

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

Einfluss Schwangerschafts-assoziiertes Hormone auf Phänotyp und Funktion humaner dendritischer Zellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
vorgelegt von
Barbara Sophie Christine Huck
aus Nürnberg

Würzburg, Januar 2004

Referent: Priv.- Doz. Dr. rer. biol. hum. Ulrike Kämmerer

Koreferent: Prof. Dr. med. Johannes Dietl

Dekan: Prof. Dr. med. Stefan Silbernagl

Tag der mündlichen Prüfung: 28.5.04

Die Promovendin ist Ärztin

I.	Einleitung	3
1.	Die Rolle dendritischer Zellen im Immunsystem	3
2.	Toleranz versus Immunität.....	6
3.	Die Schwangerschaft als immunologisches Paradoxon.....	9
4.	Hormone als Regulatoren der Immunantwort.....	10
5.	Vorstellung des Projekts.....	12
II.	Material und Methoden	14
1.	Material	14
1.1	Geräte	14
1.2	Chemikalien und Verbrauchsmaterial.....	15
1.3	Antikörper	15
1.4	Puffer und Lösungen	16
1.5	Zellen, Zellkulturmedien und Medienzusätze.....	17
2.	Methoden.....	18
2.1	Reinigung der Schafererythrozyten.....	18
2.2	Isolierung dendritischer Zellen und Hormonzugabe.....	18
2.3	Isolierung der T-Zellen.....	21
2.4	Zytokin-ELISAs	21
2.5	mixed lymphocyte reaction (MLR).....	23
2.6	Durchflusszytometrie	23
2.7	Statistische Auswertung	24
III.	Ergebnisse.....	25
1.	Charakterisierung der verwendeten DC	25
1.1	Zytokinprofil	25
1.2	Einfluss des Lösemittels Ethanol	26
1.3	Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede.....	27
2.	Zytokinspiegel reifer mDC nach Hormonstimulation.....	27
2.1	IL-10.....	27
2.2	IL-18.....	28
2.3	IL-8.....	29
2.4	MDC.....	30
3.	FACS-Messungen	31
3.1	Phänotypische Charakterisierung der DC im FACS	31
3.2	Einfluss des Lösemittels Ethanol auf die Oberflächenmarkerexpression ...	33
3.3	Oberflächenmarkerexpression hormonstimulierter reifer DC.....	33
4.	Mixed Lymphocyte Reaction.....	36
4.1	Vergleich der Stimulationskapazitäten reifer und unreifer DC.....	36
4.2	Einfluss des Lösemittels Ethanol auf die Stimulationsrate	37
4.3	Stimulationskapazität reifer DC	38
IV.	Diskussion	40
1.	Einflüsse auf das Modellsystem	40
2.	Einfluss von Progesteron auf Phänotyp und Funktion der DC	41
3.	Einfluss von Dexamethason auf Phänotyp und Funktion der DC.....	43
4.	Einfluss von β -Estradiol auf Phänotyp und Funktion der DC	43
5.	Einfluss von β HCG auf Phänotyp und Funktion der DC.....	45
V.	Zusammenfassung	47
VI.	Literaturverzeichnis.....	49

I. Einleitung

1. Die Rolle dendritischer Zellen im Immunsystem

Dendritische Zellen (DC) sind hochspezialisierte antigenpräsentierende Zellen (APC), die Immunantworten induzieren und stimulieren und dabei den bisher bekannten APC wie zum Beispiel Makrophagen hoch überlegen zu sein scheinen (*Steinman, 1991*). Schon 1868 wurden mit den Langerhans-Zellen der Haut Vertreter der DC entdeckt, doch erst mit der Entdeckung dendritischer Zellen in lymphatischen Organen der Maus durch R.M. Steinman im Jahr 1973 (*Steinman, 1973*) begann die intensive Erforschung



Abbildung 1:
*Aus Monozyten
differenzierte dendritische
Zellen in der Zellkultur.
Deutlich erkennbar sind
die zahlreichen
Zellausläufer (Dendriten).*

dieser außergewöhnlichen Zellpopulation.

Dendritische Zellen sind sowohl potente Stimulatoren des B- wie auch des T-Zellsystems, die je nach Reifungszustand verschiedenartigste Funktionen im Immunsystem übernehmen können.

Von hämatopoetischen Stammzellen des Knochenmarks abstammend finden sich unreife DC (immature, iDC) in nahezu allen Organen des Körpers (*Wright-Browne, 1997*), insbesondere aber in Geweben wie Haut und Schleimhäuten, die in direktem Kontakt mit der Umwelt stehen (*Hart, 1997*).

Diese gewebsständigen DC besitzen effiziente Mechanismen zur Aufnahme von Antigen in die Zelle. Die Antigene werden anschließend intrazellulär prozessiert und gebunden an MHC-Rezeptoren an der Zelloberfläche präsentiert. Die Besonderheit der DC liegt nicht nur in der besonderen Effizienz der Antigenaufnahme, sondern auch in den großen Mengen an MHC-Peptid-Komplexen, die DC an ihrer Oberfläche präsentieren können (*Banchereau, 1998*).

Nach erfolgter Antigenaufnahme beginnen die iDC aus den peripheren Geweben in die lymphatischen Organe, die Milz und die Lymphknoten, zu wandern.

Es kommt hierbei zu einer Reihe zellbiologischer Veränderungen, die zur sogenannten Reifung der iDC zu reifen DC (mature, mDC) führen. Die reifenden DC verlieren dabei ihre Fähigkeit zur Antigenaufnahme. Die Expression einer Reihe kostimulatorischer Moleküle wie CD80 (B7-1) und CD86 (B7-2) sowie großer Mengen CD40 ermöglicht die effektive Stimulation sowohl antigenspezifischer als auch naiver T-Zellen (*Guermontez, 2002*). Durch die Bildung zahlreicher Zellausläufer, sogenannter Dendriten, erreichen die mDC eine enorme Oberflächenvergrößerung. So wird eine Kontaktaufnahme mit sehr vielen T-Zellen und damit ein rasches Durchsuchen des T-Zellpools nach dem für das jeweilige Antigen passenden Klon ermöglicht (*Friedl, 2001*). Auch das Zytokinprofil der mDC verändert sich und ermöglicht z.B. durch die Sekretion von IL-12 eine noch effektivere Stimulation der T-Zellantwort (*Romani, 1999*). Die mDC formen also Zellaggregate mit T-Zellen und erzeugen ein Mikroklima in dem sich eine Immunantwort entwickeln kann.

Wie inzwischen bekannt ist, tragen sowohl Faktoren dieses Mikroklimas aus Zytokinsignalen, kostimulatorischen Molekülen und Einflüssen des Antigens als auch Einflüsse des Reifungszustands und der zellulären Abstammung der APC zur Richtung der induzierten Immunantwort bei (*Banchereau, 2000; Lutz, 2002; Kalinski, 1999*).

