonist Am80 increases mucosal inflammation in an IL-6 dependent manner during *Trichuris muris* infection“. *J Clin Immunol* (2013), 33(8):1386–94.
- [163] **NISHIMORI**, H. et al. „Synthetic retinoid Am80 ameliorates chronic graft-versus-host disease by down-regulating T_H1 and T_H17 “. *Blood* (2012), 119(1): 285–95.
- [164] **CHEN**, W. und **KONKEL**, J.E. „TGF- β and 'adaptive' Foxp3(+) regulatory T cells“. *J Mol Cell Biol* (2010), 2(1):30–6.
- [165] **KRETSCHMER**, K. et al. „Inducing and expanding regulatory T cell populations by foreign antigen“. *Nat Immunol* (2005), 6(12):1219–27.
- [166] **KULKARNI**, A.B. et al. „Transforming growth factor beta 1 null mutation in mice causes excessive inflammatory response and early death“. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1993), 90(2):770–4.
- [167] **RAMALINGAM**, R. et al. „Dendritic cell-specific disruption of TGF- β receptor II leads to altered regulatory T cell phenotype and spontaneous multiorgan autoimmunity“. *J Immunol* (2012), 189(8):3878–93.
- [168] **LI**, G.B. et al. „The role of third-party tolerogenic dendritic cells in prevention of acute graft-versus-host-disease following allogeneic bone marrow transplantation in mice“. *Zhonghua Xue Ye Xue Za Zhi* (2012), 33(6):461–6.
- [169] **FAINARU**, O. et al. „TGF β -dependent gene expression profile during maturation of dendritic cells“. *Genes Immun* (2007), 8(3):239–44.
- [170] **MOU**, H.B., **LIN**, M.F., **CEN**, H., **HUANG**, H. und **CAI**, Z. „Prevention of murine acute graft-versus-host disease by recipient-derived TGFbeta1-treated dendritic cells“. *Transplant Proc* (2004), 36(5):1604–6.
- [171] **YANG**, J. et al. „Third-party tolerogenic dendritic cells reduce allo-reactivity in vitro and ameliorate the severity of acute graft-versus-host disease in allo-bone marrow transplantation“. *Scand J Immunol* (2013), 78(6):486–96.
- [172] **KIM**, D. et al. „Risk stratification of organ-specific GVHD can be improved by single-nucleotide polymorphism-based risk models“. *Bone Marrow Transplant* (2014), 49(5):649–56.

- [173] **BONNEFOY**, F. et al. „TGF-beta-exposed plasmacytoid dendritic cells participate in Th17 commitment“. *J Immunol* (2011), 186(11):6157–64.
- [174] **BETTELLI**, E. et al. „Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells“. *Nature* (2006), 441(7090):235–8.
- [175] **ROBERTS**, A.B. et al. „Transforming growth factor type beta: rapid induction of fibrosis and angiogenesis in vivo and stimulation of collagen formation in vitro“. *Proc Natl Acad Sci U S A* (1986), 83(12):4167–71.
- [176] **SANDERSON**, R.J., **SHEPPERDSON**, R.T., **VATTER**, A.E. und **TALMAGE**, D.W. „Isolation and enumeration of peripheral blood monocytes“. *J Immunol* (1977), 118(4):1409–14.
- [177] **PALUCKA**, K.A., **TAQUET**, N., **SANCHEZ-CHAPUIS**, F. und **GLUCKMAN**, J.C. „Dendritic cells as the terminal stage of monocyte differentiation“. *J Immunol* (1998), 160(9):4587–95.
- [178] **LAEMMLI**, U.K. „Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4“. *Nature* (1970), 227(5259):680–5.
- [179] **TOWBIN**, H., **STAEHELIN**, T. und **GORDON**, J. „Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications“. *Biotechnology* (1979), 24:145–9.
- [180] **KHAN**, F. H. *The Elements of Immunology*. Pearson Education India, 2009.
- [181] **HÄYRY**, P. und **DEFENDI**, V. „Mixed lymphocyte cultures produce effector cells: model in vitro for allograft rejection“. *Science* (1970), 168(3927):133–5.
- [182] **GRESSNER**, A. M. und **ARNDT**, T. *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Springer Verlag, 2013.
- [183] **MULLIS**, K. et al. „Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction“. *Biotechnology* (1986), 24:17–27.
- [184] **DINARELLO**, C.A. „Proinflammatory cytokines“. *Chest* (2000), 118(2):503–8.
- [185] **BARTON**, G.M. und **MEDZHITOV**, R. „Toll-like receptor signaling pathways“. *Science* (2003), 300(5625):1524–5.
- [186] **MANICASSAMY**, S. und **PULENDRAN**, B. „Modulation of adaptive immunity with Toll-like receptors“. *Semin Immunol* (2009), 21(4):185–93.

