

**Aus der Frauenklinik und Poliklinik
der Universität Würzburg
Direktor: Professor Dr. med. J. Dietl**

**Einfluss von HLA-G und HLA-E exprimierenden K-562 Zellen
auf in-vitro kultivierte humane dendritische Zellen**

**Inaugural – Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von

Elisabeth Rödel
aus Ingolstadt**

Würzburg, Oktober 2004

Referentin: PD. Dr. U. Kämmerer

Koreferent: Prof. Dr. med. J. Dietl

Dekan: Prof. Dr. med. G. Ertl

Tag der mündlichen Prüfung: 09.05.2005

Die Promovendin ist Ärztin

**Meinen Eltern
und im Andenken an meinen Patenonkel**

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Schwangerschaft ein immunologisches Paradoxon.....	1
1.2	Histologie der feto-maternalen Grenzzone.....	2
1.3	Das MHC-System.....	4
1.3.1	HLA-G.....	4
1.3.2	HLA-E	4
1.4	Zytokine.....	5
1.4.1	Interleukin 8.....	5
1.4.2	Interleukin 10.....	6
1.4.3	Interleukin 12.....	8
1.4.4	Interleukin 18.....	9
1.4.5	Interleukin TNF- α	10
1.4.6	Gleichgewicht zwischen Th1/Th2	10
1.5	Dendritische Zellen	11
1.5.1	DC allgemein.....	11
1.5.2	Dendritische Zellen an der Feto-maternalen Grenzzone	13
1.6	Begründung der Arbeit/ Fragestellung	14
2	Material und Methoden	15
2.1	Material.....	15
2.1.1	Geräte	15
2.1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3	Puffer und Lösungen	17
2.1.4	Zellen und Zellkulturmedien	18
2.2	Methoden.....	19
2.2.1	Reinigung der Schafserythrozythen.....	19
2.2.2	Isolation dendritischer Zellen.....	20
2.2.2.1	Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes	20
2.2.2.2	Reifung dendritischer Zellen	21
2.2.3	Anlage der Kokulturen	22
2.2.4	Zytokin-ELISA.....	23

2.2.5	Statistische Auswertung	25
3	Ergebnisse.....	26
3.1	Konzentrationen von IL-8	26
3.2	Konzentrationen von IL-10	27
3.3	Konzentrationen von IL-12p70	28
3.4	Konzentrationen von IL-18	29
3.5	Konzentrationen von TNF- α	30
4	Diskussion	34
4.1	Einfluss auf IL-8.....	34
4.2	Einfluss auf IL-10.....	35
4.3	Einfluss auf IL-12.....	37
4.4	Einfluss auf IL-18.....	38
4.5	Einfluss auf TNF- α	39
4.6	Biologische Bedeutung von HLA-G	40
4.7	Biologische Bedeutung von HLA-E.....	41
4.8	Abschließende Betrachtung.....	42
5	Zusammenfassung	43
6	Literaturverzeichnis	45

1 Einleitung

Dieser Abschnitt stellt nur einen Ausschnitt wichtiger Hypothesen bezüglich der Schwangerschaft und ihrer immunologischen Sonderstellung dar. Er soll nicht dem Anspruch der Vollständigkeit gerecht werden, sondern nur einen Eindruck vermitteln, wie komplex die Thematik der Schwangerschaftsimmunologie ist. Verschiedenste Systeme, Zelltypen und Zytokine scheinen im Zusammenspiel eine erfolgreiche Schwangerschaft erst zu ermöglichen. Zum vollständigen Verständnis dieses immunologischen Paradoxons bedarf es noch intensiver Forschungsarbeit. Mit dieser Arbeit soll ein kleiner Beitrag zur Lösung dieses Rätsels geleistet werden

1.1 Schwangerschaft ein immunologisches Paradoxon

„Warum akzeptiert Deine Mutter Dich?“. Dies ist eine Frage die Reproduktionsmediziner und –immunologen schon seit langer Zeit beschäftigt. Ist doch die Implantation eines Embryos in den mütterlichen Uterus ein außergewöhnlicher Vorgang der Natur. Das fetale Genom besteht zur Hälfte aus mütterlichen und zur Hälfte aus väterlichen Anteilen. Es erscheint daher logisch anzunehmen, dass das mütterliche Immunsystem den Embryo abstoßen sollte, so wie es Gewebe mit väterlichen Immunmerkmalen abstößt¹. Dies geschieht jedoch in der Regel nicht. Während gesunder Schwangerschaften wird der Embryo als antigenfremder Organismus vom mütterlichen Immunsystem akzeptiert, ohne dass Abstoßungsreaktionen zu beobachten sind. Dieses immunologische Phänomen in der Schwangerschaft ist jedoch bisher größtenteils unverstanden.

Bereits 1953 diskutierten Billingham und Medawar² diese Frage. Sie stellten damals vier Hypothesen auf: (1) dem Fetus fehle die Fähigkeit Immunreaktionen hervorzurufen, (2) es komme zu einer signifikanten Herabsetzung der Immunantwort während der Schwangerschaft, (3) der Uterus habe immunologisch betrachtet einen Sonderstatus, (4) die Plazenta fungiere als immunologische Barriere.² Über die Jahre hinweg wurden die ersten drei Hypothesen verworfen. So zeigten Studien von Hoskin und Murgita³, dass es in Mäusen sehr wohl zu immunologischen Reaktionen gegenüber fetalen Zellen kommt,

und dass der Fötus selbst immunogene Eigenschaften besitzt. Weiterhin konnte in medizinischen Beobachtungen und Studien gezeigt werden, dass die Immunantwort schwangerer Frauen im Vergleich mit nicht schwangeren Frauen nicht signifikant erniedrigt ist.⁴ Die vierte Hypothese erscheint auch weiterhin noch gültig, wenn auch in modifizierter Form. Ursprünglich nahm man an, die Plazenta stelle eine passive oder neutrale Barriere dar. Petraglia et al.⁵ zeigten jedoch, dass die Plazenta ein Ort aktiver Toleranz ist. Die Toleranz des mütterlichen Immunsystems gegenüber dem antigenfremden Fetus scheint also hauptsächlich einen aktiven Mechanismus darzustellen, wobei das fetale Gewebe davor bewahrt wird, als fremd erkannt und/oder durch die Zellen des mütterlichen Immunsystems abgestoßen zu werden.⁴ Im Folgenden sollen nun die für diese Arbeit wichtigen aktuellen Hypothesen zur Erklärung dieses Phänomens vorgestellt werden.

1.2 Histologie der feto-maternalen Grenzzone

Die feto-maternale Grenzzone, welche durch die Plazenta des Feten und die Dezidua der Mutter gebildet wird, ist ein komplexes Gewebe aus unterschiedlichsten Zelltypen (Abbildung: Schema-Zeichnung). Auf der mütterlichen Seite finden sich in die Stromazellen der Dezidua eingebettet vor allem endometriale Drüsen, die charakteristischen Spiralarterien und eine große Population von CD45+ Leukozyten. Über 95% dieser Leukozyten unterteilen sich in die zwei großen Subpopulationen LGL und monozytäre Zellen sowie eine geringe Anzahl $\gamma\delta$ -T Zellen. Klassische $\alpha\beta$ -T Zellen finden sich nur sporadisch und B-Zellen sind praktisch nicht nachzuweisen. Im Rahmen der Plazentation wird die Dezidua in großem Umfang durch fetale Zytotrophoblasten (CTB) infiltriert, welche aus spezialisierten Zellsäulen, den „Ankerzotten“, der entstehenden Plazenta auswachsen. Diese CTB wandern durch die Dezidua bis in das innere Drittel des Myometriums, wo sie als sog. „plazentare Riesenzellen“ die äußere Grenze der Infiltrationszone bilden. Im Rahmen ihrer Invasion gelangen die CTB in engen Kontakt mit immunkompetenten Zellen der Dezidua, sodass eine Zell-Zell-Interaktion zwischen diesen beiden Zellsystemen wahrscheinlich erscheint.

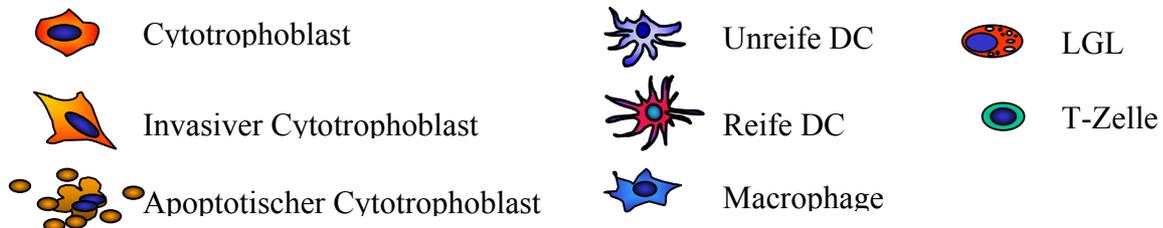
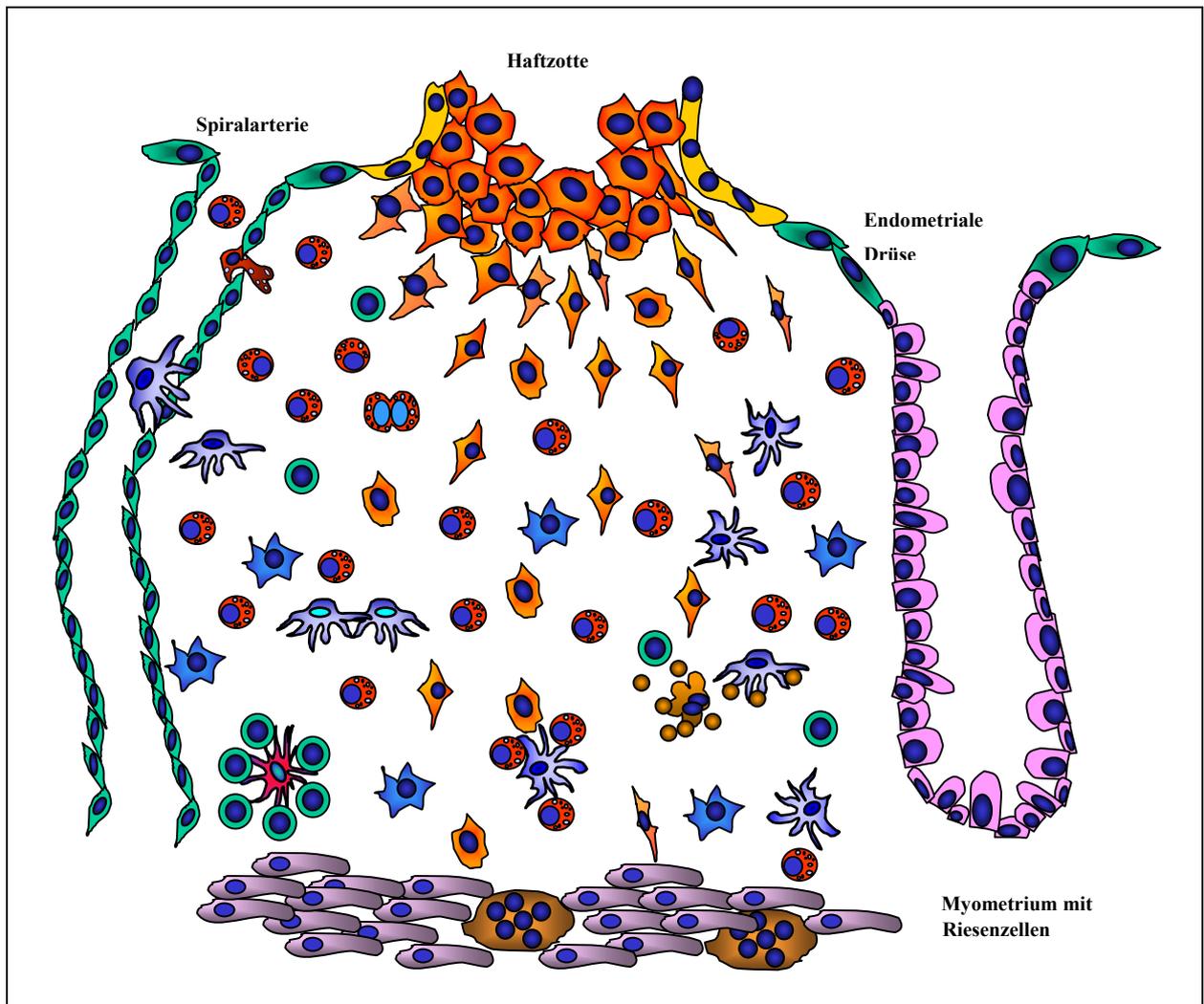


Abbildung 1:

Schema der feto-maternalen Grenzzone. Von oben kommend ist eine Haftzotte zu sehen, welche die Plazenta an der Dezidua verankert. Aus der Haftzotte wandern die Cytotrophoblasten in die Dezidua, wo sie in Kontakt mit den mütterlichen Immunzellen geraten, und weiter in das Myometrium aus. Unter diesen Immunzellen befinden sich besonders viele LGL (rote Zellen), welche häufig mit unreifen dendritischen Zellen (violett) assoziiert gefunden werden. Daneben sind relativ wenige T-Zellen zu finden, von denen etliche mit reifen DC (rot) assoziiert vorliegen, und eine große Population von Macrophagen (blau)

1.3 Das MHC-System

Alle Zellen des Körpers tragen Oberflächenmoleküle des „human leukocyte antigen“ (HLA)-Systems, über welche sie als körpereigen identifizierbar sind und daher auch „major histo-compatibility (MHC) system“ genannt werden. In diesem MHC-System gibt es zwei Klassen von Molekülen: Innerhalb der MHC-Klasse I Molekülgruppe sind derzeit sechs Untergruppen bekannt, die so genannten „klassischen“ Gruppen HLA-A,B,C und die „nicht-klassischen“ Gruppen HLA-E, F, G. Die „nicht-klassischen“ HLA-Moleküle zeichnen sich dadurch aus, dass sie nicht polymorph und kleiner als die klassischen Moleküle sind sowie nur in geringer Dichte auf den Zellen vorkommen. Eine besondere Rolle im Rahmen der Schwangerschaft wird HLA-G zugeschrieben, da es im menschlichen Organismus ausschließlich auf invasiven CTB zu finden ist.

1.3.1 HLA-G

HLA-G ist ein nicht-klassisches Molekül der HLA-Klasse I, von dem nur wenige Polymorphismen bekannt sind. Es ist an der Entwicklung immunologischer Toleranz beteiligt.⁶ Membrangebundenes HLA-G wird beinahe ausschließlich auf dem invasiven Trophoblasten exprimiert, der in direktem Kontakt mit immunkompetenten mütterlichen Zellen steht.⁷ Beobachtungen der letzten Jahre weisen darauf hin, dass diesem Molekül eine entscheidende Rolle in der Aufrechterhaltung einer gesunden Schwangerschaft zukommt.^{8, 9, 10} So konnte beobachtet werden, dass in präeklampsischen Plazenten die Expression von HLA-G deutlich vermindert war.¹¹ Weiterhin wurde gezeigt, dass einige Immunzellen den Rezeptor ILT-4 exprimieren, welcher durch das nicht-klassische HLA-G gebunden wird. Die Bindung dieses Rezeptors bewirkt die Übertragung negativer Signale, welche die durch stimulatorische Rezeptoren getriggerte frühe Signalgebung inhibieren.¹²

1.3.2 HLA-E

HLA-E ist ebenfalls ein nicht-klassisches Molekül der HLA-Klasse I. Anders als HLA-G ist HLA-E ein ubiquitär vorkommendes Antigen. Im Gegensatz zu anderen Molekü-

len der HLA-Klassen I und II ist es ebenfalls auf der Oberfläche des invasiven Trophoblasten zu finden¹³, jedoch in deutlich geringerer Dichte als HLA-G. Seine Expression während der Schwangerschaft ist abhängig von der des Moleküls HLA-G.⁸ HLA-E scheint gemeinsam mit HLA-G den Fetus davor zu bewahren, durch mütterliche NK sowie zytotoxische T-Zellen als fremd erkannt zu werden.¹⁴

Rieger et al¹⁵ konnten zeigen, dass die Zytokinproduktion durch LGL der Dezidua durch die Expression von HLA-G und HLA-E auf der Oberfläche des Trophoblasten reguliert wird. Bis dato gibt es jedoch noch keine näheren Erkenntnisse über die genauen Mechanismen der Interaktion zwischen immunkompetenten mütterlichen Zellen und HLA-Molekülen auf der Oberfläche des invasiven Trophoblasten. Es scheint allerdings unbestritten, dass sie eine wichtige Rolle für die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer erfolgreichen Schwangerschaft spielen.