Überblick über die Migration und Reifung der DC nach Antigenkontakt

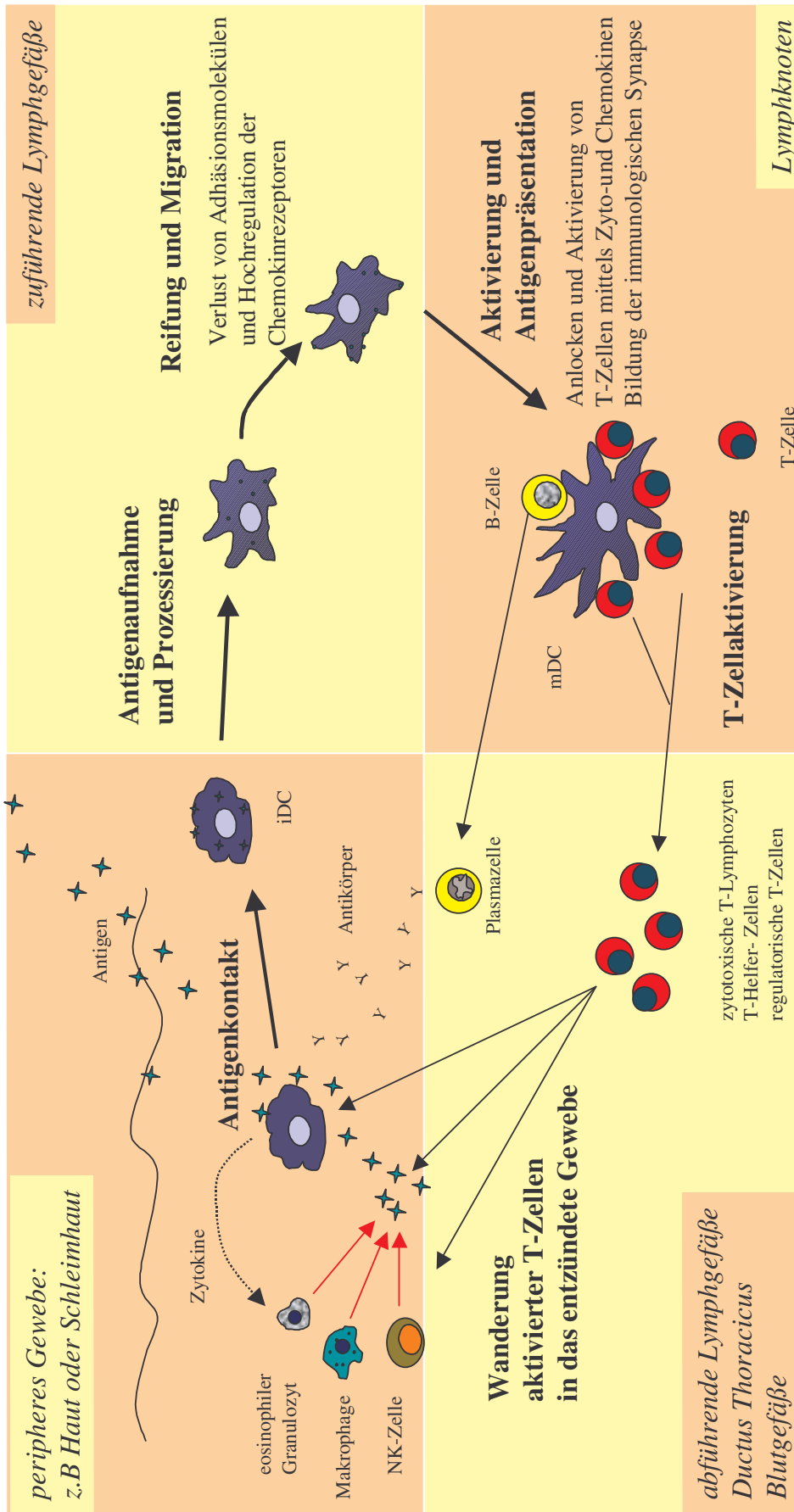


Abbildung 2:

Abbildung 2 zeigt die verschiedenen Schritte einer Immunantwort durch dendritische Zellen.

Als unreife DC sind sie im peripheren Gewebe, insbesondere an den Grenzflächen zur Umwelt wie in Haut oder Schleimhaut, lokalisiert. Kommen DC in Kontakt mit Antigenen wie z.B. mikrobiellen Produkten oder Antigenen von Tumorzellen, so wird das Antigen durch Endozytose in die Zelle aufgenommen und intrazellulär prozessiert. Die Antigenaufnahme führt zu grundlegenden zellbiologischen Veränderungen der DC: Die bisher gewebsständigen Zellen verlieren Adhäsionsmoleküle wie E-cadherin und zeigen deutlich mehr Chemokinrezeptoren wie z.B. CCR7 auf der Oberfläche. Gesteuert von Chemokinen beginnen die DC ihre Wanderung aus dem peripheren Gewebe in die Lymphgefäße und weiter in die lymphatischen Gewebe. Im Lymphknoten finden sich die DC vor allem in den T-Zellarealen der Keimzentren. Hier präsentieren sie das Antigen mittels MHCII-Molekülen und ermöglichen eine effiziente Kostimulation durch die Hochregulation kostimulatorischer Oberflächenmoleküle wie z.B. B7. Durch Chemokine wie MDC und DC-CK1 werden naive und erfahrene T-Zellen angelockt und von den DC nach dem für das Antigen spezifischen T-Zellklon durchgetestet (Flores-Romo, 2001). Die entsprechenden T-Zellen werden aktiviert und differenzieren in Effektor-T-Zellen oder werden zu aktivierten T-Helfer-Zellen oder regulatorischen T-Zellen (Treg) zur Steuerung der Immunantwort. Diese Zellen wandern zurück in das entzündete periphere Gewebe und wirken sowohl direkt auf das entsprechende Antigen und die DC im peripheren Gewebe als auch auf weitere Zellen des Immunsystems wie Granulozyten, Makrophagen und NK-Zellen, die an der Immunantwort beteiligt sind, ein.

2. Toleranz versus Immunität

Eine der wichtigsten Eigenschaften des Immunsystems stellt die Fähigkeit zur Unterscheidung zwischen „körpereigenen“ und „fremden“ Antigenen dar. Während gegen die Fremdantigene eine effiziente Immunantwort ausgelöst werden muss, dürfen keine Antworten gegen körpereigene Antigene induziert werden. Störungen dieser immunologischen Selbsttoleranz führen zu Autoimmunerkrankungen.

Schon lange bekannt ist die Ausbildung der sogenannten zentralen Toleranz während der Fetal- und Neonatalperiode. Hier werden im Thymus T-Zellen, die einen spezifischen Rezeptor für ein Selbst-Antigen tragen, ausselektiert und vernichtet (Rammensee, 1984). Störungen dieser kindlichen Entwicklung führen zu schwersten Defekten des Immunsystems.