- [187] **DOWLING, D., HAMILTON, C.M. und O'NEILL, S.M.** „A comparative analysis of cytokine responses, cell surface marker expression and MAPKs in DCs matured with LPS compared with a panel of TLR ligands“. *Cytokine* (2008), 41(3):254–62.
- [188] **DEARMAN, R.J., CUMBERBATCH, M., MAXWELL, G., BASKETTER, D.A. und KIMBER, I.** „Toll-like receptor ligand activation of murine bone marrow-derived dendritic cells“. *Immunology* (2009), 126(4):475–84.
- [189] **MEANS, T.K., HAYASHI, F., SMITH, K.D., ADEREM, A. und LUSTER, A.D.** „The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells“. *J Immunol* (2003), 170(10):5165–75.
- [190] **TSUJIMOTO, H. et al.** „Flagellin enhances NK cell proliferation and activation directly and through dendritic cell-NK cell interactions“. *J Leukoc Biol* (2005), 78(4):888–97.
- [191] **MÄKELÄ, S.M., STRENGELL, M., PIETILÄ, T.E., OSTERLUND, P. und JULKUNEN, I.** „Multiple signaling pathways contribute to synergistic TLR ligand-dependent cytokine gene expression in human monocyte-derived macrophages and dendritic cells.“ *J Leukoc Biol* (2009), 85(4):664–72.
- [192] **TADA, H., AIBA, S., SHIBATA, K., OHTEKI, T. und TAKADA, H.** „Synergistic effect of Nod1 and Nod2 agonists with toll-like receptor agonists on human dendritic cells to generate interleukin-12 and T helper type 1 cells“. *Infect Immun* (2005), 73(12):7967–76.
- [193] **BYUN, E.H. et al.** „Mycobacterium paratuberculosis CobT activates dendritic cells via engagement of Toll-like receptor 4 resulting in Th1 cell expansion“. *J Biol Chem* (2012), 287(46):38609–24.
- [194] **DURASINGHAM, S.S., HORNIG, J., GOTCH, F. und PATTERSON, S.** „TLR-stimulated CD34 stem cell-derived human skin-like and monocyte-derived dendritic cells fail to induce Th17 polarization of naive T cells but do stimulate Th1 and Th17 memory responses“. *J Immunol* (2009), 183(4):2242–51.
- [195] **BENWELL, R.K., HRUSKA, J.E., FRITSCHKE, K.L. und LEE, D.R.** „Double stranded RNA- relative to other TLR ligand-activated dendritic cells induce extremely polarized human Th1 responses“. *Cell Immunol* (2010), 264(2):119–26.

- [196] **GOTTFRIED**, E. et al. „Monocyte-derived cells express CYP27A1 and convert vitamin D3 into its active metabolite“. *Biochem Biophys Res Commun* (2006), 349(1):209–13.
- [197] **VILLABLANCA**, E.J. et al. „MyD88 and retinoic acid signaling pathways interact to modulate gastrointestinal activities of dendritic cells“. *Gastroenterology* (2011), 141(1):176–85.
- [198] **HURST**, R.J. und **ELSE**, K.J. „The retinoic acid-producing capacity of gut dendritic cells and macrophages is reduced during persistent T. muris infection“. *Parasite Immunol* (2013), 35(7–8):229–33.
- [199] **MOLENAAR**, R. et al. „Expression of retinaldehyde dehydrogenase enzymes in mucosal dendritic cells and gut-draining lymph node stromal cells is controlled by dietary vitamin A“. *J Immunol* (2011), 186(4):1934–42.
- [200] **GYÖNGYÖSI**, A. et al. „RDH10, RALDH2, and CRABP2 are required components of PPAR γ -directed ATRA synthesis and signaling in human dendritic cells“. *J Lipid Res* (2013), 54(9):2458–74.
- [201] **ZHU**, B. et al. „IL-4 and retinoic acid synergistically induce regulatory dendritic cells expressing Aldh1a2“. *J Immunol* (2013), 191(6):3139–51.
- [202] **SELA**, U., **OLDS**, P., **PARK**, A., **SCHLESINGER**, S.J. und **STEINMAN**, R.M. „Dendritic cells induce antigen-specific regulatory T cells that prevent graft versus host disease and persist in mice“. *J Exp Med* (2011), 208(12):2489–96.
- [203] **GLOTZBECKER**, B. et al. „Low levels of 25-hydroxyvitamin D before allogeneic hematopoietic SCT correlate with the development of chronic GVHD“. *Bone Marrow Transplant* (2013), 48(4):593–7.
- [204] **KARTHAUS**, N. et al. „Vitamin D controls murine and human plasmacytoid dendritic cell function“. *J Invest Dermatol* (2014), 134(5):1255–64.
- [205] **PENNA**, G. und **ADORINI**, L. „1 Alpha,25-dihydroxyvitamin D3 inhibits differentiation, maturation, activation, and survival of dendritic cells leading to impaired alloreactive T cell activation“. *J Immunol* (2000), 164(5):2405–11.
- [206] **KIM**, D.D. et al. „Multiple single-nucleotide polymorphism-based risk model for clinical outcomes after allogeneic stem-cell transplantation, especially for acute graft-versus-host disease“. *Transplantation* (2012), 94(12):1250–7.
- [207] **GEISSMANN**, F. et al. „Transforming growth factor beta1, in the presence of granulocyte/macrophage colony-stimulating factor and interleukin 4, induces