1.4 Zytokine

Zytokine sind eine heterogene Gruppe von Proteinen, die allesamt von mononukleären Zellen gebildet werden. Sie wirken als Botenstoffe bei der Regulierung zellulärer Reaktionen. Zytokine sind in ihrer Wirkung pleiotrop, das heißt sie beeinflussen gleichzeitig mehrere Zellfunktionen und Zellfraktionen. Gemeinsame Charakteristika von Zytokinen sind ihr niedriges Molekulargewicht (<80kD), ebenso wie ihre Teilnahme an normalen Immunreaktionen und chronisch-inflammatorischen Prozessen. Zytokine werden normalerweise nur vorübergehend und lokal produziert und wirken in parakrinen autokrinen Mechanismen. Zytokine agieren und interagieren in Form eines Netzwerkes, wobei sie gegenseitig ihre Bildung induzieren können. Zudem können sie in ihrer Reaktion auf biologische sowie pathophysiologische Zellfunktionen synergistisch, antagonistisch und auch additiv wirken.

1.4.1 Interleukin 8

IL-8 gehört zur Gruppe der so genannten CXC Chemokine. Dies ist eine Familie von strukturell verwandten Zytokinen, für welche eine chemotaktische Aktivität für spezifische Leukozyten identifiziert werden konnte. CXC Chemokine ziehen vor allen Dingen

Neutrophile an und aktivieren diese. Sie werden nach exogener und endogener Stimulation durch eine Vielzahl verschiedener Zellen produziert.

IL-8 wird als Neutrophile aktivierendes Peptid von stimulierten Monozyten des peripheren Blutes gebildet.¹⁶ Weiterhin wurde es als ein Faktor aus stimulierten mononukleären Zellen isoliert, welcher nach Infiltration unter die Haut von Kaninchen eine Granulozytose und die Infiltration von Neutrophilen bewirkt.¹⁷ Zudem wird es als T-Zell chemotaktisches Peptid von mononukleären Zellen des peripheren Blutes sezerniert.¹⁸ Neben mononukleären Zellen wird IL-8 noch durch eine Reihe weiterer Zellarten produziert. Hierzu gehören andere Leukozyten (z.B. myeloide Vorläuferzellen, NK Zellen, Neutrophile, Eosinophile und Mastzellen), verschiedene gewebeständige Zellen (z.B. Fibroblasten, Endothelzellen, Epithelzellen) und auch Tumorzellen (z.B. Sarkome, Karzinome). Auch frisch isolierte dendritische Zellen (DC) des peripheren Blutes sezernieren IL-8 in niedriger Konzentration.¹⁹ Vissers et al. zeigten weiterhin, dass auch in-vitro aus Monozyten gewonnene reife und unreife DC IL-8 sezernieren, jedoch in deutlich geringerer Konzentration als die Monozyten selbst.

Die Produktion von IL-8 kann durch eine Vielzahl von Stimuli induziert werden. Dazu zählen verschiedene Zytokine (z.B. IL-1, TNF- α), bakterielle Produkte (z.B. LPS), virale Produkte (z.B. Doppelstrang-DNA) sowie verschiedene andere Induktoren. Eine gesteigerte Sekretion von IL-8 durch DC konnte unter dem Einfluss von bakteriellen Antigenen²⁰ sowie unter der Wirkung von oxidativem Stress gezeigt werden.²¹

IL-8 ist ein inflammatorisches Chemokin, welches über verschiedene Mechanismen, wie z.B. die chemotaktische Anziehung von Neutrophilen und die Induktion ihrer Degranulation, die Abwehr fremder Antigene ermöglicht. Es ruft vornehmlich entzündliche Reaktionen des Organismus hervor.

1.4.2 Interleukin 10

Das Zytokin IL-10 wurde entdeckt als „cytokine synthesis inhibitory factor“ (CSIF), welcher von murinen Th2-Zellklonen gebildet wird und die Zytokinproduktion aktivierter Th1-Zellklone inhibiert.²² Wenig später wurde auch humanes IL-10 beschrieben. Die Fähigkeit des Interleukins, die Zytokinproduktion durch T-Zellen ebenso wie durch

NK-Zellen zu inhibieren, konnte rasch auf inhibitorische Effekte auf die akzessorischen Zellen des Makrophagen-Monozyten-Systems zurückgeführt werden.^{23, 24} Diese Blockade der Aktivierung des Makrophagen-Monozyten-Systems ebenso wie der dendritischen Zellen führte dazu, dass IL-10 als „Makrophagen deaktivierender Faktor“ bezeichnet wurde.²⁵ Versuche an IL-10 defizienten Mäusen zeigten, dass IL-10 in vivo eine entscheidende Rolle für die Limitierung inflammatorischer Immunantworten spielt.²⁶ IL-10 zählt somit zu den Zytokinen der Th2-Familie.

Es wird nach entsprechender Aktivierung von Monozyten-Makrophagen, T-Zellen und B-Zellen produziert. Auch der Zytotrophoblast humaner Plazenta produziert IL-10²⁷, was vor dem Hintergrund dieser Arbeit von besonderem Interesse erscheint. Weiterhin konnte die Expression von IL-10 mRNA durch die Dezidua schwangerer Mäuse nachgewiesen werden.²⁸

Im Hinblick auf DC erscheint IL-10 ein wichtiger Regulator der Zell-Biologie zu sein. So zeigen Experimente von Corinti et al., dass autokrines IL-10 wichtig ist, um DC in einem unreifen Stadium zu erhalten.²⁹ IL-10 kann also die Reifung von DC blockieren. Unter der Wirkung von IL-10 gereifte DC zeigen eine reduzierte Sekretion der Th1-Zytokine IL-12 und IFN- γ und sind nicht mehr in der Lage, eine Immunantwort vom Th1-Typ zu induzieren.³⁰ Autokrines IL-10 scheint effizient die Fähigkeit der DC, Th1-Immunantworten zu initiieren, zu limitieren.²⁹ Zudem kann IL-10 unreife DC in tolerogene APC umwandeln, welche nur eine verminderte Fähigkeit besitzen Th1-Antworten zu induzieren.³¹

Andererseits können DC unter der Wirkung von IL-10 immunologisch naive T-Zellen zur Sekretion des Th2-Zytokines IL-4 veranlassen. IL-4 ist entscheidend für das Priming Th2-Zytokin-sezernierender T-Zellen. DC induzieren so unter dem Einfluss von IL-10 die Differenzierung von T-Helferzellen vom Typ2 im Rahmen der primären Immunantwort.³²

Unreife DC produzieren IL-10 auf einem niedrigen Level. Unter der Wirkung von bakteriellen Toxinen, dem Oberflächenmarker CD40 sowie IL-10 wird diese Produktion

gesteigert. Autokrines IL-10 zeigt also ein positives Feedback auf seine eigene Produktion.²⁹ Reife DC hingegen zeigen nur eine reduzierte Fähigkeit zur Bildung von IL-10.²⁹

1.4.3 Interleukin 12

IL-12 ist ein Zytokin der Th1-Familie. Es unterstützt die Differenzierung von T-Helferzellen vom Typ 1 aus indifferenten T-Helferzellen. Ursprünglich wurde es identifiziert aufgrund seiner ausgeprägten Fähigkeit zusammen mit IL-2 die Sekretion von IFN- γ durch NK und zytotoxische T Lymphozyten (CTLs) zu erhöhen, ebenso wie deren zytolytische Aktivität.³³ Anfangs wurde es als „NK stimulatory factor“ (NKSF),³⁴ „cytotoxic lymphocyte maturation factor“ (CLMF)³⁵ und auch als „T-cell stimulatory factor“ (TSF)³⁶ bezeichnet. Obwohl IL-12 ursprünglich aus EBV-transformierten-B-Zelllinien isoliert wurde, sezernieren normale B-Zellen das funktionelle IL-12-Heterodimer nicht.³⁷ Anstatt dessen scheinen Makrophagen und DC die Hauptproduzenten von IL-12 zu sein. In den drainierenden Lymphorganen scheinen in situ überwiegend DC IL-12 zu produzieren. Somit scheint die Produktion von IL-12 durch aktivierte APC eine entscheidende Rolle in der frühen Aktivierung der zellulären Immunität zu spielen.³⁸

Es wurde wiederholt gezeigt, dass auch nicht stimulierte DC IL-12 produzieren.³⁹ Jedoch sezernieren sie deutlich höhere Mengen nach Stimulation durch Bakterien oder bakterielle Produkte^{40, 41}, Viren⁴² oder durch Verknüpfen ihrer CD40 und/oder MHC Klasse II Moleküle.^{40, 43}

Das bioaktive Molekül stellt das Heterodimer IL-12p70 dar. Dieses liegt jedoch für nicht stimulierte DC fast immer unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA.⁴⁴ Für eine entsprechende Produktion von IL-12p70 sind geeignete Stimulantien erforderlich, wie zum Beispiel bakterielle Antigene. Jedoch sind die in den in unserer Arbeit verwendeten Medien für die In-Vitro-Differenzierung der DC enthaltenen Substanzen hierfür nicht ausreichend.⁴⁵ Unter der Wirkung bakterieller Antigene sowie des CD154/CD40-Liganden sezernieren sowohl unreife wie auch reife DC das bioaktive Molekül IL-12p70. Jedoch zeigen unreife DC eine signifikant aktivere Produktion als reife DC.⁴⁴ Es scheint, dass DC das bioaktive IL-12p70 vor allem dann ausschütten, wenn sie auf be-

stimmte Stimuli zur Ausreifung reagieren. Diese Fähigkeit reduziert sich je weiter der Reifungsprozess vorangeschritten ist.⁴⁵

Auch Zytokine beeinflussen die Produktion von IL-12p70 durch DC. IL-10 hemmt diese sowohl durch unreife als auch durch reife DC.⁴⁴ Im Gegensatz dazu steigert IL-4 die Produktion von IL-12p70. Aktivierte T-Zellen, die den CD40-Liganden exprimieren, können mit antigen-spezifischen T-Helferzellen vom Typ 1 direkt die Produktion von IL-12p70 durch DC und andere antigenpräsentierende Zellen induzieren, auch in Abwesenheit intrazellulärer Pathogene.^{46, 47}

Zusammenfassend bedarf es für eine hohe Produktion von bioaktivem IL-12p70 durch DC zwei Signale: zu Beginn eine APC-Aktivierung durch einen mikrobiellen Stimulus und eine Signalverstärkung durch CD40 während der DC – T-Zell Interaktion.⁴⁸

1.4.4 Interleukin 18

IL-18 ist ein inflammatorisches Zytokin, das bei verschiedenen inflammatorischen Bedingungen eine pathophysiologische Rolle spielt. IL-18 mRNA wird durch eine Vielzahl verschiedener Zellen des Immunsystems aber auch anderer Organe gebildet. Hierzu gehören zum Beispiel T-Zellen, B-Zellen, DC, Kupffer-Zellen, Makrophagen, Osteoblasten, Keratinozyten, Astrozyten sowie auch Mikroglia. IL-18 stimuliert die IL-12 - abhängige Immunantwort durch Th1-Zellen und fördert die Differenzierung von Th1-Zellen. Seine biologischen Funktionen sind sehr heterogen und kompliziert. Prinzipiell verstärkt IL-18 die IL12-bedingten Th1-Immunantworten, jedoch kann es in Abwesenheit von IL-12 auch Immunantworten durch Th2-Zellen stimulieren.⁴⁹

Verschiedene Subtypen von DC wie Langerhanszellen, DC aus Lymphknoten, DC des Knochenmarks ebenso wie humane monozytengenerierte CD83⁺ DC exprimieren IL-18 mRNA und produzieren ein bioaktives IL-18-Protein.⁵⁰ Die Synthese von IL-18 durch DC wird durch die Interaktion mit antigen-spezifischen T-Zellen moduliert. Die Anwesenheit von antigen-spezifischen T-Zellen bewirkt eine rasche Verminderung der IL-18-Produktion, welche eventuell einer unkontrollierten Immunantwort entgegen wirkt.⁵¹

1.4.5 Interleukin TNF- α

TNF- α ist ebenfalls ein inflammatorisches Zytokin der Th1-Familie. Carswell et al.⁵² beschrieben 1975 einen zytotoxischen Faktor, der im Serum von BCG-behandelten Mäusen nach Endotoxininjektion auftrat. Dieses Toxin konnte in vivo bei experimentellen Tumoren eine hämorrhagische Nekrose erzeugen, was Anlass zur Namensgebung war. Es wurde gezeigt, dass eine Vielzahl von Zellen sowohl des Immunsystems als auch anderer Organe TNF produzieren. Seine Synthese kann durch eine große Anzahl von Stimuli verschiedenster Zellen angeregt werden.⁵³ TNF wird von ruhenden Zellen nur in verschwindend geringen Mengen produziert, stellt jedoch einen wichtigen sekretorischen Faktor aktivierter Zellen dar.⁵⁴ Es konnte gezeigt werden, dass eine Überproduktion von TNF- α im Rahmen der Immunantwort sehr gefährlich oder sogar tödlich für den Organismus sein kann.⁵³ Aus diesem Grund ist es im Rahmen vieler Krankheitsbilder, insbesondere im Hinblick auf Autoimmunerkrankungen, ein Gegenstand intensiver Forschung.

Unter der Wirkung bakterieller Antigene, wie etwa Lipopolysaccharide, bilden auch DC TNF- α in nennenswertem Umfang.⁵⁵ Im Zusammenwirken mit Prostaglandin E2 (PGE2) unterstützt es die Produktion und Freisetzung von IL-12 durch DC. Durch entsprechende Stimulation der DC durch TNF- α und PGE2 wird zudem deren Ausreifung angeregt.⁵⁶

1.4.6 Gleichgewicht zwischen Th1/Th2

Eine wichtige Rolle im komplexen Zusammenspiel der Immunzellen spielen die so genannten T-Helfer (TH)-Zellen. Diese können sich in Abhängigkeit von den Zytokinen während der Antigenpräsentation aus Th0 Vorläuferzellen entweder in Th1 oder Th2 Zellen differenzieren. Diese Zytokine werden je nachdem ob sie die Differenzierung in Th1 oder Th2 Helferzellen anregen, der Th1 bzw. Th2-Gruppe zugeordnet. Unter dem Einfluss von IL-12 und IFN- γ differenzieren sich Th1 Zellen. Im Gegensatz dazu kommt es bei Kontakt mit IL-4 zur Bildung von Th2-Zellen.⁵⁷ Th1 Zellen synthetisieren IL-2 und IFN- γ , wohingegen Th2 Zellen IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 und IL-13 produzieren. Von beiden Zellreihen gebildet werden die Zytokine IL-3, TNF und GM-CSF. Das

Gleichgewicht zwischen Th1 und Th2 beeinflusst ganz entscheidend die Richtung der Immunantwort: Th1 bei inflammatorischen Reaktionen, Th2 bei eher Toleranz induzierenden Reaktionen.

Bei der Untersuchung des Gleichgewichts zwischen Th1 und Th2 in der Plazenta zeigte sich, dass eine Immunantwort in Richtung Th1 häufig mit Fehlgeburten assoziiert ist. Im Gegensatz dazu induzieren Th2 Zellen eine nicht inflammatorische Immunantwort, welche mit dem Überleben des Fetus vereinbar ist.^{58, 59, 60}

Nicht nur T-Zellen produzieren Zytokine im Grenzbereich zwischen mütterlichem und fetalem Gewebe.⁵⁸ Auch Synzytiotrophoblasten und Zytotrophoblasten produzieren Zytokine und können somit Einfluss nehmen auf das Gleichgewicht zwischen Th1 und Th2.⁶¹ Im Allgemeinen wird die Immunantwort während der Schwangerschaft in Richtung Th2 beeinflusst. Darüber hinaus sind monozytäre Zellen sowie LGL wichtige Quellen von Zytokinen im Bereich der feto-maternalen Grenzzone.

Eine wichtige Aufgabe zum Verständnis der Fortpflanzung ist die Identifizierung der Zellinteraktionen zwischen den verschiedenen zytokinproduzierenden Zellpopulationen von Uterus und Plazenta, die durch die Produktion regulatorischer Zytokine ein toleranzauslösendes Gleichgewicht während der Schwangerschaft aufrechterhalten.