Doch auch außerhalb des Thymus existieren Mechanismen der sogenannten peripheren Toleranz, die die Ausbildung einer Autoimmunität verhindern. Seit einigen Jahren kennt man T-Zellpopulationen, die Immunantworten regulieren und dabei

Autoimmunität vorbeugen und Autoimmunreaktionen limitieren (*Shevach, 2000*). Eingehende Untersuchungen der Induktion und Regulation dieser sogenannten regulatorischen T-Zellen (T_{reg}) ergaben starke Hinweise darauf, dass DC diejenigen antigenpräsentierenden Zellen sind, die die periphere T-Zelltoleranz kontrollieren (*Roncarolo, 2001; Steinman, 2002*). Den wesentlichen Faktor für die Entscheidung zwischen tolerisierender und immunisierender Wirkung scheint vor allem das Reifungsstadium der DC darzustellen (*Lutz, 2002*). Nur DC, die nach Kontakt mit inflammatorischen Stimuli, wie proinflammatorischen Zytokinen oder mikrobiellen Antigenen, eine vollständige Ausreifung erfahren haben, sind in der Lage, Immunität zu induzieren. Unreife iDC können tolerisierende T-Zellpopulationen induzieren, wobei auch hier verschiedene Mechanismen existieren. Repetitive Stimulation naiver CD4+ T-Zellen mit allogenen unreifen DC führt zur Differenzierung der CD4+Zellen in regulatorische T-Zellen (T_{reg}) (*Jonuleit, 2000*). Diese T_{reg} exprimieren die Marker CD4+, CD25+ sowie CTLA-4 und zeigen nach Aktivierung keine Proliferation. Stattdessen werden Effektor-T-Zellen nach direktem Zell-Zell-Kontakt von den T_{reg} inhibiert.

Werden die DC mittels bestimmter Stimuli wie IL-10 oder TGF β moduliert, so entstehen semigereifte DC. Diese semigereiften DC können eine weitere tolerisierende Zellart, die sogenannten anergischen T-Zellen, induzieren (*Steinbrink, 1997*). Diese CD4+ oder CD8+ T-Zellen zeigen eine Antigen-spezifische immunsuppressive Aktivität. Im Gegensatz zu den T_{reg} werden jedoch von anergischen T-Zellen keine immunmodulierenden Zytokine synthetisiert und CD25 ist deutlich herunterreguliert (*Mahnke, 2002*).

Dendritische Zellen sind also nach heutigem Kenntnisstand auch bezüglich der Induktion und Regulation der Toleranz die Schlüsselzellen des Immunsystems.

Verschiedene Reifungsstadien der DC und ihr Einfluss auf Toleranz und Immunität

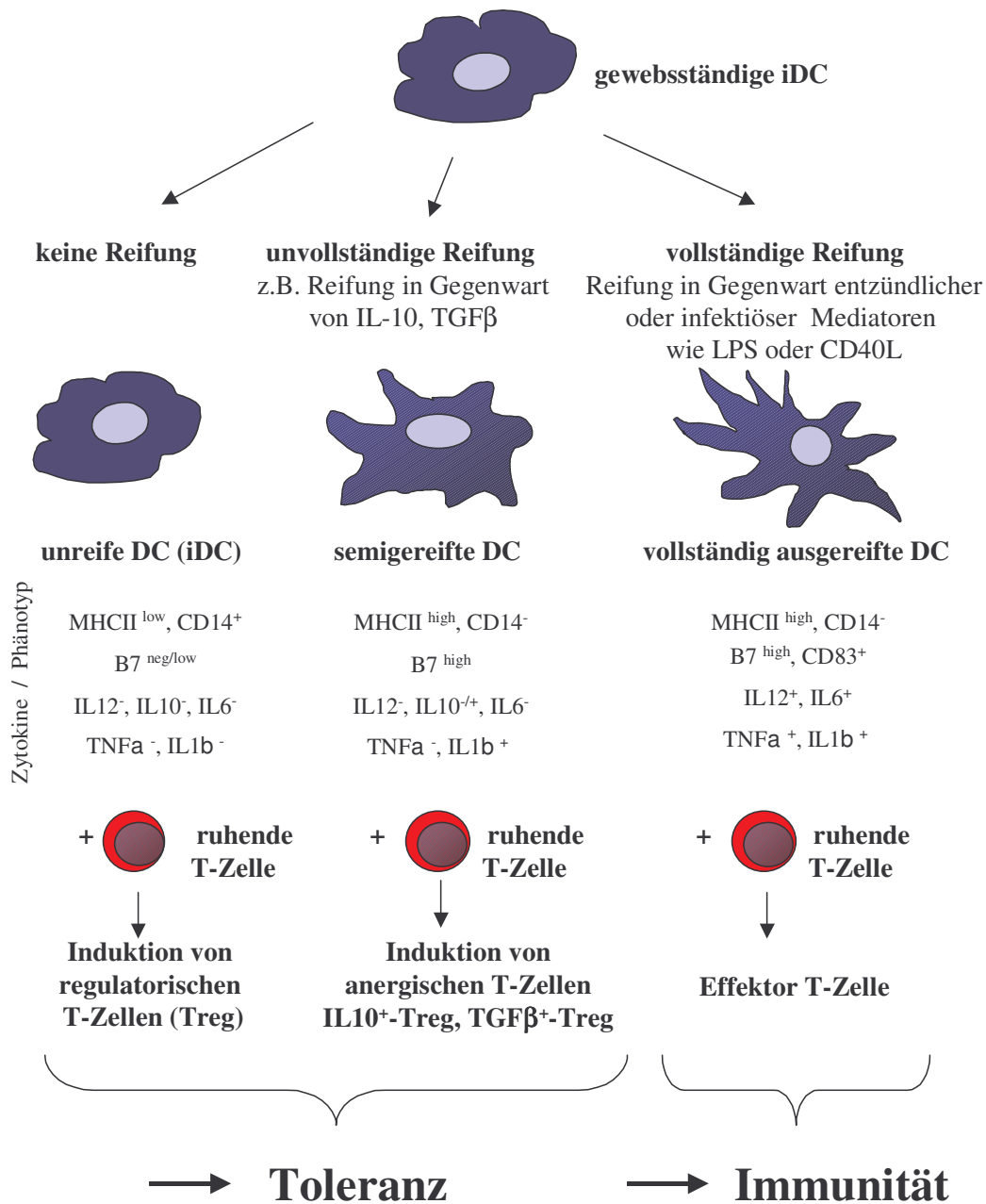


Abbildung 3:

Gezeigt sind die verschiedenen Reifungsstadien dendritischer Zellen und ihre Bedeutung für die Entstehung von Toleranz oder Immunität. Unreife iDC, die nur eine schwache Expression kostimulatorischer Oberflächenmarker zeigen und inflammatorische Zytokine nicht oder nur in sehr niedrigen Spiegeln produzieren, können bei Kontakt mit ruhenden T-Zellen unter bestimmten Bedingungen zur Induktion von regulatorischen T-Zellen führen.