- differentiation of human peripheral blood monocytes into dendritic Langerhans cells“. *J Exp Med* (1998), 187(6):961–6.
- [208] **AIBA, S., MANOME, H., YOSHINO, Y. und TAGAMI, H.** „In vitro treatment of human transforming growth factor-beta1-treated monocyte-derived dendritic cells with haptens can induce the phenotypic and functional changes similar to epidermal Langerhans cells in the initiation phase of allergic contact sensitivity reaction“. *Immunology* (2000), 101(1):68–75.
- [209] **HACKER, C. et al.** „Transcriptional profiling identifies Id2 function in dendritic cell development“. *Nat Immunol* (2003), 380–386.
- [210] **HIERONYMUS, T., ZENKE, M., BAEK, J.H. und SERÉ, K.** „The clash of Langerhans cell homeostasis in skin: Should I stay or should I go?“ *Semin Cell Dev Biol* (2014), 1084–9521(14)00021–4.
- [211] **MUTYAMBIZI, K., BERGER, C.L. und EDELSON, R.L.** „The balance between immunity and tolerance: the role of Langerhans cells“. *Cell Mol Life Sci* (2009), 66(5):831–40.
- [212] **VAN DER AAR, A.M. et al.** „Langerhans cells favor skin flora tolerance through limited presentation of bacterial antigens and induction of regulatory T cells“. *J Invest Dermatol* (2013), 133(5):1240–9.
- [213] **PRINCIPE, D.R. et al.** „TGF- β : duality of function between tumor prevention and carcinogenesis“. *J Natl Cancer Inst* (2014), 106(2):djt369.
- [214] **LEVY, L. und HILL, C.S.** „Alterations in components of the TGF- β superfamily signaling pathways in human cancer“. *Cytokine Growth Factor Rev* (2006), 17(1–2):41–58.
- [215] **ITO, N. et al.** „Positive correlation of plasma transforming growth factor-beta 1 levels with tumor vascularity in hepatocellular carcinoma“. *Cancer Lett* (1995), 89(1):45–8.
- [216] **GHIRINGHELLI, F. et al.** „Tumor cells convert immature myeloid dendritic cells into TGF-beta-secreting cells inducing CD4+CD25+ regulatory T cell proliferation“. *J Exp Med* (2005), 202(7):919–29.
- [217] **IVANOVIC, V. et al.** „Elevated plasma levels of transforming growth factor-beta 1 (TGF-beta 1) in patients with advanced breast cancer: association with disease progression“. *Eur J Cancer* (2003), 39(4):454–61.
- [218] **WIKSTRÖM, P., STATTIN, P., FRANCK-LISSBRANT, I., DAMBER, J.E. und BERGH, A.** „Transforming growth factor beta1 is associated with angio-