1.5 Dendritische Zellen

1.5.1 DC allgemein

1868 beschrieb Langerhans erstmals dendritische Zellen der Haut. Dieser Erstbeschreibung folgte eine lange Phase der Spekulation über ihre Funktion. 1973 gelang es dann Steinman und Cohn⁶² erstmals DC in der Milz von Mäusen nachzuweisen. In einer Reihe darauf folgender Experimente konnten sie nachweisen, dass aus Lymphorganen gewonnene DC potente Stimulatoren primärer Immunantworten sind.⁶³ Es folgten Beobachtungen, dass sich DC auch in menschlichem lymphatischem und nicht-lymphatischem Gewebe fanden.⁶⁴ So wurden DC zum Gegenstand intensiver For-

schungsarbeiten, und sind es aufgrund ihrer Rolle als Schlüsselzellen der Immunantwort bis heute.

DC gehören zur Klasse der antigenpräsentierenden Zellen (APC). Innerhalb dieser Zellgruppe werden sie als die effizientesten ihrer Art gesehen. Sie sind besonders befähigt als zelluläres „Adjuvans“ T-Zell-mediierte Immunantworten auszulösen.⁶⁵ Ihre Eigenschaften in vivo können in mehreren zeitlichen und räumlichen voneinander verschiedenen Funktionsbereichen betrachtet werden. In all diesen Bereichen sind DC hoch spezialisiert und anderen Typen von APC (wie z.B. Makrophagen) weit überlegen.

Eine Besonderheit der DC besteht darin, dass sie während ihrer Entwicklung verschiedene Funktionszustände durchlaufen. Aus dem Knochenmark stammende unreife DC sitzen als „Außenposten des Immunsystems“ in der Peripherie. Sie sind sehr effizient darin Antigene zu binden und mit intrazellulären Kompartimenten von HLA-Molekülen in Kontakt zu bringen.^{66, 67} Pathogene Produkte wie bakterielle Lipopolysaccharide (LPS) und die lokale Produktion von TNF- α und IL-1, alles Mediatoren für die Reifung von DC, fördern die Wanderung peripherer DC in die T-Zell-Region lymphatischer Organe.⁶⁷ Auf der Wanderung durchlaufen die DC zellbiologische Veränderungen, die eine Umwandlung zu reifen DC bewirken. Reife DC haben eine deutlich geringere Fähigkeit neue Proteine zur Antigen-Präsentation zu binden, gleichzeitig verbessert sich ihre Fähigkeit ruhende CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen zu Wachstum und Ausdifferenzierung zu stimulieren.⁶⁶ Reife DC regulieren unter anderem über ihre Produktion von IL-12 die Entwicklung von T-Zellen, die für das an die DC gebundene Antigen spezifisch sind. In den Lymphknoten bilden DC enge dynamische Komplexe mit T-Zellen, um die T-Zellen zu finden, die den Rezeptor exprimieren, der zur Erkennung des Komplexes aus antigenetischem Peptid und HLA-Molekül auf der Oberfläche der DC in der Lage ist.⁶⁸ Weiterhin besitzen DC die Fähigkeit Antigene auch an Molekülen der HLA Klasse I zu präsentieren, um CD8⁺ zytotoxische Killerzellen zu erzeugen.⁶⁷

Einige Untersuchungen der letzten Jahre lassen die Vermutung nahe liegen, dass DC neben ihrer immunstimulierenden Potenz auch die Fähigkeit besitzen, einen antigentolerierenden Einfluss auf das Immunsystem auszuüben. So erscheint es wahrscheinlich,

dass DC im Thymus für die Elimination autoreaktiver T-Zellen verantwortlich sind.⁶⁹ Auch scheint es im Zusammenhang mit dem Zytokin IL-10 zu einer Funktionsänderung der potentiell immunstimulierenden DC zu kommen. So zeigten Untersuchungen von Steinbrink et al.⁷⁰, dass sich unreife DC unter dem Einfluss von IL-10 zu Toleranz induzierenden APC entwickelten. Unklar blieb jedoch bisher, ob tolerisierende DC rein durch Umgebungsfaktoren wie Zytokine aus potentiell immunstimulierenden DC transformiert werden, oder ob sie eine eigene Subpopulation darstellen, wie sie für verschiedene Gewebe beschrieben wurden.⁷¹

1.5.2 Dendritische Zellen an der Feto-maternalen Grenzzone

In Anbetracht ihrer weit verbreiteten Lokalisation sowie ihrer Fähigkeit zur Migration, ebenso wie ihrer Potenz sowohl stimulatorischen als auch tolerisierenden Einfluss auf das Immunsystem zu nehmen, sind DC sehr interessante Kandidatenzellen in der Frage der immunologischen Regulierung der Frühschwangerschaft.

Kämmerer et al.⁷² zeigten, dass humane Dezidua immunstimulatorische CD83⁺ DC enthält, welche den aus Monozyten des peripheren Blutes gewonnen DC ähneln. Es stellt sich nun die Frage, ob diese immunstimulatorischen DC wichtige Mediatoren in der Regulierung des immunologischen Gleichgewichtes zwischen mütterlichem und fetalem Gewebe sein könnten. Ungeklärt ist bisher, ob neben dieser nachgewiesenen DC-Fraktion auch eine immuntolerisierende DC-Population enthalten ist. Kämmerer et al.⁷³ gelang es kürzlich DC-SIGN exprimierende APC in menschlicher Dezidua nachzuweisen. Diese APC zeigen viele Charakteristika unreifer DC. Zudem konnte in vitro nach Stimulation mit einem Cocktail inflammatorischer Zytokine eine Ausreifung von DC-SIGN⁺-Zellen in potente immunstimulatorische CD83⁺/CD25⁺ reife DC beobachtet werden. Kämmerer et al.⁷³ postulieren, dass DC-SIGN⁺-Zellen zur Gruppe der „veiled immediate DC precursors“ gehören. Dies ist eine Gruppe von Zellen, die sich abhängig vom umgebenden Zytokin- und Zellmilieu entweder zu reifen DC oder Makrophagen differenzieren können. Die Präsenz von DC-SIGN⁺-Zellen in der Dezidua ist ein an Schwangerschaft gekoppeltes Phänomen. DC-SIGN⁺-Zellen könnten also eine immuntolerisierende DC-Population der Dezidua während der Schwangerschaft darstellen.

Eine solche mögliche immuntolerisierende Funktion der DC wäre ein potentieller Mechanismus für die Immuntoleranz des mütterlichen Organismus gegenüber den antigen-

fremden embryonalen Zellen. Die Trophoblasten und die Zellen der Dezidua produzieren signifikante Mengen an IL-10.⁷⁴ So wäre auch hier der bereits oben erwähnte IL-10 vermittelte tolerisierende Mechanismus möglich.⁷⁰

1.6 Begründung der Arbeit/ Fragestellung

Während einer normalen Schwangerschaft soll die Produktion der immunsuppressiven und die Antikörperbildung anregenden Zytokine vom Th2-Typ durch T-Helferzellen gegenüber der inflammatorischer Zytokine vom Th1-Typ überwiegen.⁵⁸ Derzeit ist unbekannt, in welcher Weise dieses schwangerschaftsprotective Zytokinmilieu geschaffen wird. Rieger et al.¹⁵ konnten zeigen, dass die Zytokinproduktion durch LGL der Dezidua durch die Expression von HLA-G und HLA-E auf der Oberfläche des Trophoblasten reguliert wird. Bis dato gibt es jedoch noch keine näheren Erkenntnisse über die genauen Mechanismen der Interaktion zwischen immunkompetenten mütterlichen Zellen und HLA-Molekülen auf der Oberfläche des invasiven Trophoblasten. Es scheint allerdings unbestritten, dass sie eine wichtige Rolle für die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer erfolgreichen Schwangerschaft spielen. Über die Interaktion von Trophoblasten mit der zweiten wichtigen mütterlichen Immunzellpopulation, den DC gibt es bisher keine Erkenntnisse. Es stellte sich die Frage, ob die Interaktion mit HLA-G und HLA-E die Zytokinproduktion der DC moduliert, wie dies auch bei den LGL der Fall war.

In dieser Arbeit wurden daher Zellen der leukämischen Zelllinie K562 verwendet, welche keine klassischen HLA-Moleküle exprimieren. Diese wurden mit HLA-G und HLA-E transfiziert und dienten als Modell für Zellen des invasiven Trophoblasten. Als Modellsystem für die DC der feto-maternalen Grenzzone wurden monozytengenerierte dendritische Zellen verwendet, welche mit den Transfektanten kokultiviert wurden, um den Einfluss von membrangebundenem HLA-G und HLA-E auf die Produktion von Zytokinen durch DC zu untersuchen. Untersucht wurden die Zytokine IL-10, IL-12, IL-18 und TNF- α sowie das Chemokin IL-8.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Alle Prozentangaben zu Lösungen verstehen sich für Feststoffe als Gewichts- für Flüssigkeiten als Volumenprozent.

2.1.1 Geräte

Zellkulturausstattung

Sterilwerkbank SterilGARD® Class II TypA7B3

Brutschrank Inkubator NAPCO 5420-1

Lichtmikroskop Leica DM IRB

Zählkammer Brand Neubauer-Zählkammer Tiefe 0,1mm Fläche 0,0025mm

Zentrifugen

Hettich EBA 12

Hettich Universal 16R

Waagen

Kern 510-33

Scaltec SAC 51

Ohaus 5000

sonstige Geräte

Biophotometer, Eppendorf

ELISA Reader MRX, Dynex Technologies

Heizblock Techne Dri-Block® DB2A

Magnetrührer Variomag® Electronicrührer, Monotherm

PH-Meter GPRT 1400A, Greisinger Electronic

Vortex MS1 Minishaker, IKA®

Software

WinWord, Powerpoint, Microsoft Statistica, Statsoft

2.1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterialien

geordnet nach Herstellern

Verbrauchsmaterialien

American National Can™	Parafil "M"
Brand	Reaktionsgefäße 1,5ml, Zentrifugenröhrchen 15ml und 50ml
Brand	Original Perfusorspritze OPS 50ml
Costar	Zellkulturplatten: Cell culture Cluster 48 well
Eppendorf	Combitips, Pipettenspitzen, Plastikkuvetten
Greiner	Kryoröhrchen, Petrischalen Cellstar ®
	Pipettenspitzen, Reaktionsgefäße 1,5 Zentrifugenröhrchen
Hartmann	Pehazell® Zellstoff
Nunc	ELISA-Platten NUNC-Immuno™Platte 96-well
TPP	Petrischalen für Zellkultur 100*20mm

Chemikalien und Medienansätze

Biochrom	PBS Dulbeco, Alsever Lösung, Zellkulturmedium RMPI 1640, Gentamycinsulfat, Penicillin/Streptomycin
Boehringer Ingelheim	Neuraminidase
CAI Biochem	Prostaglandin E ₂
Centeon	Beriglobin
DAKO	Ziegenserum (normal)
Endogen	Merrettichperoxidase konjugiertes Streptavidin
Merck	Zitronensäure (Monohydrat)
Pharmingen	Substrat Reagenzien A und B (für ELISA) ELISA-Sets: Opt EIA™Set Human IL-8, IL-10, TNF-α

	IL-12p70
PAN	Fetales Kälberserum (FCS)
Sandoz	GM-CSF (Leukomax400®)
Sigma	Histopaque-1077, EDTA, Tween20, 2-Mercaptoethanol, Dexamethason (9a-Fluoro-16a-methylpred-nisolon, Trypanblau Lösung 0,4%, Rinder Serumalbumin, DMSO
Strathmann	Zellkulturzusätze IL-4, IL-6, IL-1 β , TNF- α

Antikörper

R&D Systems	Beschichtungs- und Detektions-Antikörper für IL-18
-------------	--

2.1.3 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben wurde destilliertes Wasser als Lösungsmittel verwendet.

Medienzusätze (Stocklösungen)

Pen/Strep	10000 E/ml Penicillin + 10000 μ l/ml Streptomycin
Gentamycin	10 mg/ml Gentamycinsulfat
GM-CSF (1:200)mit 0,1% BSA	100 U/ μ l gelöst in RMPI 1640 mit Gentamycin
IL-4	500 U/ μ l gelöst in PBS mit 0,1% BSA
IL-1 β 10% FCS	1000 U/ μ l in RPMI 1640 mit Gentamycin (1:200) mit 10% FCS
IL-6	1000 U/ μ l in RMPI 1640 mit Gentamycin (1:200) mit 10% FCS
TNF- α	1000 U/ μ l in RMPI 1640 mit Gentamycin (1:200) mit 10% FCS
PGE ₂ Reifungscocktail	IL-1 β (10000 U/ml), IL-6 (10000 U/ml), TNF- α (10000 U/ml), PGE ₂ (10 ⁻⁸ mol/ml) gelöst in RMPI 1640 mit 10% FCS und Gentamycin (1:200)

Lösungen und Zellisolierung

PBS	9,55g Pulverkonzentrat gelöst in 1l H ₂ O
Alsever Lösung	unverdünnt eingesetzt
PBS mit Pen/Strep	Verdünnung 1:200
PBS/Citrat	1 Volumenanteil 0,106M Na-Citrat-Lösung mit 9 Teilen PBS
PBS/EDTA	PBS mit 2mM EDTA
PBS mit Neuraminidase	0,01 U/ml
Lsyepuffer für Schafs- erythrozyten	8M NH ₄ Cl

ELISA

Beschichtungspuffer IL-18	PBS, pH 7,4
Beschichtungspuffer IL-8	8,4 NaHCO ₃ + 3,56g Na ₂ CO ₃ auf 1l H ₂ O, pH 9,5
Beschichtungspuffer IL-12p70	11,8g Na ₂ HPO ₄ + NAH ₂ PO ₄ auf 1l H ₂ O, pH 9,5
Verdünnungsmittel für OptEIA	PBS mit 10% FCS
Verdünnungsmittel IL-18	20mM TBS (20mM Tris-Base 150mM NaCl) mit 0,1% BSA und 0,05% Tween 20, pH 7,3
Wasch-Puffer für OptEIA-Sets	PBS mit 0,05% Tween 20, pH 7,4
Wasch-Puffer IL-18	PBS mit 0,05% Tween 20, pH 7,4
Substrat-Lösung	Tetramethylbenzidine und Hydrogen Peroxid im Verhältnis 1:1
Stopp-Lösung	2M H ₂ SO ₄

2.1.4 Zellen und Zellkulturmedien*Zellen*

Dendritische Zellen isoliert aus Buffycoats von Blutspendern der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Würzburg. Die Buffycoats wurden ca. 24h nach der Spende verarbeitet.

Schafserythrozythen isoliert aus Schafsblut von Schafen aus den Tierställen der Universitätsklinik Würzburg. Das Schafsblut wurde ca. 2h nach Blutabnahme weiterverarbeitet.

K562 Leukämiezelllinie, die ihren Ursprung in einer chronisch-myeloischen Leukämie hat und aus Knochenmark gewonnen wird. Morphologisch entstammen die Zellen einem Lymphoblasten. Die Zelllinie wurde zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. E.H. Weis, Institut für Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilian-Universität München.

K562 (HLA-G) mit dem MHC-Klasse-I-Molekül HLA-G transfizierte K562-Zelllinie. Zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. E.H. Weis, Institut für Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilian-Universität München.

K562 (HLA-E) mit dem MHC-Klasse-I-Molekül HLA-E transfizierte K562-Zelllinie. Zur Verfügung gestellt von Frau Prof. Dr. E.H. Weis, Institut für Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilian-Universität München.

Medien

Differenzierungsmedium	RPMI 1640 mit 10% FCS und Gentamycin (1:200) mit GM-CSF (10µl/ml) und IL-4 (1,6µl/ml)
Reifungsmedium	RPMI 1640 mit 10% FCS und Gentamycin (1:200) mit Cocktail (100µl/ml)

2.2 Methoden

2.2.1 Reinigung der Schafserythrozythen

Schafserythrozythen erlauben aufgrund spezieller Oberflächeneigenschaften eine Rosettierung von T-Zellen. Eine solche Rosettierung ermöglicht die Isolation von T-Zellen aus einer Zell-Suspension. Ausgegangen wurde von einer Mischung aus 30 ml frisch gewonnenem Schafsblut, das zur Gerinnungshemmung direkt bei der Blutentnahme mit

20 ml Alsever-Lösung versetzt wurde. Das Schafsblut wurde in PBS gewaschen und bei 1100xg für 10 min ohne Bremse zentrifugiert. Der gebildete Überstand entsprach dem Buffycoat, d.h. allen leukozytären Bestandteilen des Blutes. Durch sorgfältiges Abnehmen dieses Überstandes wurde das Schafsblut von den leukozytären Anteilen befreit. Anschließend wurden die Schafserythrozythen mit 0,005 U Neuraminidase pro ml verwendeten Schafsblutes für 30 min bei 37°C inkubiert. Darauf folgten drei weitere Waschschrte, in welchen die Schafserythrozythen mit PBS mit Penicillin und Streptomycin aufgefüllt und abzentrifugiert wurden. Das am Ende gewonnene Pellet wurde in 0,4 ml RPMI 1604/Genta/10% FCS pro ml verwendeten Schafsblutes aufgenommen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die gereinigten Schafserythrozythen konnten für circa eine Woche nach der Isolation verwendet werden. Eine Ausgangsmenge von 50 ml Schafsblut mit Alsever-Lösung genügte für die Isolation von vier humanen Buffycoats.