3. Die Schwangerschaft als immunologisches Paradoxon

Eine besondere immunologische Situation stellt die Interaktion zwischen Fetus und Mutter während der Schwangerschaft dar. An der fetomaternalen Grenzzone findet ein direkter Kontakt des mütterlichen Immunsystems mit dem semiallogenen, immunologisch gesehen „fremden“ Fetus statt. Trotz intensiver Untersuchungen ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt, auf welche Weise sich der Fetus vor Übergriffen des maternalen Immunsystems schützt und wie die immunologische Toleranz des mütterlichen Immunsystems gegenüber dem fetalen „Allotransplantat“ (*Medawar, 1953*) induziert wird (*Mellor & Munn, 2000*).

In zahlreichen Arbeiten hat man die Zytokinexpression an der fetomaternalen Grenzzone und ihre Regulation untersucht (*Rice & Chard, 1998; Kauma, 2000; Robertson, 1994*). Die Ergebnisse dieser Studien legen nahe, dass in erfolgreichen Schwangerschaften ein lokaler Shift in der Zytokinproduktion von einem Th1- zu einem Th2- orientierten Expressionsmuster stattfindet (*Dealtry et al., 2000*). Diese Ergebnisse werden durch die Tatsache unterstützt, dass bei Frauen, die bereits mehrfache Spontanaborte erlitten hatten, während der Schwangerschaft ein anderes Zytokinprofil im uterinen Trakt gemessen wurde als bei Frauen mit normal verlaufenden Schwangerschaften (*Rhagupathy, 1997; Piccinni et al., 1998*).

Ein weiterer heute bekannter Mechanismus der Toleranzinduktion ist das Fehlen klassischer HLA-Antigene auf der Oberfläche des Trophoblasten. Stattdessen erfolgt eine Expression der nicht klassischen Oberflächenmoleküle HLA-E und HLA-G (*Kovats et al., 1990*).

Für HLA-G ist eine regulatorische Rolle für die Aktivität der dezidualen NK-Zellen bekannt. Interaktion von HLA-G mit dezidualen NK-Zellen hat eine reduzierte lytische Aktivität und eine Änderung des Zytokinmusters dieser Zellen zur Folge (*Münz et al., 1997*).

Neben den dezidualen NK-Zellen konnten inzwischen auch Populationen immunstimulierender DC in dezidualem Gewebe identifiziert werden (*Kämmerer et al., 2000*). Hinweise auf tolerisierende DC-Populationen werfen nun die Frage nach einer möglichen Rolle dendritischer Zellen in der Regulation der immunologischen Vorgänge an der fetomaternalen Grenzzone auf.

4. Hormone als Regulatoren der Immunantwort

Hormonelle Einflüsse auf das Immunsystem sind für einige Hormone zwar bereits bekannt, aber bisher insgesamt noch wenig untersucht. Ein Hinweis auf die Einflüsse der Sexualhormone auf das Immunsystem ist die deutlich höhere Prävalenz von Autoimmunerkrankungen, wie z.B. SLE, Rheumatoide Arthritis oder Multiple Sklerose, bei Frauen als bei Männern.

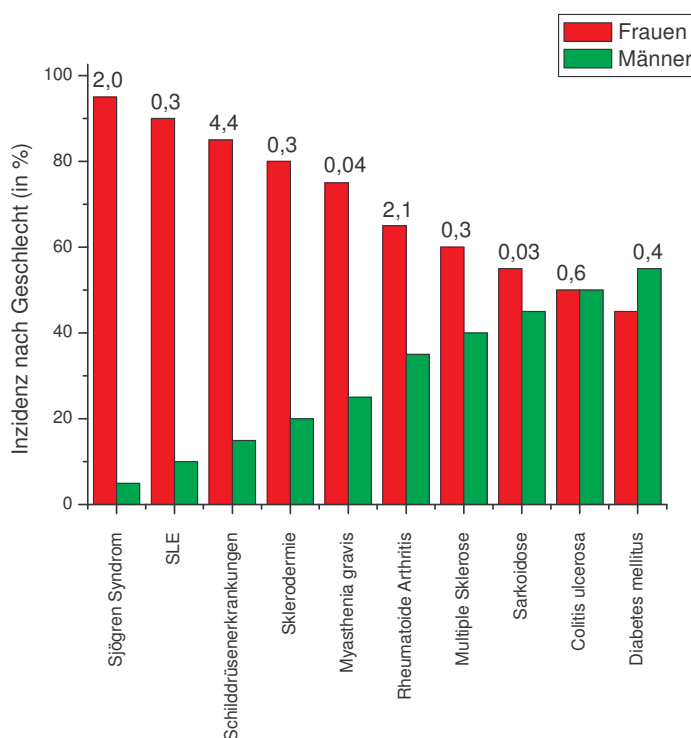


Abbildung 4:
 Geschlechterverhältnisse bei den wichtigsten Autoimmunerkrankungen. Die Zahlen oberhalb der Säulen zeigen die absolute Anzahl an Krankheitsfällen (in Millionen) in den USA.
 (nach Whitacre, 2001)

Bemerkenswert ist hier insbesondere auch die Beobachtung, dass sich die Aktivität einiger Autoimmunerkrankungen im Rahmen von Schwangerschaft und Wochenbett, also bei deutlich modifizierter hormoneller Lage, stark verändert (Whitacre, 2001). Für Multiple Sklerose und Rheumatoide Arthritis, beides Krankheiten, die mit einem erhöhten Th1-Zytokin-Profil einhergehen, werden Besserungen der Symptomatik während der Schwangerschaft beschrieben. Insbesondere im dritten Trimenon, wenn hohe Progesteron- und Östrogenspiegel vorherrschen, scheint die Krankheitsaktivität niedriger, was oft von einem erneuten Krankheitsschub beim Abfallen der Hormonspiegel im Wochenbett gefolgt wird (Sadovnick et al., 1994; Feldmann et al.,

1996). Beim systemischen Lupus erythematoses, dem eher ein Th2-Profil zugeschrieben wird, bleibt dagegen die Krankheitsaktivität unverändert oder verstärkt sich im Rahmen einer Schwangerschaft (*Petri et al., 1991*).

Im Tiermodell konnte der Zusammenhang zwischen gemilderter Symptomatik infektiöser Arthritiden in der Schwangerschaft und einer hormonell induzierten Änderung der Zytokinspiegel bereits nachgewiesen werden. Die Hormone Progesteron und β HCG bewirkten hier deutliche Veränderungen im Zytokinprofil der erregerspezifischen T-Zellen beziehungsweise der Zellen des synovialen Gewebes (*Moro et al., 2001; Song et al., 2000*).