- genesis, metastasis, and poor clinical outcome in prostate cancer“. *Prostate* (1998), 37(1):19–29.
- [219] **FRIESS**, H. et al. „Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival“. *Gastroenterology* (1993), 105(6):1846–56.
- [220] **JUNKER**, U. et al. „Transforming growth factor beta 1 is significantly elevated in plasma of patients suffering from renal cell carcinoma“. *Cytokine* (1996), 8(10):794–8.
- [221] **TEICHER**, B.A. „Transforming growth factor-beta and the immune response to malignant disease“. *Clin Cancer Res* (2007), 13(21):6247–51.
- [222] **RAJKOVIC**, I. et al. „Differences in T-helper polarizing capability between human monocyte-derived dendritic cells and monocyte-derived Langerhans'-like cells“. *Immunology* (2011), 132(2):217–25.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Von Herzen danke ich **Prof. Dr. Marina Kreutz** für die direkte und großartige Betreuung, die grenzenlose Geduld und die wunderbaren Ermutigungen. In Erinnerung bleiben mir insbesondere die anregenden Gespräche, die mir den Spaß an der Wissenschaft vermittelten und die hilfsbereite Unterstützung, die ich erfahren durfte. Ich habe aus meiner Zeit in der AG Kreutz wertvolle Erfahrungen mitgenommen und blicke mit Freude zurück.

Mein besonderer Dank gilt auch **Prof. Dr. Wolfgang Herr** sowie **Prof. Dr. Reinhard Andreesen** für die Ermöglichung meiner Forschungsarbeit am Institut für Hämatologie und Internistische Onkologie des Universitätsklinikums Regensburg.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt an dieser Stelle **Dr. Katrin Peter**, die mich wundervoll und unterstützend betreute, mir tröstete und aufbaute. Durch Deine konstruktive Hilfe, Deine besondere Geduld und deine Fürsorglichkeit warst Du eine tolle Betreuerin.

Einen großen Dank möchte ich **Prof. Dr. Michael Rehli** aussprechen, für das immer offene Ohr und den aufbauenden Humor.

Ich danke **Alice Peuker** (Alitschka) für das tolle Zusammenarbeiten, die Unterstützung und die Freundschaft. Und die Abendessen, als ich eine arme Studentin war.

Großer Dank gilt auch **Julia Resch**, die mir immer zur Seite stand und mich aufgebaut hat. Egal, welches Problem anstand.

Ich danke **Almut Brand** für die zahlreichen Gespräche, ob fachlich oder freundschaftlich, ich freue mich jedes Mal, von Dir zu hören. Du hast mich ausgehört und getröstet, wo es nur ging.

Dr. Julia Wimmer danke ich für eine wundervolle Laborzeit, Interesse an und Vertrauen in meine Akupunkturfähigkeiten. Deine Offenheit und Deine Geduld mit neuen Medizinstudenten haben mir meine Arbeit leichter gemacht.

Danke, liebe **Sandra Schmidhofer, Dr. Christian Schmidl, Dr. Claudia Gebhard** für die anregenden Diskussionen, die liebenswerte Offenheit und den Spaß, den wir zusammen hatten.

Ein großes „Merci“ an alle Mitarbeiter von AG Kreutz und AG Rehli: Danke, **Dagmar Glatz, Johanna Raithel, Gabi Schönhammer, Lucia Schwarzfischer-Pfeilschifter, Sandra Vogl, Monika Wehrstein, Julia**, und allen aus dem **H1** für die unvergessliche Zeit.

Ich danke **Saskia Patschorke, Andrea Kaiser** und **Marlene Kolitzus** für das Helfen, die Problemdiskussionen und das Zusammenarbeiten. Es war wirklich super mit Euch.

Mein Dank gilt auch meinen treuen **Freunden**, die mir immer zur Seite stehen und in allem unterstützen. Euer Beistand hat mir Kraft gegeben, nicht nur die letzten Monate.

Ich danke **Sabine** und **Gerwin**, die mich kompromisslos in die Familie aufgenommen haben und mir bei drei eigenen Kindern so viel Unterstützung in allen Belangen entgegenbringen können. **Michi** und **Martin** - danke für die Freundschaft und Brüderlichkeit.

Meiner **Mutter** kann ich nicht dankbar genug sein. Danke, dass Du mir so vieles im Leben ermöglicht hast. Insbesondere dass ich mein Studium und diese Doktorarbeit ohne finanzielle Sorgen abschließen konnte. Ohne Deine kompromisslose Liebe, Deinen hingebungsvollen Beistand und Deinen Stolz auf mich wäre ich jetzt nicht hier, weshalb ich Dir meine Dissertation widme.

Mein allergrößter Dank gilt Dir, **Benedikt**. Es gibt weder Anfang noch Ende für meine Dankbarkeit, deswegen: Danke für alles, für immer.

8.2 Eidesstaatliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe.

Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Ort, Datum

Marta Arturovna Penttinen