2.2.2 Isolation dendritischer Zellen

Die Isolation dendritischer Zellen erfolgte weitgehend nach dem Standard-Protokoll von Romani et al.⁶⁶

2.2.2.1 Isolation der mononukleären Zellen des peripheren Blutes

Mononukleäre Zellen des Blutes werden im Englischen als peripheral blood mononuclear cells bezeichnet und im Folgenden PBMC abgekürzt.

Die Isolation der PBMC erfolgte ausgehend von den Buffycoats der Transfusionsmedizin. Jeder Buffycoat entsprach dem leukozytären Anteil von 500 ml Vollblut. Die Buffycoats wurden steril geöffnet und nach Verdünnen mit PBS/Citrat auf Histopaque-Gradienten aufgetragen. Pro Buffycoat wurden drei 50 ml Röhren mit je 15 ml vorgelegtem Histopaque mit dem Leukozytengemisch beladen. Nach 30 min Zentrifugation mit 400xg ohne Bremse bildeten sich drei Phasen. Die oberste Phase wurde von Plasma gebildet. Dieses wurde abgenommen und die darin enthaltenen Thrombozythen bei 3000xg abzentrifugiert, so dass es bei kühlerer Lagerung weiter verarbeitet werden konnte. Die mittlere Phase enthielt die PBMCs. Diese Phase wurde sorgfältig abgenommen. Die PBMCs wurden in PBS/Citrat gewaschen und für 10 min bei 300xg zentrifugiert. Um die T-Zellen aus dem PBMC-Zell-Gemisch zu entfernen, wurde das

aus der Zentrifugation gewonnene PBMC-Pellet in 5 ml der vorbehandelten Schafse-rythrozythen aufgenommen und bei 4°C eine Stunde lang inkubiert. Während der Inku-bation bildeten die T-Zellen mit den Schafserythrozythen rosettenähnliche Vernetzun-gen. Diese Rosetten machten es möglich die T-Zellen mittels einer weiteren Zentrifuga-tion über einen Histopaque-Gradienten aus dem Zellgemisch abzutrennen. Es entstan-den wiederum drei Phasen. Die oberste Phase wurde verworfen. Die mittlere weißliche Phase, welche die Monozyten, Granulozyten und B-Zellen enthielt, wurde vorsichtig abgenommen und in PBS/EDTA gewaschen. Um etwaige Schafsblutspuren aus der Monozytenfraktion zu entfernen wurden die Zellen kurz in 8M NH₄Cl gespült und an-schließend erneut in PBS/EDTA gewaschen und danach gezählt.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurde der Adhärenzschritt vorbereitet. Dieser Schritt diente dazu nicht plastikadhärente Zellen aus dem Zellgemisch zu separieren. Je 30 Mil-lionen Zellen wurden in 10 ml RPMI/Genta mit 2% autologem Plasma in einer Petri-schale für 60 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die nicht adhärenen Zellen abgenommen und die Zellkulturschalen zweimal gründlich mit PBS/EDTA gewaschen. Im Anschluss wurde die verbliebene adhärenente Zellfraktion für sieben Tage in 8 ml Differenzierungsmedium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Die Medien wurden am Tag drei sowie am Tag fünf gewechselt. Hierbei wurde jeweils nur die Hälfte des Mediums durch frisches Medium mit IL-4 und GM-CSF ersetzt.

2.2.2.2 Reifung dendritischer Zellen

Durch die siebentätige Kultur der adhärenenten Monozytenfraktion in GM-CSF und IL-4 differenzierten die Zellen zu unreifen dendritischen Zellen. Die Reinheit lag ungefähr bei 96% HLA-DR positiven Zellen.

Ab dem siebten Tag wurde die Hälfte der aus einem Buffycoat gewonnen unreifen DC für drei Tage mit einem speziellen Zytokin-Cocktail aus IL-1 β , IL-6, TNF- α und PGE₂ kultiviert. Dieser Zytokin-Cocktail bewirkte eine Differenzierung in Richtung reifer DC (mDC) mit einer entsprechenden Veränderung ihrer Morphologie und Expression be-

stimmter Oberflächenmarker wie CD83 und der Aktivierungsmarker CD86 und CD40. Nach dreitägiger Kultur im Reifungsmedium mit dem benannten Zytokin-Cocktail zeigte diese Zellfraktion am Tag zehn einen reifen Phänotyp.

Die zweite Hälfte der aus dem Buffycoat gewonnen unreifen DC wurde für weitere drei Tage in einem Medium mit IL-4 und GM-CSF kultiviert. Diese Fraktion der DC zeigte am Tag zehn weiterhin den unreifen Phänotyp.

2.2.3 Anlage der Kokulturen

Die Zelllinie K562 wurde in RPMI 1640/10% FCS/Gentamycinsulfat 25mg/ml, die Zelllinien K562 (HLA-G) und K562 (HLA-E) in oben genanntem Medium mit G418 kultiviert. Für die Kokulturen wurden 4×10^5 Zellen pro Well in 48 Well Kokulturplatten ausgesät. Zusätzlich wurde pro ursprünglichem Buffycoat ein Well mit Medium pur als Kontrolle angelegt.

Diese Kokulturplatten wurden für zwei Stunden im Brutschrank inkubiert, um einen semikonfluenten Zellrasen bzw. eine konstante Zellsuspension zu erhalten. Anschließend wurden die Kokulturplatten mit UV-Licht bestrahlt, um ein Weiterwachsen der Tumorzellen zu verhindern.

Danach wurden die vorgelegten Zellen mit der gleichen Anzahl von DC, welche am Tag zehn der Anzucht gewonnen wurden, überschichtet. Für jeden Buffycoat wurden zehn Experimente durchgeführt, fünf für unreife DC und fünf für reife DC. Die Zellgemische wurden jeweils in einem Gesamtvolumen von 1,5ml PBS/Pen/Strep für 24 Stunden bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Nach 24 Stunden wurde der Zellüberstand abzentrifugiert. Pro Well wurden das Zellpellet in einem Eppendorf-Röhrchen und der Zellüberstand aufgeteilt auf fünf Eppendorf-Röhrchen bei -20°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

2.2.4 Zytokin-ELISA

Die Zytokinmessungen erfolgten in den Kokulturüberständen, die aus oben beschriebenen Kokulturen entnommen, aliquotiert und bei -20°C eingefroren wurden. Insgesamt wurden Überstände aus Buffycoats von 20 gesunden Blutspendern gemessen. Gemessen wurden die Zytokinspiegel von IL-10, IL-12(p70), der funktionellen Form dieses Zytokins, IL-18, TNF- α sowie das Chemokin IL-8. Verwendet wurden OptEIA ELISA-Sets von Pharmingen. Die Antikörper für IL-18 wurden von R&D Systems bezogen. Die Durchführung der ELISAs wurde nach Herstellerangaben etabliert und optimiert.

Die Zytokinmessungen erfolgten für alle Zytokine und das Chemokin IL-8 nach einem einheitlichen Schema.

Am Abend vor dem Versuchstag wurden die Platten mit einem Bindeantikörper beschichtet. Hierfür wurden für eine 96-Well-Platte 10 ml des Beschichtungspuffers mit der dem Zytokin entsprechenden Antikörpermenge gemischt und je $100\mu\text{l}$ der entsprechenden Lösung pro Well aufgetragen. Für IL-8, IL-10, IL-12p70 und TNF- α betrug die Verdünnung 1:250. Der Antikörper für IL-18 wurde in einer Konzentration von $2\mu\text{g/ml}$ angesetzt. Nach dem Beschichten der Wells wurden die Platten mit einer Klebefolie zugeklebt und über Nacht bei 4°C im Kühlschrank stehen gelassen, mit Ausnahme der Platte für IL-18, diese wurde über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Beschichtungslösung abgegossen und die Platten auf Papier trocken geklopft. Im Anschluss wurden $300\mu\text{l}$ Waschpuffer in jedes Well pipettiert, etwa 30 Sekunden stehen gelassen, abgekippt und die Platte danach trocken geklopft. Dieser Waschschrift wurde noch zweimal wiederholt. Anschließend wurden zum Abblocken unspezifischer Bindungen $200\mu\text{l}$ des Verdünnungs-Puffers in jedes Well aufgetragen. Danach wurden die Platten abgeklebt und für eine Stunde bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Während des Blockens der Platten wurden die Verdünnungsreihen der Standards angesetzt. Die Ermittlung der optimalen Standardreihe erfolgte in den Optimierungsversuchen und lag im Bereich zwischen 2000pg/ml und 0pg/ml . Entsprechend mussten die Proben je nach erwartetem Gehalt verdünnt werden.

Nach einer Inkubationszeit von einer Stunde wurde der Verdünnungs-Puffer abgekippt und die Platten dreimal mit 300µl des Waschpuffers je Well gewaschen und trocken geklopft. Anschließend wurden je 100µl der Standards und Proben als Doppelansatz in je zwei benachbarte Wells aufgetragen. Dann wurden die Platten verklebt und für zwei Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen.

Nach der Inkubation wurden die Platten erneut wie oben beschrieben gewaschen, diesmal jedoch fünfmal. Nach dem Waschen wurde der Detektionsantikörper zugegeben. In diesem Schritt unterschied sich die Vorgehensweise für den Ansatz der OptEIA-Sets (IL-8, IL-10, IL-12p70, TNF- α) und dem für die Bestimmung von IL-18.

Für die OptEIA-Sets wurden der entsprechende Detektionsantikörper und Horseradish-Peroxidase markiertes Streptavidin (Strept-HRP), beides in einer Verdünnung von 1:250, gut gemischt. Nach dem Waschen wurden jeweils 100µl der Detektionsantikörper/Strept-HRP-Lösung in jedes Well aufgetragen. Die Platten wurden erneut verklebt und für eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Bei dem ELISA für IL-18 erfolgte die Gabe von Antikörper und Strept-HRP getrennt. Hierbei musste der Detektionsantikörper eine Stunde vor Gebrauch mit 2%-hitzeinaktiviertem Ziegen Serum versetzt werden. Nach dem Waschen wurden dann zunächst 100µl je Well der Antikörperlösung in einer Konzentration von 250ng/ml aufgetragen. Nach einer Inkubationszeit von zwei Stunden bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal gewaschen. Anschließend wurde jedes Well für 20 Minuten mit 100µl Strept-HRP versetzt. Die optimale Verdünnung wurde in Vorversuchen ermittelt und lag bei 1:8000.

Nach der Inkubation wurde die Detektionsantikörper/Strept-HRP-Lösung abgegossen und siebenmal (bzw. für IL-18 dreimal) mit Waschpuffer gewaschen und trocken geklopft. Im Anschluss wurden 100µl Substratlösung in jedes Well gegeben und die Platte abgedeckt. Da das verwendete Substrat lichtempfindlich war, musste die enzymatische Reaktion im Dunkeln ablaufen. So wurden die Platten für 30 Minuten bei Raumtemperatur an einem abgedunkelten Ort stehen gelassen. Nach exakt 30 Minuten wurde die

Reaktion durch die Zugabe von 50µl Stopp-Lösung in jedes Well unterbrochen. Sichtbar wurde dies durch den Farbumschlag von blau nach gelb

Zur Auswertung wurden die Platten bei 450nm in den ELISA Reader gegeben. Bei 450nm konnte die optische Dichte der Lösungen und somit die Zytokinmenge photochemisch bestimmt werden. Die erhaltenen Daten wurden für valide erachtet, wenn die photometrisch gemessenen Werte mindestens 2 Standardabweichungen über dem Nullwert der Standardkurve lagen.

2.2.5 Statistische Auswertung

Die gemessenen Daten wurden mit dem Shapiro-Wilkins-Test auf eine Normalverteilung überprüft. Da die Messergebnisse keiner Normalverteilung entsprachen, erfolgte die weitere Auswertung mit einem nicht-parametrischen Test für gepaarte Proben. Hierfür wurde der „two-tailed Wilcoxon matched pair log rank test“ gewählt. Statistische Vergleiche wurden stets an Rohdaten vorgenommen. Werte mit $p < 0,05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet, Werte mit $p < 0,01$ als hochsignifikant. Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Statistikprogramm Statistica Version 5.1 durchgeführt.

3 Ergebnisse

3.1 Konzentrationen von IL-8

Die Kokulturen von unreifen und reifen DC mit nicht transfizierten K-562-Zellen resultierten in einem signifikanten ($p=0,003$) Anstieg der Produktion von IL-8 durch die DC im Vergleich zu Kulturen reiner DC.

Bei der Kokultur von unreifen DC mit den Transfektanten K-562-G und K-562-E kam es dagegen zu einem signifikanten ($p=0,003$) Absinken der Konzentration von IL-8 im Überstand, so dass der durch den Kontakt mit nackten K-562-Zellen vermittelte Anstieg der Zytokinausschüttung durch die Kokultur mit K-562-G und K-562-E weitgehend wieder egalisiert wurde (Tab.1).

In ähnlicher Weise war bei der Kokultur von reifen DC mit K-562-G und K-562-E ein signifikanter ($p=0,007$ und $p=0,033$) Abfall der Produktion von IL-8 zu verzeichnen (Tab.2).

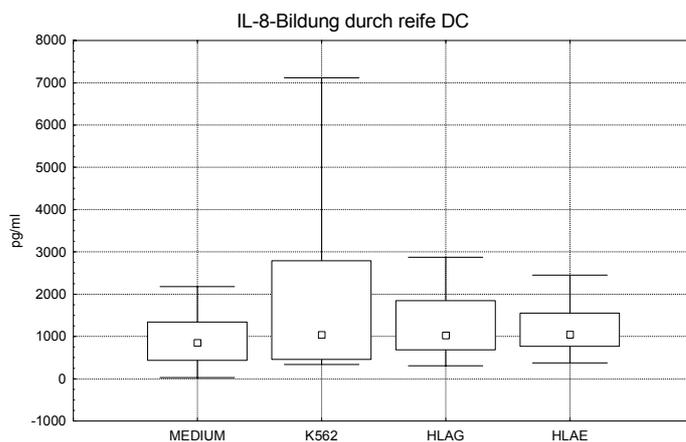


Abbildung 2: Box- und Whisker Plots der Statistikdaten der gemessenen Konzentrationen von IL-8 im Zellkulturüberstand von reifen DC.

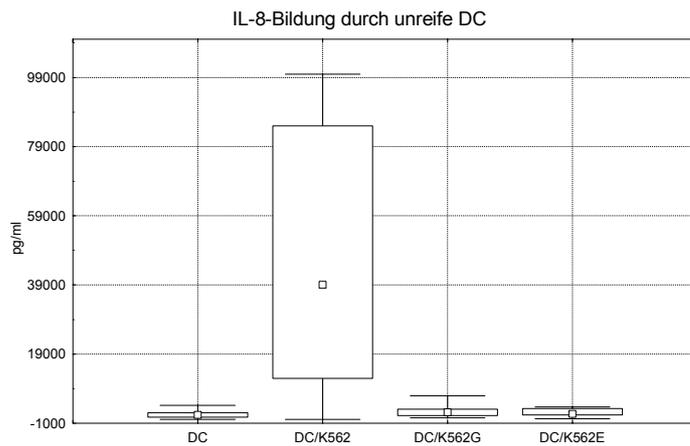


Abbildung 3: Box- und Whisker Plots der Statistikdaten der gemessenen Konzentrationen von IL-8 im Zellkulturüberstand von unreifen DC.

3.2 Konzentrationen von IL-10

Bei der Kokultur von unreifen DC mit HLA-freien K-562-Zellen kam es ebenso zu einem signifikanten ($p=0,001$) Anstieg der Konzentration von IL-10 im Überstand im Vergleich zu den Kontroll-DC.