In den bisher durchgeführten Untersuchungen zum Einfluss der Sexualhormone auf das Immunsystem wurde jedoch im wesentlichen das T-Zellsystem untersucht (*Piccini et al., 1995; Piccini et al., 2000*). Für die Wechselwirkungen von Sexualhormonen mit antigenpräsentierenden Zellen gibt es bisher nur sehr wenige Daten, die Rolle dendritischer Zellen in diesem Zusammenhang wurde noch nicht untersucht.

Für andere Steroidhormone wurden jedoch bereits umfangreiche Untersuchungen an DC durchgeführt:

Besondere Aufmerksamkeit kommt hier vor allem den Steroiden zu, die auch klinisch zur Immunmodulation genutzt werden. Für Glukokortikoide konnte ein deutlicher Effekt auf die Ausreifung dendritischer Zellen gezeigt werden. Dexamethason führte zu einer Störung der DC-Reifung, verhinderte die Ausbildung einer effizienten Th1-Zellantwort und induzierte die Expansion regulatorischer T-Zellklone (*Matyszak et al., 2000*). Ähnliche reifungsverzögernde Wirkungen auf DC konnten auch für das Steroidhormon Vitamin D₃ gezeigt werden (*Canning et al., 2001*).

Diese Experimente zeigen, dass Hormone die Funktion der DC durchaus wesentlich beeinflussen können.

5. Vorstellung des Projekts

Die ständig wachsenden Erkenntnisse zur essentiellen Rolle der DC in der Induktion von Immunität oder Immuntoleranz werfen ein neues Licht auf die potentielle Funktion dendritischer Zellen in der fetomaternalen Grenzzone. Vermutete man bisher, dass vor allem die dezidualen NK-Zellen verantwortlich für Kontrolle der immunologischen Vorgänge in der Schwangerschaft seien, kann nun eine mögliche regulatorische Funktion der DC postuliert werden. In einem ersten Schritt konnten histologische Untersuchungen die Existenz reifer und unreifer DC in deziduaalem Gewebe zeigen. Nun muss die Funktion und Regulation dieser Zellpopulationen weiter untersucht werden.

In dieser Arbeit wurde der Einfluss Schwangerschafts-assoziiierter Hormone auf die verschiedenen Reifungsstufen der DC gezeigt. Da aus technischen Gründen die direkte Isolierung von DC aus deziduaalem Gewebe bislang noch unbefriedigende Ergebnisse liefert, wurde der hormonelle Einfluss hier an in vitro kultivierten humanen DC untersucht. Die in vitro-Differenzierung dendritischer Zellen aus monozytären Vorläuferzellen ermöglicht Zellisolate großer Reinheit und gut definierter Ausreifungsstadien und gestattete es so, die Versuche in einem gut etablierten Modellsystem durchzuführen.

Untersucht wurden Einflüsse der Steroidhormone Progesteron und β -Estradiol sowie des Peptidhormons β HCG in verschiedenen schwangerschaftsrelevanten Konzentrationen. Die DC wurden vor allem auf solche Veränderungen ihrer Zytokinprofile geprüft, die die Entwicklung der T-Zellantwort beeinflussen. Begleitend sollten jedoch auch die im direkten Zell-Zellkontakt relevanten Veränderungen in der Expression der Oberflächenmarker gemessen werden. Hier standen besonders Änderungen der MHC-Komplexe und der kostimulatorischen Moleküle sowie der Reifungsmarker im Mittelpunkt des Interesses. Mit Hilfe einer Kokultivierung von DC mit allogenen T-Zellen wurde abschließend noch die allgemeine T-Zellstimulationskapazität der DC unter Hormoneinfluss gemessen.

In jüngster Zeit veröffentlichte Daten zeigen einen engen Zusammenhang zwischen den Ausreifungsstadien und der tolerogenen oder immunogenen Funktion der DC (*Lutz & Schuler, 2002*). Daher erschien eine Untersuchung sowohl an reifen wie auch an unreifen DC sinnvoll. In dieser Arbeit sollte der Schwerpunkt auf die Messung der

reifen DC gelegt werden. Zum Vergleich wurden die Daten zur Oberflächenmarkerexpression und T-Zellstimulationskapazität jedoch auch für unreife DC erhoben. Da diese Arbeit in Zusammenarbeit mit Frau Marion Habersack durchgeführt wurde, sei hier für die Zusammenfassung der Zytokinmessungen an unreifen Zellen auf ihre Promotionsarbeit verwiesen.

II. Material und Methoden

1. Material

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

1.1 Geräte

Zellkulturausstattung

Sterilwerkbank SterilGARD[®] Class II TypA/B3

Brutschrank Incubator NAPCO 5420-1

Lichtmikroskop Leica DM IRB

Zählkammer Brand Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,1mm, Fläche 0,0025mm²)

Zentrifugen

Hettich EBA 12

Hettich Universal 16R

Waagen

Kern 510-33

Scaltec SAC 51

Ohaus LS 5000

Sonstige Geräte

Biophotometer, Eppendorf

ELISA Reader MRX, Dynex Technologies

FACScan, Becton Dickinson Heidelberg

Heizblock Techne Dri-Block[®] DB2A

Magnetrührer Variomag[®] Electronicrührer, Monotherm

PH-Meter Greisinger Electronic GPRT 1400A

Vortex MS1 Minishaker IKA[®]

Software

CellQuest, Becton Dickinson

Excel, Microsoft

WinMDI, Joseph Trotter, The Scripps Research Institute, La Jolla, CA

Winword, Microsoft

Statistica

GraphpadPrism

1.2 Chemikalien und Verbrauchsmaterial

geordnet nach Herstellern

Verbrauchsmaterial

American National Can™	Parafilm “M”
Brand	Eppendorf–Reaktionsgefäße, Blue Caps 15ml und 50ml,
Braun	Original Perfusorspritze OPS 50ml
Costar	Cell culture Cluster 24 well
Eppendorf	Combitips, Pipettenspitzen, Plastikkuvetten
Greiner	Pipettenspitzen, Eppendorf-Reaktionsgefäße, Bluecaps, Kryoröhrchen, Petrischalen Cellstar®,
Hartmann	Pehazell® Zellstoff
Nunc	ELISA-Platten Nunc-Immuno™ Plate 96-well 96-well-Platte für FACS-Färbungen
TPP	Petrischalen für Zellkultur 100*20mm 96-well-Zellkulturplatten für MLR