Verglichen mit den Kokulturen mit den untransfizierten Zellen sank bei der Kokultur von unreifen DC mit den Transfektanten K-562-G und K-562-E die Produktion von IL-10 signifikant ($p=0,001$ und $p=0,003$) ab (Tab.1)

Bei der Kokultur von reifen DC mit transfizierten und nicht transfizierten K-562-Zellen war keine Änderung der Konzentration von IL-10 im Vergleich zu den reinen DC zu beobachten, wobei die gemessenen Werte im Bereich der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA lagen.

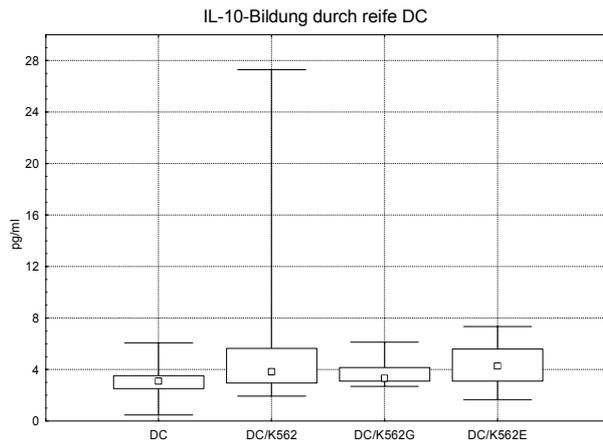


Abbildung 4: Box- und Whisker Plots der Statistikdaten der gemessenen Konzentrationen von IL-10 im Zellkulturüberstand von reifen DC

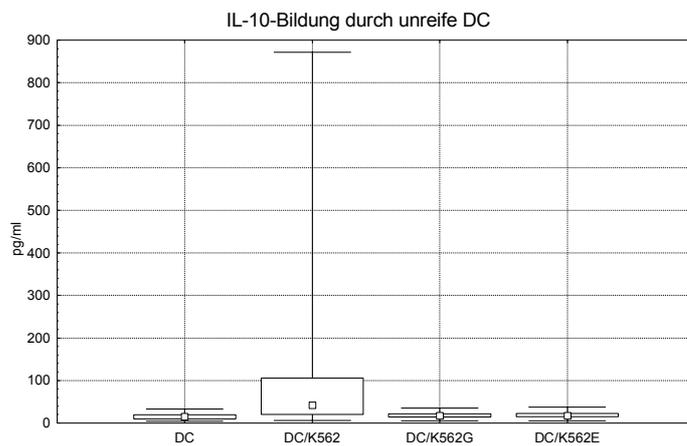


Abbildung 5: Box- und Whisker Plots der Statistikdaten der gemessenen Konzentrationen von IL-10 im Zellkulturüberstand von unreifen DC

3.3 Konzentrationen von IL-12p70

Die gemessenen Konzentrationen von IL-12p70 lagen in allen Experimenten sowohl mit unreifen als auch mit reifen DC im Bereich der unteren Nachweisgrenze des verwendeten ELISA und waren in den Kokulturen mit den Transfektanten im Vergleich zu den Kokulturen mit den untransfizierten K-562-Zellen nicht verändert.

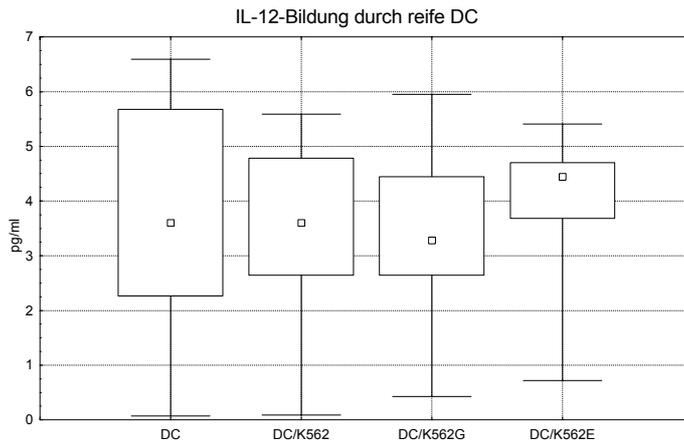


Abbildung 6: Box- und Whisker Plots der Statistikdaten der gemessenen Konzentrationen von IL-12 im Zellkulturüberstand von reifen DC

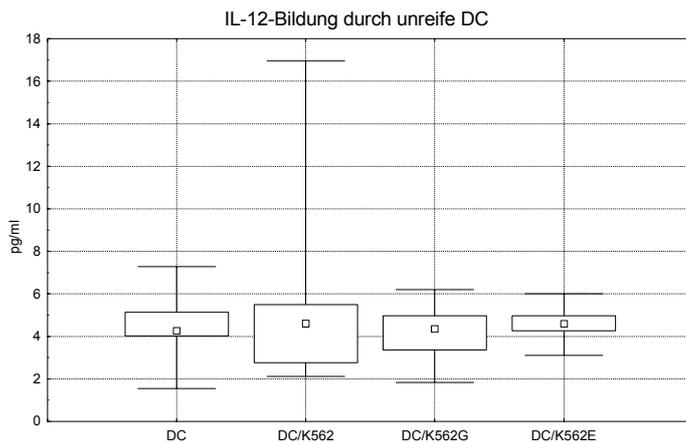


Abbildung 7: Box- und Whisker Plots der Statistikdaten der gemessenen Konzentrationen von IL-12 im Zellkulturüberstand von unreifen DC

3.4 Konzentrationen von IL-18

Verglichen mit den reinen DC war bei der Kokultur von unreifen und reifen DC mit untransfizierten K-562-Zellen kein signifikanter Anstieg der Sekretion von IL-18 zu beobachten. Auch in den Kokulturen von unreifen und reifen DC mit den Transfektanten K-562-G und K-562-E kam es nicht zu einer signifikanten Änderung der Konzentrationen von IL-18.

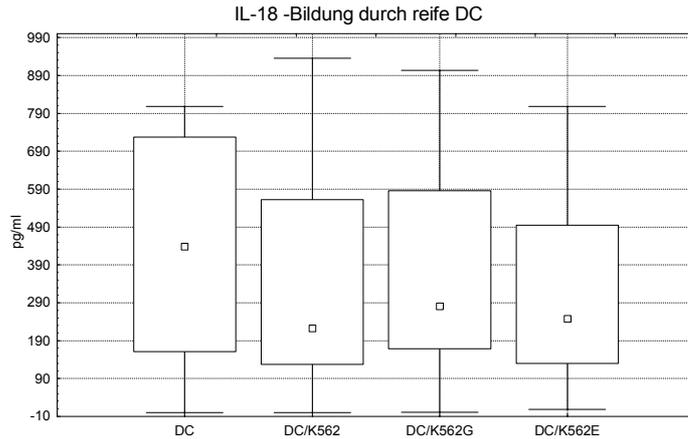


Abbildung 8: Box- und Whisker Plots der Statistikdaten der gemessenen Konzentrationen von IL-18 im Zellkulturüberstand von reifen DC

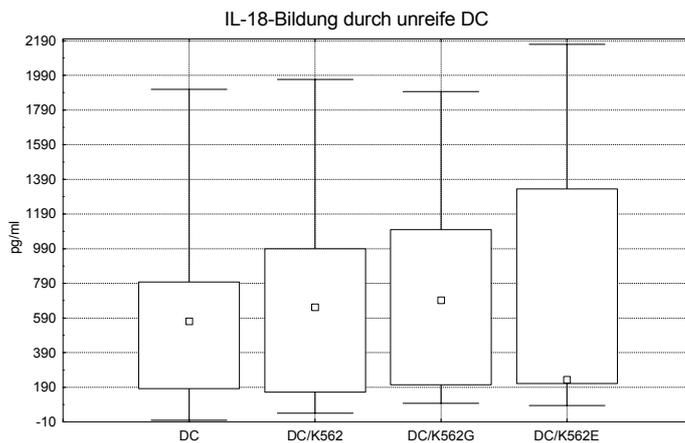


Abbildung 9: Box- und Whisker Plots der Statistikdaten der gemessenen Konzentrationen von IL-18 im Zellkulturüberstand von unreifen DC

3.5 Konzentrationen von TNF- α

Im Vergleich zur Kultur der unreifen DC alleine resultierte die Kokultur mit nicht transfizierten K-562-Zellen in einem signifikanten ($p=0,001$) Anstieg der Produktion von TNF- α . Gemessen daran kam es in den Kokulturen mit den Transfektanten K-562-G und K-562-E zu einem signifikanten Abfall ($p=0,001$ und $p=0,002$), so dass der in den Kokulturen mit HLA-freien K-562-Zellen zu beobachtende Anstieg nahezu vollständig wieder aufgehoben wurde (Tab.1).

Auch bei den reifen DC war im Vergleich zur Kultur mit DC alleine in der Kokultur mit nicht transfizierten Zellen ein signifikanter ($p=0,007$) Anstieg der Produktion zu beobachten, der genannte Unterschied beruht allerdings auf der Messung zu nur weniger stark erhöhter Konzentrationen. Im Vergleich dazu war in den Kokulturen mit den Transfektanten K-562-G und K-562-E ein nicht signifikanter Trend in Richtung Abfalls der gemessenen Konzentrationen von $\text{TNF-}\alpha$ zu beobachten, die gemessenen Werte lagen jedoch nur knapp über der Nachweisgrenze des verwendeten ELISA (Tab.2).

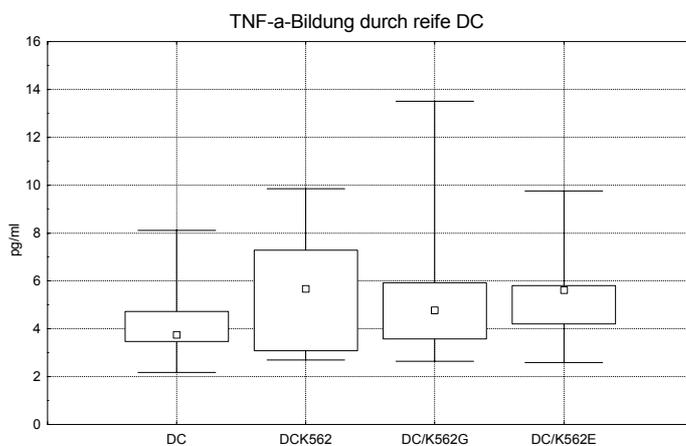


Abbildung 10: Box- und Whisker Plots der Statistikdaten der gemessenen Konzentrationen von $\text{TNF-}\alpha$ im Zellkulturüberstand von reifen DC

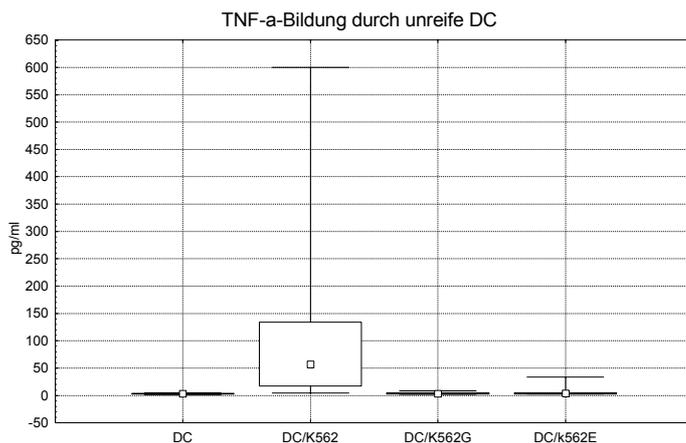


Abbildung 11: Box- und Whisker Plots der Statistikdaten der gemessenen Konzentrationen von $\text{TNF-}\alpha$ im Zellkulturüberstand von unreifen DC

Tabelle 1

Zytokinproduktion durch unreife DC aus dem peripheren Blut von 14 gesunden Spendern in pg/ml. M=Median, P-25=Perzentile 25, P-75=Perzentile 75. Die p-Werte beziehen sich auf einen U-Test nach Wilcoxon (Werte nicht normal verteilt).

	Unreife DC			Unreife DC & K562				Unreife DC & K562+HLA-G				Unreife DC & K562+HLA-E			
	M	P-25	P-75	M	P-25	P-75	p*	M	P-25	P-75	p**	M	P-25	P-75	p***
IL-8	1488	764	2042	39035	11982	84980	0,003	2157	1298	3106	0,003	1691	13991	3311	0,003
IL-10	16	10	20	42	20	402	0,001	18	14	21	0,001	18	15	23	0,003
IL-12	4	4	5	5	3	5	n.s.	4	3	5	n.s.	5	4	5	n.s.
IL-18	570	182	798	652	162	989	n.s.	693	204	1099	n.s.	234	211	1335	n.s.
TNF- α	3	3	4	57	17	134	0,001	3	3	5	0,001	4	3	5	0,002

p*= Vergleich der Zytokinproduktion in den Kokulturen von unreifen DC mit nicht transfizierten K562-Zellen versus DC alleine

p**= Vergleich der Zytokinproduktion in den Kokulturen von unreifen DC mit HLA-G transfizierten K562-Zellen (K562-G) versus nicht transfizierten K562-Zellen

p***= Vergleich der Zytokinproduktion in den Kokulturen von unreifen DC mit HLA-E transfizierten K562-Zellen (K562-E) versus nicht transfizierten K562-Zellen

n.s.= nicht signifikant

Tabelle 2

Zytokinproduktion durch reife DC aus dem peripheren Blut von 14 gesunden Spendern in pg/ml. M=Median, P-25=Perzentile 25, P-75=Perzentile 75. Die p-Werte beziehen sich auf einen U-Test nach Wilcoxon (Werte nicht normal verteilt).

	Reife DC			Reife DC & K562				Reife DC & K562+HLA-G				Reife DC & K562+HLA-E			
	M	P-25	P-75	M	P-25	P-75	p*	M	P-25	P-75	p**	M	P-25	P-75	p***
IL-8	851	435	1339	1128	791	2846	0,003	1026	683	1850	0,007	1051	766	1556	0,033
IL-10	3	3	4	4	3	6	n.s.	3	3	4	n.s.	4	3	6	0,10
IL-12	4	2	6	4	3	5	n.s.	3	3	4	n.s.	4	4	5	0,028
IL-18	591	167	747	242	137	803	n.s.	333	182	601	n.s.	261	182	611	n.s.
TNF- α	4	3	5	6	5	9	0,007	5	4	6	n.s.	6	4	6	n.s.

p*= Vergleich der Zytokinproduktion in den Kokulturen von reifen DC mit nicht transfizierten K562-Zellen versus DC alleine

p**= Vergleich der Zytokinproduktion in den Kokulturen von reifen DC mit HLA-G transfizierten K562-Zellen (K562-G) versus nicht transfizierten K562-Zellen

p***= Vergleich der Zytokinproduktion in den Kokulturen von reifen DC mit HLA-E transfizierten K562-Zellen (K562-E) versus nicht transfizierten K562-Zellen

n.s.= nicht signifikant

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von HLA-G und HLA-E auf die Produktion ausgewählter Zytokine durch humane dendritische Zellen (DC) untersucht. Diese beiden HLA-Moleküle gehören in die Gruppe der MHC Klasse I-Moleküle.

Sowohl für dendritische Zellen als auch für Makrophagen wurde gezeigt, dass sie Moleküle der HLA-Klassen Ia und II um ein Mehrfaches höher exprimieren als Monozyten. Von Laupéze et al.⁷⁵ konnte jedoch nachgewiesen werden, dass in vitro aus Monozyten generierte DC das Molekül HLA-G nicht auf ihrer Oberfläche tragen. Auch durch die Behandlung der Zellen mit verschiedenen Zytokinen (IFN γ , IL-2, GM-CSF) ließ sich keine Expression von HLA-G induzieren. Potentiell könnte eine solche Expression durch inflammatorische Zytokine oder maligne Transformation auf infiltrierenden Makrophagen und DC induziert werden. Solche Faktoren waren jedoch im verwendeten experimentellen Design mit Kokulturen nicht existent. Es darf daher davon ausgegangen werden, dass weder die unreifen noch die reifen DC in den Kokulturen selbst HLA-G oder HLA-E exprimierten.

In den Kokulturen unreifer DC mit nicht transfizierten K-562-Zellen wurde eine starke Freisetzung der Zytokine IL-10 und TNF- α sowie des Chemokins IL-8 beobachtet. Reife DC riefen in gleichen Kokultur-Ansätzen eine ähnliche hohe Freisetzung nur für IL-8 und TNF- α hervor. Diese Beobachtung, dass DC zur Erkennung HLA-freier Zellen in der Lage sind und auf diese mit einer verstärkten Zytokinproduktion reagieren, ist grundsätzlich neu und sollte durch weitere In-vitro-Experimente gesichert werden.

Im Vergleich zu der signifikant gesteigerten Freisetzung von IL-8, IL-10 und TNF- α durch DC in Kokultur mit nicht transfizierten K-562-Zellen, war die Sekretion der genannten Zytokine in der Kokultur mit den HLA-G und HLA-E exprimierenden Transfektanten deutlich abgeschwächt.

4.1 Einfluss auf IL-8

IL-8 ist ein Chemokin, welches vornehmlich inflammatorische Reaktionen des Organismus verursacht. Es wird von Leukozyten, verschiedenen gewebeständigen Zellen

sowie auch Tumorzellen sezerniert. Auch DC setzen IL-8 frei, jedoch in deutlich geringerer Konzentration als die Monozyten.¹⁹

Untersuchungen von Wang et al.⁷⁶ zeigten, dass bei einer Plazentainsuffizienz vermehrt IL-8 durch das fetale Gefäßendothelium freigesetzt wird. Plazentainsuffizienz führt zu einem Wachstumsstopp des Fötus und möglicherweise auch zum intrauterinen Tod.

Bei Patientinnen mit schwerer Präeklampsie waren die Plasmaspiegel von IL-8 erhöht.⁷⁷ Versuche von Kauma et al.⁷⁷ wiesen zudem eine vermehrte Freisetzung von IL-8 durch die Endothelzellen der Nabelschnur-Gefäße nach, wenn diese mit dem Plasma präeklampsischer Frauen kultiviert wurden.

Auch bei Frauen mit spontanem Abort konnten im Abradat signifikant erhöhte IL-8-Spiegel nachgewiesen werden. Besonders hoch waren diese Konzentrationen bei Frauen mit habituellen Aborten.⁷⁸ Hohe Konzentrationen von IL-8 scheinen also vor allem mit Komplikationen im Schwangerschaftsverlauf assoziiert zu sein

Im hier verwendeten Versuchsaufbau zeigte sich, dass der Kontakt mit der nicht transfizierten Tumorzelllinie K562 einen starken Reiz zur Freisetzung von IL-8 durch unreife und reife DC darstellt. Im Gegensatz dazu zeigte sich in der Kokultur mit den Transfektanten K562-G und K562-E sowohl für unreife wie auch für reife DC ein signifikanter Abfall der IL-8-Produktion. Aus dem in unserem Modell gezeigten suppressiven Effekt von HLA-G und HLA-E auf die Freisetzung von IL-8 durch dendritische Zellen, lässt sich spekulativ schließen, dass diese Suppression für den erfolgreichen Verlauf einer Schwangerschaft wichtig sein könnte.

4.2 Einfluss auf IL-10

IL-10 zählt zu den Zytokinen der Th2-Familie. IL-10 inhibiert die Bildung des Th1-Zytokins IFN- γ und hemmt die Produktion von IL-1, IL-6 und TNF- α , welche ebenfalls der Th1-Familie angehören. Potentiell besitzt es anti-inflammatorische Eigenschaften. Aus diesem Grund wird angenommen, dass IL-10 vorteilhaft für das Überleben des Fötus im Mutterleib sein könnte.⁵⁸

DC induzieren unter dem Einfluss von IL-10 die Differenzierung von T-Helferzellen vom Typ2 im Rahmen der primären Immunantwort.³² Unreife DC produzieren IL-10

auf einem niedrigem Niveau. Diese Freisetzung kann durch geeignete Stimuli (z.B. bakterielle Toxine) gesteigert werden.²⁹ Reife DC hingegen zeigen nur eine reduzierte Fähigkeit zur Bildung von IL-10.²⁹ Kämmerer et al. konnten zeigen, dass es in der Dezidua eine unreife Subpopulation von DC gibt,⁷³ welche über die Sekretion von IL-10 immuntolerisierend wirken könnte.

Unsere Versuche zeigten, dass unreife DC in der Kokultur mit beiden Transfektanten K562-G und K562-E signifikant weniger IL-10 produzierten als in der Kokultur mit K562. Im Gegensatz dazu war die Produktion von IL-10 durch reife DC in allen Kokulturen unverändert. Die in der Einleitung beschriebene²⁹ Autoregulation der Sekretion von IL-10 sowie seine blockierende Wirkung bei der Reifung der DC erklären unsere Beobachtungen, dass nur unreife, nicht aber reife DC auf den Kontakt mit HLA-freien K562-Zellen hin mit einer verstärkten Ausschüttung von IL-10 reagieren. Diese wird in den Kokulturen mit den Transfektanten wieder weitgehend egalisiert.

Kanai et al.⁷⁹ beobachteten, dass membrangebundenes HLA-G (mHLA-G) die IL-10-Freisetzung von mononukleären Zellen des peripheren Blutes nicht beeinflusste, lösliches HLA (sHLA-G) dagegen die IL-10-Produktion erhöhte. Auf den ersten Blick scheinen diese Ergebnisse mit unseren nicht vereinbar zu sein. Allerdings ist zu bedenken, dass Kanai et al. unsortierte mononukleäre Zellen des peripheren Blutes untersucht haben, in denen DC nur einen sehr geringen Prozentsatz im Vergleich zu T Zellen und anderen Leukozyten darstellen. DC machen ca. 1% aller mononukleären Zellen des peripheren Blutes aus.⁸⁰ Unreife DC selber liegen vor allem in peripheren Geweben vor und reife DC finden sich praktisch ausschließlich in den lymphatischen Geweben. Reife DC zeigten in diesem Modell keine messbare Veränderung der IL-10-Produktion in der Kokultur mit den Transfektanten K562-G und K562-E.

Kämmerer et al. zeigten, dass in der Dezidua nur ca. 1% der Leukozyten CD83⁺ DC auszumachen sind.⁷² Der Marker CD83 auf der Oberfläche von DC gehört zu den Oberflächeneigenschaften, die den reifen Phänotyp der DC kennzeichnen. Ein sehr viel größerer Prozentsatz der Dezidualen Zellen sind DC-SIGN positive unreife DC, welche bis zu 10% der dezidualen CD45⁺ Zellen ausmachen.⁷³ Geht man davon aus, dass somit in

der Dezidua vor allem unreife DC zu finden sind, und unreife DC auf Kontakt mit HLA-G und HLA-E mit einer Absenkung der IL-10 Produktion reagieren, ergibt sich die Frage nach der Bedeutung dieses Ergebnisses. Eigentlich werden IL-10 anti-inflammatorische und somit schwangerschafts-begünstigende Eigenschaften zugeschrieben und eine Erhöhung der IL-10 Produktion durch DC im Kontakt mit Trophoblasten wäre eher mit der Hypothese eines schwangerschaftsprotektiven Milieus in Einklang zu bringen gewesen.. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse stellt sich die Frage, inwieweit DC eine Rolle spielen bei Regulierung des IL-10-Spiegels an der fetomaternalen Grenze. Diese Frage kann im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht geklärt werden und bedarf weiterer Untersuchungen.

4.3 Einfluss auf IL-12

IL-12 ist ein Zytokin der Th1-Familie. Es wirkt über die Aktivierung von NK und T-Lymphozyten vor allem während der frühen Immunreaktion inflammatorisch. Die Hauptproduzenten von IL-12 sind DC und Makrophagen. In den drainierenden Lymphorganen stellen DC die wichtigsten IL-12 freisetzenden Zellen dar.³⁸

Im Serum von Frauen mit Fehlgeburten konnten direkt im Anschluss an den Abort signifikant höhere IL-12-Spiegel nachgewiesen werden als im Serum von Frauen mit normaler Schwangerschaft oder drohender Fehlgeburt.⁸¹ Wilson et al.⁸² konnten zeigen, dass IL-12 auch im Serum nicht schwangerer Frauen mit wiederholten Fehlgeburten in der Vorgeschichte signifikant erhöht war im Vergleich mit dem Serum von Frauen ohne Fehlgeburten. El-Shazly et al.⁸³ wiesen signifikant erhöhte IL-12-Level in Plazenten von Frauen mit Frühgeburten nach. Auch in den Plazenten von Frauen mit Uterusruptur wurden ähnlich stark erhöhte Zytokinspiegel für IL-12 gemessen.⁸³

Untersuchungen im Blut von schwangeren Frauen zeigten eine verminderte IL-12-Freisetzung durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes im Vergleich mit den Blutproben nicht schwangerer Frauen.⁸⁴ Sakai et al. gelang es zudem zu zeigen, dass die IL-12-Produktion durch die mononukleären Zellen des peripheren Blutes von Frauen mit schwerer Präeklampsie deutlich erhöht war im Vergleich mit Proben von Frauen mit

normalem Schwangerschaftsverlauf.⁸⁴ Eine hohe Konzentration von IL-12 scheint somit eher schädlich für den Verlauf einer Schwangerschaft.

In den vorliegenden Versuchen lag die Sekretion von IL-12p70, der biologisch aktiven Form des Zytokins, durch unreife und reife DC alleine sowie in den Kokulturen im Bereich der Nachweisgrenze. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den in der Einleitung geschilderten Beobachtungen, dass es zur Induktion der Sekretion von IL-12p70 durch DC bestimmter Stimuli (wie z.B. LPS) bedarf. Der Kontakt mit K-562 Zellen (sowohl untransfiziert als auch transfiziert) stellt in unserem Modell scheinbar keinen geeigneten Stimulus zur DC-Aktivierung dar.

Die Frage, ob und wie HLA-G und HLA-E die IL-12-Produktion durch DC beeinflussen, blieb in dieser Versuchsanordnung aufgrund der Nachweisgrenzen des ELISA unbeantwortet. Im Kontext der bisherigen Hypothese einer Verschiebung des Zytokinniveaus in Richtung der Th2-Zytokine, würde man eine Suppression der IL-12-Produktion erwarten. Es stellt sich jedoch die Frage, in wieweit HLA-G und HLA-E die Freisetzung dieses Zytokins überhaupt beeinflussen. Dieser Punkt wird Gegenstand weiterer Forschung sein müssen.

4.4 Einfluss auf IL-18

IL-18 ist ein inflammatorisches Zytokin, welches die IL-12-bedingte Th1-Immunantwort verstärkt. In Abwesenheit von IL-12 scheint es jedoch auch Immunreaktionen durch Th2-Zellen zu stimulieren.⁴⁹ IL-18 wird durch eine Vielzahl verschiedener Zellen des Immunsystems wie auch anderer Organe gebildet. Auch DC produzieren ein bioaktives IL-18-Protein.⁵⁰ In Anwesenheit von antigenspezifischen T-Zellen wird diese Produktion durch DC jedoch rasch vermindert, was einer unkontrollierten Immunantwort entgegenwirken könnte.⁵¹

Im Serum von Frauen mit wiederholten Fehlgeburten wurden direkt nach dem Abort erhöhte Spiegel des Th1-Zytokins IL-18 im Vergleich mit dem Serum von Frauen im ersten Trimester mit normalem Schwangerschaftsverlauf nachgewiesen.⁸⁵ Wilson et. al gelang es im Weiteren zu zeigen, dass die IL-18-Serumspiegel von nicht schwangeren Frauen mit wiederholten Fehlgeburten in der Vorgeschichte signifikant höher lagen als

bei nicht schwangeren Frauen ohne Fehlgeburten.⁸² Des Weiteren wurden hohe IL-18-Konzentrationen im Zusammenhang mit intrauteriner Entzündung und Frühgeburtlichkeit in Amnionflüssigkeit beobachtet.⁸⁶ IL-18 scheint somit ähnlich wie IL-12 in hohen Konzentrationen mit Komplikationen im Schwangerschaftsverlauf assoziiert zu sein.

In den Kokulturen dieser Arbeit war kein Anstieg der Sekretion von IL-18 durch reife DC zu beobachten. Eine eindeutige Aussage im Hinblick auf die Produktion von IL-18 in der Kokultur von unreifen DC mit K-562-Zellen war nicht zu treffen. Die Unterschiede in der Sekretion zwischen der Kultur unreifer DC und der Kokultur mit untransfizierten K-562-Zellen verfehlten das Signifikanzniveau nur knapp. Das Gleiche galt für die Unterschiede zwischen untransfizierten Zellen und den Transfektanten K-562-G und K-562-E. Möglicherweise stellten die HLA-freien K-562-Zellen keinen geeigneten Stimulus für die Ausschüttung von IL-18 durch unreife DC über die Nachweisgrenze dar.

Ähnlich wie für IL-12 ließ sich im hier verwendeten Modell keine Aussage darüber treffen, inwieweit HLA-G und HLA-E die Sekretion von IL-18 durch DC beeinflussen. Ausgehend von der Hypothese, dass HLA-G und HLA-E als Oberflächenmarker auf den Trophoblasten die Zytokinsekretion der DC während einer Schwangerschaft in Richtung eines Toleranz begünstigenden Zytokinniveaus regulieren, sollte die IL-18-Freisetzung verringert werden. Dies bleibt jedoch Gegenstand weiterer Untersuchungen.

4.5 Einfluss auf TNF- α

TNF- α ist ein inflammatorisches Zytokin der Th1-Familie. Unter anderem hemmt es die Zellmotilität der Trophoblasten und verhindert somit die fetale Trophoblasteninvasion. Zudem limitiert TNF- α die Ausbreitung der Trophoblasten indem es ein Einwachsen in die Dezidua verhindert.⁸⁷ Eine Vielzahl von Zellen sowohl des Immunsystems als auch anderer Organe produzieren TNF- α . DC setzen dieses Zytokin nur nach geeigneter Stimulation (z.B. LPS) in nennenswertem Umfang frei.⁵³

Erhöhte TNF- α scheinen ursächlich mit dem Ausbruch einer Präeklampsie in der Schwangerschaft zusammenzuhängen. Saito et. al.⁸⁸ konnten dies an kultivierten Leukozyten des peripheren Blutes nachweisen. Zudem gelang es ihnen, eine positive Korre-

lation zwischen der Höhe des Blutdrucks und der Höhe der Th1-Zytokine IL-2, IFN- γ und TNF- α nachzuweisen.⁸⁸ Yui et al.⁸⁹ zeigten, dass TNF- α den apoptotischen Zelltod von villösen Trophoblasten induzieren kann. In Anbetracht dieser Untersuchungen ist davon auszugehen, dass eine hohe Konzentration von TNF- α den Verlauf einer Schwangerschaft eher negativ beeinflusst.

Die Resultate der Kokulturen zeigten, dass der Kontakt mit HLA-freien K562-Zellen einen ausreichenden Reiz⁵⁵ zur Freisetzung von TNF- α durch unreife und reife DC darstellte. Die Beobachtung, dass die gemessenen Konzentrationen von TNF- α in den Kokulturen mit reifen DC nur knapp über der Nachweisgrenze des ELISA lagen und somit um ein Mehrfaches niedriger als in der Kokultur mit unreifen DC, steht im Einklang mit der zentralen Rolle von TNF- α bei der Reifung der DC.⁵⁶ Im Vergleich mit der Kokultur mit untransfizierten K562-Zellen wird die Produktion von TNF- α durch unreife DC in den Kokulturen mit den Transfektanten K562-G und K562-E signifikant gehemmt. Die Kokultur reifer DC mit K562-G und K562-E zeigte ebenfalls einen deutlichen, wenn auch nicht signifikanten, Abfall der TNF- α -Produktion verglichen mit der Kokultur reifer DC mit K562.

Im hier verwendeten Modell zeigten sowohl HLA-G und HLA-E einen hemmenden Effekt auf die TNF- α -Freisetzung durch DC. Eine solche Hemmung der TNF- α -Produktion könnte in Anbetracht der aktuellen Forschungslage ein wichtiger Faktor für den gesunden Verlauf einer Schwangerschaft sein.