Chemikalien und Medienzusätze

Biochrom	PBS Dulbecco, Alsever Solution, Zellkulturmedium RPMI1640, Gentamycinsulfat, Penicillin/Streptomycin
Boehringer Mannheim	Neuraminidase
CAI Biochem	Prostaglandin E ₂
Centeon	Beriglobulin
DAKO	Ziegen Serum Normal
Endogen	Streptavidin-konjugierte Meerrettichperoxidase (HRP)
Merck	Zitronensäure-Monohydrat
Pharmingen	Substrat Reagent A und B ELISA-Sets: OptEIA™ Set Human IL-8, IL-10, IL-12p70, IL-13, TNFα
PAN	Fetal Calf Serum (FCS)
Sandoz	GM-CSF (Leukomax400®)
Serono	βHCG Pregenesin
Sigma	Histopaque–1077, EDTA, Tween20, 2-Mercaptoethanol, Dexamethason (9a-Fluoro-16a-methylprednisolon), Trypanblau-Lösung 0,4%, Rinderalbumin, DMSO, 17β-Estradiol (4-Pregnen-3,20-dion)
Strathmann	Zellkulturzusätze IL-4, IL-6, IL-1β, TNFα

1.3 Antikörper

BD Pharmingen	Fluoresceinisothiocyanat (FITC)-konjugierter anti-IgG ₁ - Antikörper, FITC-konjugierter antihumaner monoklonaler Anti-CD40- Antikörper FITC-konjugierter antihumaner monoklonaler Anti-HLA- DR-Antikörper
---------------	---

Coulter Immunotech	Phycoerythrin (PE)-konjugierter antihumaner monoklonaler Anti-CD83-Antikörper
Cymbus Biotechnology	PE-konjugierter anti-IgG ₁ -Antikörper, PE-konjugierter antihumaner monoklonaler Anti-HLA-DR-Antikörper
R&D Systems	Capture- und Detection-Antikörper für MDC und IL-18 ELISA

1.4 Puffer und Lösungen

Soweit nicht anders angegeben, wurde destilliertes Wasser als Lösungsmittel verwendet.

Medienzusätze (Stammlösungen)

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

Lösungen zur Zellisolierung

PBS	gelöst in H ₂ O
Alsever Lösung	unverdünnt eingesetzt
PBS mit Pen / Strep	PBS mit Pen/Strep (1:200)
PBS / Citrat	1 Volumenteil 0,106 M NaCitrat-Lösung mit 9 Teilen PBS
PBS / EDTA	PBS mit 2 mM EDTA
PBS mit Neuraminidase	0,01 U/ml
Lysepuffer für Schafserys	8 M NH ₄ Cl

Hormone (Stammlösungen)

17β-Estradiol	5 mg/ml gelöst in Ethanol
Progesteron	5 mg/ml gelöst in Ethanol
β-HCG	5000 IE/ml gelöst in physiologischer NaCl-Lösung
Dexamethason	50 mM gelöst in DMSO für ELISA-Versuche

50 mM gelöst in Ethanol für MLR und FACS-Analyse

ELISA-Lösungen

Coating Puffer IL-6, IL-18, MDC	PBS, pH 7,4
Coating Puffer für IL-8	8,4 g NaHCO ₃ + 3,56 g Na ₂ CO ₃ auf 1l H ₂ O, pH 9,5
Coating Puffer für IL-12p70	11,8 g Na ₂ HPO ₄ + NaH ₂ PO ₄ auf 1l H ₂ O, pH 9,0
Assay Diluent für OptEIAsets	PBS mit 10% FCS
Assay Diluent für MDC	PBS mit 1% BSA
Assay Diluent für IL-18	20 mM TBS (20 mM Tris-Base, 150 mM NaCl) mit 0,1% BSA und 0,05% Tween-20, pH 7,3
Assay Diluent für IL-6	PBS mit 4% BSA, pH 7,2 – 7,4
Wasch-Puffer für IL-6	50 mM Tris, 0,2% Tween-20, pH 7,9 – 8,1
Wasch-Puffer für IL-18, MDC	PBS mit 0,05% Tween-20, pH 7,4
Wasch-Puffer für OptEIAsets	PBS mit 0,05% Tween-20, pH 7,4
Substrat-Lösung	Tetramethylbenzidin und Hydrogenperoxid gemischt im Verhältnis 1:1
Stop-Lösung	2 M H ₂ SO ₄

1.5 Zellen, Zellkulturmedien und Medienzusätze

Zellen

Dendritische Zellen	isoliert aus Buffycoats von Blutspendern des Blutspendedienstes des BRK, Institut Wiesentheid und der Abteilung für Transfusionsmedizin des Universitätsklinikums Würzburg Die Buffycoats wurden circa 24 h nach der Spende verarbeitet.
T- Zellen	isoliert aus Buffycoats (s.o.), in FCS/DMSO eingefroren und in flüssigem Stickstoff gelagert
Schafserythrozyten	isoliert aus Schafblut von Schafen aus den Tierställen des Universitätsklinikums Würzburg Das Schafblut wurde circa 2 h nach Blutabnahme weiterverarbeitet.

Medien

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

2. Methoden

2.1 Reinigung der Schaferythrozyten

Schaferythrozyten mit speziellen Oberflächeneigenschaften erlauben eine Rosettierung von T-Zellen, die eine Isolierung von T-Zellen aus einer Zell-Suspension ermöglicht. Ausgegangen wurde von einer Mischung aus 30ml frisch gewonnenem Schafblut, das zur Gerinnungshemmung direkt bei der Blutabnahme mit 20ml Alseverlösung versetzt wurde. Das Schafblut wurde in PBS gewaschen, bei 1100 x g 10 min ohne Bremse zentrifugiert und durch sorgfältiges Abnehmen des Überstandes vom Buffycoat, d.h. allen leukozytären Bestandteilen des Blutes, befreit. Anschließend erfolgte die Inkubation der Schaferythrozyten mit 0,005 U Neuraminidase pro ml eingesetzten Schafbluts für 30 min bei 37°C. Nach drei weiteren Waschschrritten mit PBS mit Penicillin und Streptomycin wurde das Pellet in 0,4 ml RPMI1640/Genta/10% FCS pro ml eingesetzten Schafbluts aufgenommen und bei 4°C im Kühlschrank gelagert. Die gereinigten Schaferythrozyten konnten bis circa eine Woche nach der Isolierung verwendet werden. Eine Ausgangsmenge von 50 ml Schafblut mit Alseverlösung reichte für die Isolierung von vier humanen Buffycoats aus.

2.2 Isolierung dendritischer Zellen und Hormonzugabe

Die Isolierung dendritischer Zellen erfolgte weitgehend nach dem Standard-Protokoll von Romani et al. (*Romani et al., 1996*).

Isolierung der peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

Die Isolierung der PBMC erfolgte ausgehend von Buffycoats der Blutspendedienste, die jeweils dem leukozytären Anteil von 500 ml Vollblut entsprechen. Die Buffycoats wurden möglichst steril geöffnet und nach Verdünnen mit PBS/Citrat auf Histopaque-Gradienten aufgetragen. Pro Buffycoat wurden drei 50 ml Röhrchen mit je 15 ml vorgelegtem Histopaque mit dem Leukozytengemisch beladen. Nach 30 min Zentrifugation bei 400 x g ohne Bremse bildeten sich drei Phasen. In der obersten Phase befindet sich das Plasma, welches abgenommen wurde und nach Abzentrifugieren der

Thrombozyten bei 3000 x g zur weiteren Verwendung kühl gelagert werden kann. In der mittleren, weißlichen Phase befinden sich die PBMCs, die sorgfältig abgenommen und anschließend in PBS/Citrat gewaschen wurden. Um jetzt die T-Zellen aus dem Zell-Gemisch zu entfernen, wurde das PBMC-Pellet in 5 ml der vorbehandelten Schaferythrozyten aufgenommen und bei 4°C eine Stunde lang inkubiert. Die T-Zellen, die mit den Schaferythrozyten Rosetten-ähnliche Vernetzungen bilden, konnten nun über eine weitere Zentrifugation über einen Histopaque-Gradienten abgetrennt werden: Die oberste Phase wurde verworfen, die mittlere, weißliche Phase, die nunmehr Monozyten, Granulozyten und B-Zellen enthält, wurde vorsichtig abgenommen und nach einem Waschschrift mit PBS/EDTA weiterverarbeitet. Die unterste Phase enthält das Erythrozyten-Pellet mit den T-Zellen, die zur T-Zell-Isolierung verwendet werden können.

Um etwaige Schafblutspuren aus der Monozytenfraktion zu entfernen, wurden die Zellen kurz in 8 M NH₄Cl gespült, was zur Lyse der Erythrozyten führt, und anschließend in PBS/EDTA gewaschen und gezählt.

Nach Bestimmung der Zellzahl wurde der Adhärenzschritt zur Entfernung nicht Plastik-adhärenter Zellen vorbereitet. Je 30 Millionen Zellen wurden in 10 ml RPMI/Genta mit 2% autologem Plasma in einer Petrischale 60 min bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die nicht-adhärenen Zellen abgenommen und die Zellkulturschalen zweimal kräftig mit PBS/EDTA gewaschen. Die verbleibende adhärenente Zellfraktion wurde nun 7 Tage lang in 8 ml Differenzierungsmedium pro Schale bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert.

Medienwechsel erfolgten am Tag 3 und 5 der Kultur, wobei jeweils nur die Hälfte des Mediums durch frisches Medium mit IL-4 und GM-CSF ersetzt wurde.

Reifung der dendritischen Zellen

Durch die siebentägige Kultur der adhärenenten Monozytenfraktion in GM-CSF und IL-4 differenzieren die Zellen zu unreifen dendritischen Zellen. Die erhaltene Reinheit lag ungefähr bei 96 % HLA-DR positiver Zellen.

Kultiviert man die Zellen ab Tag 7 in einem speziellen Zytokin-Cocktail, so differenzieren die Zellen zu reifen dendritischen Zellen aus. Die Zellen zeigten eine veränderte Morphologie und Expression bestimmter Oberflächenmarker wie CD83 und

der Aktivierungsmarker CD86 und CD40. Nach einer dreitägigen Kultur im Reifungsmedium, welchem IL-1 β , IL-6, TNF α und PGE₂ zugesetzt sind, zeigten die Zellen am Tag 10 einen reifen Phänotyp (mDC)

Zugabe der Hormone

Zeitgleich zur Zugabe des Reifungscocktails wurde auch mit den Stimulationsversuchen begonnen. Hierfür wurden die DC gezählt und zu je 5×10^5 Zellen pro well in 24well plates umgesetzt. In jedem well wurde 500 μ l altes Medium mit 500 μ l frischem Medium mit Reifungscocktail aufgefüllt. Von der jeweiligen Hormonverdünnung wurden je 20 μ l zugegeben, so dass die gewünschte Endkonzentration im jeweiligen Ansatz vorlag. Die Hormonstimulationsansätze wurden weiter bis Tag 10 kultiviert, dann wurden die Zellen abzentrifugiert (10 min, bei 250 x g), die Überstände aliquotiert, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80°C bis zur Untersuchung im ELISA gelagert. Die Zellen wurden frisch in die MLR eingesetzt und im FACS untersucht.

Progesteron und 17 β -Estradiol wurden jeweils in den Konzentrationen 0,1 ng/ml, 10 ng/ml und 1000 ng/ml getestet. Darüber hinaus wurden Versuche mit Kombinationen aus 0,1 ng/ml, 10 ng/ml und 1000 ng/ml Progesteron mit 10 ng/ml 17 β -Estradiol durchgeführt.

β HCG wurde in Konzentrationen von 10 mIE/ml, 50 mIE/ml und 250 mIE/ml getestet. Zusätzlich wurden Kombinationen aus 0,1 ng/ml, 10 ng/ml und 1000 ng/ml Progesteron mit 50 mIE/ml untersucht.

Da Progesteron und 17 β -Estradiol in Ethanol gelöst wurden, musste der Einfluss des Alkohols auf die Zellen untersucht werden. Hierfür wurden alle Experimente zusätzlich zu den Hormonansätzen auch mit Lösemittelkontrollen durchgeführt, deren Ethanolkonzentration den in den Hormonansätzen vorliegenden Ethanolanteilen entsprach.

2.3 Isolierung der T-Zellen

Für die mixed lymphocyte reaction (MLR) mussten T-Zellen isoliert werden. Die benötigten Zellen wurden aus den mit den Schaferthozyten rosettierten T-Zellen gewonnen, die bei der Monozytenisolierung zurückbleiben. Die Schaferthozyten wurden hierfür mit NH_4Cl -haltigem Lysepuffer zerstört und die Zellen sofort in PBS gewaschen, um die T-Zellen nicht zu schädigen. Nach einem zweiten Waschschrift wurden die Zellen gezählt und in Aliquots à 20 Millionen Zellen in FCS/DMSO eingefroren.

2.4 Zytokin-ELISAs

Als erster Schritt der Untersuchung der Hormonwirkungen auf DC wurde die Zytokinproduktion der hormonstimulierten Zellen untersucht.

Die Zytokinmessungen erfolgten in Zellkulturüberständen, die am Tag 10 der Kultur entnommen, aliquotiert und bei -80°C eingefroren wurden. Insgesamt wurden Überstände von 10 gesunden Blutspendern gemessen, von denen 5 männlich und 5 weiblich waren.

Gemessen wurden die Zytokinspiegel von IL-12(p70), da dies die funktionelle Form des Zytokins darstellt, IL-18, IL-10 und die Chemokine IL-8 und macrophage derived chemokine (MDC). Die ELISAs wurden nach den Herstellerangaben etabliert und optimiert.