4.6 Biologische Bedeutung von HLA-G

Wie bereits in der Einleitung dargestellt wird membrangebundenes HLA-G (mHLA-G) beinahe ausschließlich vom Trophoblasten exprimiert.⁷ Neben den membrangebundenen Isoformen existieren lösliche Isoformen des HLA-G (sHLA-G), welche an der Grenze zwischen maternalem und fetalem Gewebe vor allem durch den Trophoblasten und eventuell auch durch Makrophagen exprimiert werden.⁹ Auch sHLA-G scheint eine wichtige Bedeutung für die Entwicklung und Aufrechterhaltung einer erfolgreichen Schwangerschaft zu haben. So zeigten Fuzzi et al.⁹⁰, dass sich bei einer in-vitro-

Fertilisation (IVF) nur dann eine erfolgreiche Schwangerschaft einstellte, wenn sich im Medium der Embryo-Kultur sHLA-G nachweisen ließ.

sHLA-G scheint im Vergleich zu mHLA-G unterschiedliche und in mancherlei Hinsicht gegenteilige Effekte auf die Zytokinfreisetzung durch mononukleäre Zellen des peripheren Blutes zu haben.⁷⁹ Kanai et al zeigten, dass sHLA-G die Produktion von TNF- α , IFN- γ und IL-10 erhöht.⁷⁹ mHLA-G hatte im Gegensatz dazu einen ähnlich suppressiven Effekt auf TNF- α wie im hier verwendeten Versuchsdesign. Darüber hinaus unterdrückt mHLA-G die Freisetzung bestimmter Zytokine wie TNF- α , IFN- γ , GM-CSF, IL-10 und IL-13 durch deziduale „large granular lymphocytes“ (LGL) des ersten Trimesters der normalen Schwangerschaft.¹⁵

Diese Beobachtungen zusammen mit den in diesem Versuchsansatz gemachten weisen daraufhin, dass mHLA-G einen generell unterdrückenden Effekt auf die Zytokinausschüttung durch immunkompetente Zellen in der Dezidua aufweist, welcher nicht nur die Th1-Zytokine betrifft. Dadurch wird möglicherweise ein günstiges Milieu für die Fortführung der Schwangerschaft geschaffen. Diese Beobachtungen widersprechen zum Teil der Hypothese, dass mHLA-G während des ersten Trimesters der normal verlaufenden Schwangerschaft die Balance zwischen den Th1- und Th2-Zytokinen in Richtung der Th2-Zytokine verschiebt.⁹¹ In den hier verwendeten Kokulturen war auch eine Suppression der Freisetzung des Th2-Zytokins IL-10 zu beobachten.

Dieser suppressive Effekt von mHLA-G auf die Zytokinfreisetzung durch DC kann auf die Bindung an inhibitorische Rezeptoren (wie z.B. ILT2 oder ILT4) zurückzuführen sein, welche selektiv auf der Oberfläche von DC und myelomonocyten Zellen exprimiert werden.^{9, 12}

4.7 Biologische Bedeutung von HLA-E

Die Funktionen von HLA-E im dezidualen Zellnetzwerk sind immer noch wenig charakterisiert. Rieger et al.¹⁵ zeigten, dass HLA-E ebenso wie HLA-G generell einen suppressiven Effekt auf die Zytokinproduktion von LGL besitzt. Die Reduktion der Zytokinproduktion ist jedoch geringer als durch HLA-G. Ähnliches war in den hier ver-

wendeten Kokulturen zu beobachten. HLA-E wirkte sich ebenso wie HLA-G generell suppressiv auf die Zytokinproduktion der DC aus, jedoch war der Grad der Reduktion geringer als durch HLA-G.

Auch HLA-E liegt auf der Oberfläche des Transfektanten K-526-E in einer funktionell aktiven Form vor. Da in vivo die Expression von HLA-E von der von HLA-G abhängig ist⁸ wurde bei den Transfektanten die funktionelle Domäne von HLA-E zusammen mit der Transmembrandomäne von HLA-G transfiziert um eine ausreichend hohe Expression von funktionellem HLA-E auf der Zelloberfläche zu erreichen.¹⁵ So sollten die unterschiedliche Effekte der beiden Transfektanten auf die Zytokinproduktion der DC nicht auf eine quantitativ unterschiedliche Expression zurückzuführen sein, sondern tatsächlich unterschiedlich funktionelle Interaktionen mit Rezeptoren auf den DC widerspiegeln.

4.8 Abschließende Betrachtung

Die biologische Aussagekraft der In-vitro-Experimente über den Effekt von HLA-G und HLA-E präsentierenden Zellen in Kokultur mit DC ist beschränkt, da unter in vivo Bedingungen während des ersten Trimesters der Schwangerschaft DC im Gewebe in enger örtlicher Assoziation mit weiteren CD45⁺ Lymphozyten beobachtet werden. Diese Beobachtung könnte ein Hinweis darauf sein, dass DC von der Zytokinsekretion anderer Lymphozyten in der Dezidua in ihrer Aktivität beeinflusst werden. Solche und mögliche andere Interaktionen zwischen verschiedenen Typen immunkompetenter Zellen mit dem HLA-G und HLA-E auf der Oberfläche der Trophoblasten lassen sich im hier gewählten Versuchsansatz von Kokulturen mit Transfektanten nicht berücksichtigen und untersuchen. Es ist denkbar, dass unter Einbeziehung einer weiteren Gruppe immunkompetenter Zellen in die Kokulturen andere Effekte auf die Zytokinfreisetzung durch in-vitro differenzierte DC zu beobachten gewesen wären. Weiterhin ist bei der Interpretation der Befunde nicht auszuschließen, dass auch die Präsentation klassischer HLA-Merkmale, wie HLA-A, HLA-B oder HLA-C, einen Effekt auf die Zytokinfreisetzung der DC besitzt. Diese werden zwar nicht auf der Oberfläche des Trophoblasten exprimiert, jedoch von anderen fetalen Zellen. Transfektanten mit klassischen HLA-Antigenen sind im hier verwendeten Versuchsdesign mit Kokulturen nicht enthalten.

Trotz der methodischen bedingten Einschränkungen konnte gezeigt werden, dass die Freisetzung von TNF- α , IL-8 und IL-10 durch unreife DC sowie von IL-8 durch reife DC, welche in vitro aus Monozyten des peripheren Blutes differenziert wurden, durch Kokultur mit HLA-G und HLA-E transfizierten Zellen der leukämischen Zelllinie K562, signifikant herabgesetzt wird im Vergleich mit nicht-transfizierten K562-Zellen. Diese Beobachtungen geben einen weiteren Hinweis auf die zentrale Rolle von HLA-G, und in geringerem Umfang auch von HLA-E, bei der Entwicklung und Aufrechterhaltung der Immuntoleranz während einer normalen Schwangerschaft.

5 Zusammenfassung

Dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle in der Regulation der Immunantwort. Diese spezielle Zellpopulation kann eine Immunantwort in die verschiedensten Richtungen beeinflussen. DC stellen auf der eine Seite wohl die wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen dar und induzieren hocheffektive inflammatorische Immunantworten. Auf der anderen Seite spielen DC aber auch eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung immunologischer Toleranz.

Die Entdeckung dendritischer Zellen in menschlicher Dezidua wirft die Frage nach der Beteiligung der DC an den immunologischen Vorgängen an der feto-maternalen Grenze auf. Trotz der großen Zahl an Untersuchungen konnte das Phänomen der Toleranz des mütterlichen Immunsystems gegenüber dem genetisch fremden Fötus bis heute nicht abschließend geklärt werden. Es bestehen jedoch viele Hypothesen. Eine davon befasst sich mit MHC-Klasse-I Molekül HLA-G, welches allein auf den Trophoblasten exprimiert wird. Bisher konnte gezeigt werden, dass HLA-G die Aktivität von NK-Zellen reduziert. Zudem beeinflusst es die Zytokinproduktion von LGL der Dezidua. Im Rahmen dieser Arbeit sollte der Einfluss von HLA-G und dem mit HLA-G gemeinsam exprimierten HLA-E auf die Zytokinproduktion humaner DC untersucht werden. Als Modellsystem wurden in vitro aus Monozyten des peripheren Blutes differenzierte DC gewählt. Unreife und reife DC wurden in Kokulturen mit der Zelllinie K562 und deren

Transfektanten K562-G und K562-E kultiviert. Untersucht wurden die Veränderungen der Zytokinspiegel in den Zellkulturüberständen mittels ELISA.

Die Messungen zeigten, dass die Freisetzung von TNF- α , IL-8 und IL-10 durch unreife DC in der Kokultur mit den Transfektanten signifikant reduziert wurde im Vergleich zur Kokultur mit der nicht transfizierten Zelllinie. Für reife DC ließ sich eine solche Suppression nur für IL-8 nachweisen. Diese Beobachtungen widersprechen der Annahme, dass das Zytokinmilieu während der Schwangerschaft von Th1 in Richtung Th2 verschoben wird. Vielmehr scheint HLA-G und in geringerem Umfang auch HLA-E die Produktion von Zytokinen durch DC generell zu reduzieren. Diese Ergebnisse stehen jedoch im Einklang mit der bisherigen Hypothese, dass HLA-G eine wichtige Rolle für die Entwicklung der Immuntoleranz während der Schwangerschaft spielt.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Bouma GS, van Caubergh P, van Bree SP, Castelli-Visser RM, Witvliet MD, van der Meer-Prins EM, van Rood JJ, Claas FH: **Pregnancy can induce priming of cytotoxic T lymphocytes specific for paternal HLA antigens that is associated with antibody formation.** Transplantation 1996, **62**: 672-678
- (2) Billingham RE, Medawar PB: **Actively acquired tolerance of foreign cells.** Nature 1953, **172**: 603-606
- (3) Hoskin DW, Murgita RA: **Specific maternal anti-fetal lymphoproliferative responses and their regulation by natural immunosuppressive factors.** Clin Exp Immunol 1989, **76**: 262-267
- (4) Thellin O, Coumans B, Zorzi W, Igout A, Heinen E: **Tolerance to the foeto-placental “graft”: ten ways to support a child for nine months.** Curr Op Immunol 2000, **12**: 731-737
- (5) Petraglia F, Florio P, Nappi C, Genazzani AR: **Peptide signaling in human placenta and membranes: autocrine, paracrine, and endocrine mechanisms.** Endocr Rev 1996, **17**: 156-186
- (6) Carosella ED, Rouas-Freiss N, Paul P, Dausset J: **HLA-G: a tolerance molecule from the major histocompatibility complex.** Immunol Today 1999, **20**: 60-62
- (7) McMaster MT, Librach CL, Zhou Y, Lim KH, Janatpour MJ, De Mars R, Kovats S, Damsky C, Fisher SJ: **Human placental HLA-G expression is restricted to differentiated cytotrophoblasts.** J Immunol 1995; **154**: 3771-3778
- (8) Rouas-Freiss N, Khalil-Daher I, Riteau B, Menier C, Paul P, Dausset J, Carosella ED: **The immunotolerance role of HLA-G.** Semin Cancer Biol 1999; **9**: 3-12
- (9) Hunt JS, Petroff MG, Morales P, Sedlmayr P, Geraghty DE, Ober C: **HLA-G in reproduction: Studies on the maternal-fetal interface.** Hum Immunol 2000; **61**: 1113-1117
- (10) Liang S, Horuzsko A: **Mobilizing Dendritic Cells for Tolerance by Engagemant if Immune Inhibitory Receptors for HLA-G.** Human Immunol 2003, **64**: 1025-1032

- (11) Hara N, Fujii T, Yamashita T et al: **Altered expression of human leukocyte antigen G (HLA-G) in extravillous trophoblasts in preeclampsia: immunohistochemical demonstration with anti-HLA-G specific antibody "87G" and anti-cytokeratine antibody "CAM5.2"**. Am J Reprod Immunol 1996, **36**, 349-358
- (12) Colonna M, Samaridis J, Cella M, Angman L, Allen RL, O'Callaghan CA, Dunbar R, Ogg GS, Cerundolo V, Rolink A: **Human myelomonocytic cells express inhibitory receptors for classical and non-classical MHC class I molecules**. J Immunol 1998; **160**: 3096-3100
- (13) King A, Allan DS, Bowen M, Powis SJ, Joseph S, Verma S, Hiby SE, McMichael AJ, Loke YW, Braud VM: **HLA-E is expressed on trophoblast and interacts with CD94/NKGs receptors on decidual NK cells**. Eur J Immunol 2000; **30**: 1623-1631
- (14) Navarro F, Llano M, Bellon T, Colonna M, Geraghty D, Lopez-Botet M: **The ILT-2 (LIR-1) and the CD94/NKG2A NK cell receptors respectively recognize HLA-G1 and HLA-E molecules coexpressed on target cells**. Eur J Immunol 1998
- (15) Rieger L, Probe C, Hofmeister V, Dietl J, Weiss EH, Stock T, Kämmerer U.: **Th1- and Th2-like cytokine production by first trimester decidual large granular lymphocytes is influenced by HLA-G and HLA-E**. Mol Hum Reprod 2002; **8**: 255-261
- (16) Walz A, Peveri P, Aschauer H, Baggiolini M: **Purification and amino acid sequencing of NAF, a novel neutrophil-activating factor produced by monocytes**. Biochem.Biophys.Res. Commun. 1987, **149**: 755-761
- (17) Van Damme J, Van Beeumen J, Opdenakker G, Billiau A: **A novel, NH₂-terminal sequence-characterized human monokine possessing neutrophil chemotactic, skin-reactive, and granulocytosis-promoting activity**. J.Exp.Med. 1988, **167**, 1364-1376
- (18) Larsen CG, Anderson AO, Appella E, Oppenheim JJ, Matsushima K: **The neutrophil-activating protein (NAP-1) is also chemotactic for T-Lymphocytes**. Science 1989, **243**: 1464-1466
- (19) Vissers JLM, Hartgers FC, Lindhout E, Teunissen MBM, Figdor CG, Adema GJ: **Quantitative analysis of chemokine expression by dendritic cell subsets in vitro and in vivo**. J Leukoc Biol 2000, **69**: 785-793

- (20) Bueno C, Almeida J, Alguero MC, Sanchez ML, Vaquero JM, Laso FJ, San Miguel JF, Escribano L, Orfao A: **Flow cytometric analysis of cytokine production by normal human peripheral blood dendritic cells and monocytes: Comparative analysis of different stimuli, secretion-blocking agents and incubation periods.** Cytometry 2001; **46**: 33-40
- (21) Verhasselt V, Goldman M, Willems F: **Oxidative stress up-regulates IL-8 and TNF-alpha synthesis by human dendritic cells.** Eur J Immunol 1998, **28**: 3886-3890
- (22) Fiorentino DF, Bond MW, Mosmann TR: **Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones.** J Exp Med 1989, **170**, 2081-1095
- (23) de Waal Malefyt R, Haanen J, Spits H, Roncarolo MG, te Velde A, Figdor C, Johnson K, Kastelein R, Yssel H, de Vries JE: **IL-10 and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II MHC expression.** J Exp Med 1991, **174**, 915-924
- (24) Hsu DH, Moore KW, Spits H: **Differential effects of interleukin-4 and -10 on interleukin-2-induced interferon- γ synthesis and lymphokine-activated killer activity.** Int Immunol 1992, **4**, 563-569
- (25) Bogdan C, Vodovotz Y, Nathan C: **Macrophage deactivation by interleukin 10.** J Exp Med 1991, **174**, 1549-1555
- (26) Berg DJ, Kuhn R, Rajewski K, Muller W, Menon S, Davidson N, Grunig G, Rennick D: **Interleukin-10 is a central regulator of the response to LPS in murine models of endotoxic shock and the Shwartzman reaction but not endotoxic tolerance.** J Clin Invest 1995, **96**, 2339-2347
- (27) Roth I, Corry DB; Locksley RM, Abrams JS; Litton MJ Fisher SJ: **Human placental cytotrophoblasts produce the immunosuppressive cytokine interleukin-10.** J Exp Med 1996, **184**, 539-548
- (28) Lin H, Mosmann TR, Guilbert L, Tuntipopipat S, Wegmann TG: **Synthesis of T helper 2-type cytokines at the maternal-fetal interface.** J Immunol 1993, **151**, 4562-4573
- (29) Corinti S, Albanesi S, La Sala A, Pastore S, Girolomoni G: **Regulatory activity of autocrine IL-10 on dendritic cell functions.** J Immunol 2001, **166**, 4312-4318

- (30) De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M: **Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function.** Eur J Immunol 1997, **27**, 1229-1235
- (31) Steinbrink K, Wöfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH: **Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells.** J Immunol 1997, **159**, 4772-4780
- (32) Liu L, Rich BE, Inobe J, Chen W, Weiner HL: **Induction of Th2 cell differentiation in the primary immune response: Dendritic cells isolated from adherent cell culture treated with IL-10 prime naive CD4⁺ T cells to secrete IL-4.** Int Immunol 1998, **10**, 1017-1026
- (33) Gately MK, Wilson DE, Wong HL: **Synergy between interleukin-2 (rIL2) and IL-2 depleted lymphokine-containing supernatants in facilitating allogeneic human cytolytic T lymphocyte responses in vitro.** J Immunol 1986, **136**, 1274-1282
- (34) Kobayashi M, Fitz L, Ryan M, Hewick RM, Clark SC, Chang S, Loudon R, Sherman F, Perussia B, Trinchieri G: **Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes.** J Exp Med 1989, **170**, 827-845
- (35) Wong HL, Wilson DE, Jensen J, Familetti P, Stremlo P, Gately MK: **Characterization of a factor(s) which synergizes with recombinant interleukin 2 in promoting allogeneic human cytolytic T-lymphocyte responses in vitro.** Cell Immunol 1987, **111**, 39-54
- (36) Germann T, Huhn H, Zimmermann F, Rude E: **An antigen-independent physiological activation pathway for L3T4⁺ T lymphocytes.** Eur J Immunol 1987, **17**, 775-781
- (37) Guery JC, Ria F, Galbaiti F, Adorini L: **Normal B cells fail to secrete interleukin-12.** Eur J Immunol 1997, **27**, 1632-1639
- (38) Muller G, Saloga J, Germann T, Schuler G, Knop J, Enk AH: **IL-12 as mediator and adjuvant for the induction of contact sensitivity in vivo.** J Immunol 1995, **155**, 4661-4668
- (39) Heufler C, Koch F, Stanzl U, Topar G, Wysocka M, Trinchieri G, Enk A, Steinman RM, Romani N, Schuler G: **Interleukin-12 is produced by dendritic cells and mediates T helper 1 development as well as interferon- γ production by T helper 1 cells.** Eur J Immunol 1996, **26**, 659

- (40) Cella M, Scheidegger D, Palmer-Lehmann K, Lane P, Lanzavecchia A, Alber G: **Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation.** *J Exp Med* 1996, **184**, 747
- (41) Sousa CRE, Hieny S, Schariton-Kersten T, Jankovic D, Charest H, Germain RN, Sher A: **In vivo microbial stimulation induces rapid CD40 ligand-independent production of interleukin 12 by dendritic cells and their redistribution to T-cell areas.** *J Exp Med* 1997, **186**, 1819
- (42) Cella M, Salio M, Sakakibara Y, Langen H, Julkunen I, Lanzavecchia A: **Maturation, activation and protection of dendritic cells induced by double-stranded RNA.** *J Exp Med* 1999, **189**, 821
- (43) Koch F, Stanzl U, Jennewein P, Janke K, Heufler C, Kämpgen E, Romani N, Schuler G: **High level IL-12 production by murine dendritic cells: up-regulation via MHC class II and CD40 molecules and down-regulation by IL-4 and IL-10.** *J Exp Med* 1996, **184**, 741
- (44) Ebner S, Ratzinger G, Krosbacher B, Schmuth M, Weiss A, Reider D, Kroczeck RA, Herold M, Heufler C, Fritsch P, Romani N: **Production of IL-12 by human monocyte-derived dendritic cells is optimal when the stimulus is given at the onset of maturation and is further enhanced by IL-4.** *J Immunol* 2001, **166**, 633-641
- (45) Kalinski P, Schuitemaker JHN, Hilkens CMU, Wierenga EA, Kapsenberg ML: **Final maturation of dendritic cells is associated with impaired responsiveness to IFN- γ and to bacterial IL-12 during the interaction with Th cells.** *J Immunol* 1999, **162**, 3231
- (46) Kelsall BL, Stuber E, Neurath M, Strober W: **Interleukin-12 production by dendritic cells. The role of CD40-CD40L interactions in Th1 T-cell responses.** *Ann N Y Acad Sci* 1996; **795**: 116-126
- (47) Ria F, Penna G, Adorini L: **Th1 cells induce and Th2 inhibit antigen-dependent IL-12 secretion by dendritic cells.** *Eur J Immunol* 1998; **28**: 2003-2016
- (48) Schultz O, Edwards AD, Schito M, Alioberti J, Manickasingham S, Sher A, Reise Sousa C: **CD40 triggering of heterodimeric IL-12 p70 production by dendritic cells in vivo requires a microbial priming signal.** *Immunity* 200, **13**, 453-462

- (49) Nakanishi K, Yoshimoto T, Tsutsui H, Okamura H: **Interleukin-18 regulates both Th1 and Th2 responses.** *Annu Rev Immunol* 2001; **19**, 423-474
- (50) Stoll S, Jonuleit H, Schmitt E, Müller G, Yamauchi H, Kurimoto M, Knop J, Enk AH: **Production of functional IL-18 by different subtypes of murine and human dendritic cells (DC): DC-derived IL-18 enhances IL-12 dependent Th1-development.** *Eur J Immunol* 1998; **28**: 3231-3239
- (51) Gardella S, Andrei C, Gostigliolo S, Poggi A, Zocchi MR, Rubartelli A: **Interleukin-18 synthesis and secretion by dendritic cells are modulated by interaction with antigen-specific T cells.** *J Leukoc Biol* 1999; **66**: 237-241
- (52) Carswell EA, Old LJ, Kassel RL et al.: **An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors.** *Proc. Natl Acad Sci USA* 1975, **72**, 3666-3670
- (53) Zhang M, Tracey KJ: **Tumor Necrosis Factor.** *The Cytokine Handbook*, 3rd ed 1998, 517-548
- (54) Beutler B, Greenwald D, Hulmes JD et al: **Identity of tumor necrosis factor and the macrophage-secreted factor cachectin.** *Nature* 1985, **316**, 552-554
- (55) Ammon C, Meyer SP, Schwarzfischer L, Krause SW, Andreesen R, Kreutz M: **Comparative analysis of integrin expression on monocyte-derived macrophages and monocyte-derived dendritic cells.** *Immunology* 2000; **100**, 364-369
- (56) Rieser C, Bock G, Klocker H, Bartsch G, Thurnher M: **Prostaglandin E2 and tumor necrosis factor alpha cooperate to activate human dendritic cells: Synergistic activation of interleukin 12 production.** *J Exp Med* 1997; **186**, 1603-1608
- (57) Palmer EM, Seventer GA: **Human T helper cell differentiation is regulated by the combined action of cytokines and accessory cell-dependent costimulatory signals.** *J Immunol* 1997, **158**: 2654-2662
- (58) Piccini MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S: **Detective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions.** *Nat Med* 1998, **281**: 1020-1024
- (59) Wegmann TG, Lin H, Guilbert L, Mosmann TR. **Bidirectional cytokine interactions in the maternal-fetal relationship: Is successful pregnancy a TH2 phenomenon?** *Immunol Today* 1993; **14**: 353±356
- (60) Raghupathy R: **Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy.** *Immunol Today* 1993, **18**: 478-482

- (61) Krasnow JS, Tollerud DJ, Naus G, Deloia JA: **Endometrial Th2 cytokine expression throughout the menstrual cycle and early pregnancy.** Human Reprod 1996, **11**: 1747-1754
- (62) Steinman RM, Cohn ZA: **Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution.** J Exp Med 1973, **137**: 1142
- (63) Steinman RM, Witmer MD: **Lymphoid dendritic cells are potent stimulators of the primary mixed leukocyte reaction in mice.** Proc Natl Acad Sci USA 1978, **75**: 5132
- (64) Daar AS, Fuggle SV, Hart DNJ, Dalchau R, Abdulaziz Z, Fabre JW, Ting A, Morris PJ: **Demonstration and phenotypic characterization of HLA-DR positive interstitial dendritic cells widely distributed in human connective tissues.** Trans Proc 1981, **13**:95
- (65) Steinman RM: **The dendritic cell system and its role in immunogenicity.** Annu Rev Immunol 1991, **9**:271-296
- (66) Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kämpgen E, Eibl B, Niederwieser D, Schuler G: **Generation of mature dendritic cells from human blood. An improved-method with special regard to clinical applicability.** J Immunol Methods 1996; **196**: 137-151
- (67) Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K.:**Immunobiology of dendritic cells.** Annu Rev Immunol 2000; **18**: 767-811
- (68) Moser M, Murphy KM: **Dendritic cell regulation of TH1-TH2 development.** Nature Immunol 2000; **1**: 199-205
- (69) Zal T, Volkmann A, Stockinger B: **Mechanisms of tolerance induction in major histocompatibility complex class II-restricted T cells specific for a blood-borne-self-antigen.** J Exp Med 1994, **180**: 2089-2099
- (70) Steinbrink K, Wölfl M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH: **Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells.** J Immunol 1997, **159**: 4772-4780
- (71) Everson MP, McDuffie DS, Lemak DG, Koopman WJ, McGhee JR, Beagley KW: **Dencritic cells from different tissues induce production of different cytokine profiles.** J Leukocyte Biol 1996, **59**: 494-498

- (72) Kämmerer U, Schoppet M, McLellan AP, Kapp M, Huppertz HI, Kämpgen E, Dietl J: **Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells.** Am J Pathol 2000; **157**: 159-167
- (73) Kämmerer U, Eggert AO, Kapp M, McLellan AD, Geijtenbeek TBH, Ditel J, van Kooyk Y, Kämpgen E: **Unique appearance of proliferating antigen-presenting Cells Expressing DC-SIGN (CD209) in the Decidua of early human pregnancy.** Am J Pathol 2003, **162**, 887-896
- (74) Roth I, Corra DB, Locksley RM, Litton MJ, Abrams JS, Fischer S: **Human placental cytotrophoblasts produce the immunomodulatory cytokine IL-10.** J Exp Med 1996, **184**: 539-548
- (75) Laupéze A, Fardel O, Onno M, Bertho N, Drénou B, Fauchet R, Amiot L: **Differential Expression of Major Histocompatibility Complex Class Ia, Ib and II Molecules on Monocytes and Monocyte-Derived Dendritic and Macrophagic Cells.** Human Immunol 1999, **60**: 591-597
- (76) Wang X, Athayde N, Trudinger B: **A proinflammatory cytokine response is present in the fetal placental vasculature in placental insufficiency.** Am J Obstet Gynecol 2003, **189**, 1445-1451
- (77) Kauma S, Takacs P, Scordalakes C, Walsh S, Green K, Peng T: **Increased endothelial monocyte chemoattractant protein-1 and interleukin-8 in preeclampsia.** Obstet Gynecol 2002, **100**, 706-714
- (78) Madhappan B, Kempuraj D, Christodoulou S, Tsapikidis S, Boucher W, Karagiannis V, Athanassiou A, Theoharides TC: **High level of intrauterine corticotropin-releasing hormone, urocortin, tryptase and interleukin-8 in spontaneous Abortions.** Endocrinology 2003, **144**, 2285-2290
- (79) Kanai T, Fujii T, Kozuma S, Yamashita T, Miki A, Kikuchi A, Taketani Y: **Soluble HLA-G influences the release of cytokines from allogeneic peripheral blood mononuclear cells in culture.** Mol Hum Reprod 2001; **7**: 195-200
- (80) Upham JW, Lundahl J, Liang H, Denburg JA, O'Byrne PM, Snider DP: **Simplified quantitation of myeloid dendritic cells in peripheral blood using flow cytometry.** Cytometry 2000, **40**, 50-59

- (81) Paradisi R, Porcu E, Venturoli S, Maldini-Casadei M, Boni P: **Maternal serum levels of pro-inflammatory cytokines in missed and threatend abortion.** Am J Reprod Immunol 2003, **50**, 302-308
- (82) Wilson R, Jenkins C, Miller H, McInnes IB, Moore J, McLean MA, Walker JJ: **Abnormal cytokine levels in non-pregnant women with a history of recurrent miscarriage.** Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol 2004, **115**, 51-54
- (83) El-Shazly S, Makhseed M, Azizieh F, Raghupathy R: **Increased expression of pro-inflammatory cytokines in placentas of women undergoing spontaneous preterm delivery or premature rupture of membranes.** Am J Reprod Immunol 2004, **52**, 45-52
- (84) Sakai M, Tsuda H, Tanebe K, Sasaki Y, Saito S: **Interleukin-12 secretion by peripheral blood mononuclear cells is decreased in normal pregnant subjects and increased in preeclamptic patients.** Am J Reprod Immunol 2002, **47**, 91-97
- (85) Wilson R, Moor J, Jenkins C, Miller H, Walker JJ, McLean MA, Norman J, McInnes IB: **Abnormal first trimester serum interleukin 18 levels are associated with a poor outcome in women with a history of recurrent miscarriage.** Am J Reprod Immunol 2004, **51**, 156-159
- (86) Jacobsson B, Holst RM, Mattsby-Baltzer I, Nikolaitchouk N, Wennerholm UB, Hagberg H: **Interleukin-18 in cervical mucus and amniotic fluid: relationship to microbial invasion of the amniotic fluid, intra-amniotic inflammation and preterm delivery.** BJOG 2003, **110**, 598-603
- (87) Todt JC, Yang Y, Lei J, Lauria MR, Sorokin Y, Cotton DB, Yelian FD: **Effects of tumor necrosis factor-alpha on human trophoblast cell adhesion and motility.** Am J Reprod Immunol 1996, **36**, 65-71
- (88) Saito S, Umekage H, Sakamoto Y, Sakai M, Tanebe K, Sasaki Y, Morikawa H: **Increased T-helper-1-type-immunity and decreased T-helper-2-type immunity in patients with preeclampsia.** Am J Reprod Immunol 1999, **41**, 297-306
- (89) Yui J, Garcia-Lloret M, Wegmann TG, Guilbert LJ: **Cytotoxicity of tumor necrosis factor-alpha and gamma-interferon against primary placental trophoblasts.** Placenta 1994, **15**, 819-835

- (90) Fuzzi B, Rizzo R, Criscuoli L; Noci I, Melchiorri L, Scarselli B, Bencini E, Menicucci A, Baricordi OR: **HLA-G expression in early embryos is a fundamental prerequisite for the obtainment of preagnancy.** Eur J Immunol 2002, **32**, 311-315
- (91) Maier S, Grzeschik M, Weiss EH, Ulbrecht M: **Implications of HLA-E allel-expression and different HLA-E ligand diversity for die regulationof NK cells.** Hum Immunol 2000; 61: 1059-1065

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich sehr herzlich bedanken bei:

Frau PD Dr. U. Kämmerer für die Überlassung dieses Themas. Sie stand mir bei der Durchführung der Versuche, bei Problemen und Fragen jederzeit hilfreich zur Seite. Ich danke ihr für die sehr gute Betreuung, die vertrauensvolle Zusammenarbeit und die kompetente und äußerst geduldige Beratung während der Arbeit an dieser Dissertation.

Herrn Prof. Dr. J. Dietl für die Übernahme des Koreferats und die Überlassung eines Arbeitsplatzes mit den erforderlichen Mitteln.

Frau M. Kapp, die mich im Labor und in das praktische Arbeiten eingeführt hat. Vielen Dank für die gute Zusammenarbeit und das angenehme Arbeitsklima.

Herrn Dr. L. Rieger für die Einführung in das Computerprogramm Statistica und viele hilfreiche Hinweise für diese Dissertation.

Frau Prof. Dr. Weiss vom Institut für Anthropologie und Humangenetik der Ludwig-Maximilians-Universität München, die mir die Zelllinien für meine Experimente zur Verfügung gestellt hat.

Herrn Dr. M. Scheifele, der mir mit sehr viel Geduld zur Seite stand und mich immer wieder ermutigt hat, nicht aufzugeben.

Meinen Eltern ohne deren liebevolle Unterstützung ich das Studium der Humanmedizin und diese Dissertation niemals hätte beenden können. An dieser Stelle möchte ich mich noch einmal sehr herzlich dafür bei ihnen bedanken.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Elisabeth Rödel
Geburtstag: 21.09.1976
Geburtsort: Königstein/ Taunus

Schulbildung:

1983 – 1984: Grundschule Puchheim
1984 – 1987: Kerschensteiner-Grundschule Schweinfurt
1987 – 1989: Celtis-Gymnasium Schweinfurt
1989 – 1996: Reuchlin-Gymnasium Ingolstadt
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium:

11/1996 – 05/2003 Studium der Humanmedizin an der Julius-Maximilians-
Universität Würzburg
09/1998 Physikum
09/1999 1. Staatsexamen
03/2002 2. Staatsexamen
05/2003 3. Staatsexamen

Beruf:

seit 09/2003 ÄiP in der Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendpsychiatrie und Psychotherapie der Universitätsklinik Würzburg

Würzburg, den 07.10.2004