Vorgegangen wurde nach einem einheitlichen Schema:

Das Coating der Platten erfolgte am Abend vor dem Versuchstag: Für eine 96well-Platte wurden 10 ml Coatingpuffer mit der entsprechenden Antikörpermenge gemischt und je 100 μl pro well aufgetragen. Die Coating-Antikörper der OptEIA-Sets wurden in einer Verdünnung von 1:250 zugesetzt, die Platten mit Folie zugeklebt und über Nacht bei 4°C inkubiert. Für den IL-18- und MDC-ELISA wurden die Antikörper in der Konzentration 2 $\mu\text{g/ml}$ aufgetragen und die zugeklebten Platten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Nach Beendigung der Inkubation wurde die Coatinglösung entfernt und die Platten dreimal mit Waschpuffer gewaschen und auf Zellstoff trockengeklopft.

Anschließend erfolgte das 60-minütige Blocken der Platte, mit 200 µl Blocking-Puffer pro well. Nach drei Waschschrritten wurden je 100 µl der Standards und Proben aufgetragen. Die Ermittlung der optimalen Standardreihe erfolgte in vorausgehenden Optimierungsversuchen und lag im Bereich zwischen 2000 pg/ml und 0 pg/ml. Entsprechend mussten die Proben je nach erwartetem Gehalt am jeweiligen Zytokin verdünnt werden. Nach 2 h Inkubation und drei anschließenden Waschschrritten wurde der Detektions-Antikörper zugegeben: Im Fall der OptEIA-Sets 100 µl Antikörper plus Streptavidin-konjugierte Meerrettichperoxidase, beide jeweils in einer 1:250-Verdünnung. Mit dem Sekundär-Antikörper wurde für eine Stunde inkubiert.

Bei den IL-18 und MDC-ELISAs erfolgte die Zugabe von Antikörper und Peroxidase-Konjugat getrennt: Zunächst wurde der Detektions-Antikörper aufgetragen, für die MDC-ELISAs in einer Konzentration von 200 ng/ml, für die IL-18-Bestimmung in 250 ng/ml, wobei hier die Antikörperlösung 1 Stunde zuvor mit 2% hitze-inaktiviertem Ziegen Serum versetzt werden musste. Nach 2 h Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Platten dreimal gewaschen und anschließend 20 Minuten lang mit 100 µl Streptavidin-konjugierter Meerrettichperoxidase pro well versetzt. Die optimalen Verdünnungen für die Streptavidinlösung wurden in Vorversuchen ermittelt und lagen bei 1:8000 für den MDC- und den IL-18-ELISA.

Um das Messergebnis sichtbar zu machen, wurde nun nach drei (bzw. sieben bei den OptEIA-Sets) weiteren Waschschrritten je 100 µl Substrat zugegeben. Da das Substrat lichtempfindlich ist, musste die nun erfolgende enzymatische Reaktion im Dunkeln stattfinden. Nach der Unterbrechung der Reaktion nach 20 Minuten mit je 50 µl Stopplösung, konnte bei 450 nm die optische Dichte und damit die Zytokinmenge photometrisch bestimmt werden.

Die erhaltenen Daten wurden für valide erachtet, wenn die photometrisch gemessenen Werte mindestens zwei Standardabweichungen über dem Nullwert der Standardkurve lagen.

2.5 Mixed Lymphocyte Reaction (MLR)

Um einen Überblick über die Potenz der getesteten Hormone zur Beeinflussung der DC-abhängigen T-Zellproliferation zu bekommen, wurden Stimulationstests mit hormonbehandelten DC von drei verschiedenen Spendern durchgeführt.

Dazu wurden die ausgereiften und hormonstimulierten DC am Tag 10 geerntet und nach dem Umsetzen in 96 well-Platten 5 Tage lang mit allogenen T-Zellen kokultiviert. Die dendritischen Zellen wurden in Verdünnungen von 9×10^3 , 3×10^3 , 1×10^3 und 333 Zellen pro well vorgelegt, jeweils mit 9×10^4 allogenen T-Zellen versetzt und 5 Tage in 200 μ l RPMI 1640/10% FCS/Genta kultiviert. Um die Proliferationsraten zu bestimmen, wurde 16 h vor der Ernte der Zellen 1 μ Ci H^3 -markiertes Thymidin zugegeben und die eingebaute Radioaktivität nach der Zellernte mit einem Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt.

2.6 Durchflusszytometrie

Um ein vollständiges Bild vom Aktivierungszustand der Zellen zu erhalten, wurden ergänzend charakteristische Oberflächenmarker mit fluoreszenz-markierten Antikörpern angefärbt und im FACS untersucht. Die Färbung erfolgte mit direktmarkierten monoklonalen Antikörpern gegen die folgenden Oberflächenmarker: CD45, HLA-DR, CD86, CD40 und CD83. Zur Kontrolle wurden Isotyp-Färbungen mit FITC- und PE-markiertem IgG2mAb gemessen.

Die Zellfärbungen wurden in 96-well-Platten durchgeführt, in denen die Zellen als Pellet mit je 20 μ l Färbelösung gemischt und 30 Minuten bei 4°C inkubiert wurden. Anschließend wurden die Zellen in 200 μ l PBS gewaschen, bei 250 x g 10 min zentrifugiert, der Überstand abgeschüttet und die Platten auf Zellstoff trockengeklopft. Die Pellets wurden in 200 μ l PBS aufgenommen und in Plastik-Zytometrierröhrchen überführt. Bis zur Messung wurden die Zellen lichtgeschützt auf Eis gelagert. Gearbeitet wurde mit dem FACScan von Becton Dickinson mit CellQuest-Software. Die Messdaten wurden mit WinMDI-Software ausgewertet.

2.7 Statistische Auswertung

Die gemessenen Daten wurden mit dem Shapiro-Wilkins-Test auf Normalverteilung überprüft. Da die Messergebnisse nicht normalverteilt waren, musste die weitere statistische Auswertung der Daten mit einem nicht-parametrischen Test für gepaarte Proben erfolgen. Hierfür wurde der two-tailed Wilcoxon matched pair log rank test gewählt. Statistische Vergleiche wurden stets an den Rohdaten vorgenommen. Werte mit $p < 0.05$ wurden als statistisch signifikant betrachtet und mit * gekennzeichnet, Werte mit $p < 0.01$ wurden mit ** als hochsignifikant gekennzeichnet. Alle statistischen Auswertungen wurden mit dem Statistikprogramm Statistica Version 5.1 durchgeführt.

III. Ergebnisse

1. Charakterisierung der verwendeten DC

1.1 Zytokinprofil

Die Zytokinproduktion hormonstimulierter DC wurde mittels ELISA bestimmt. In Abbildung 5 sind exemplarisch die absoluten Spiegel der gemessenen Zytokine in unbehandelten reifen dendritischen Zellen (mDC) dargestellt.

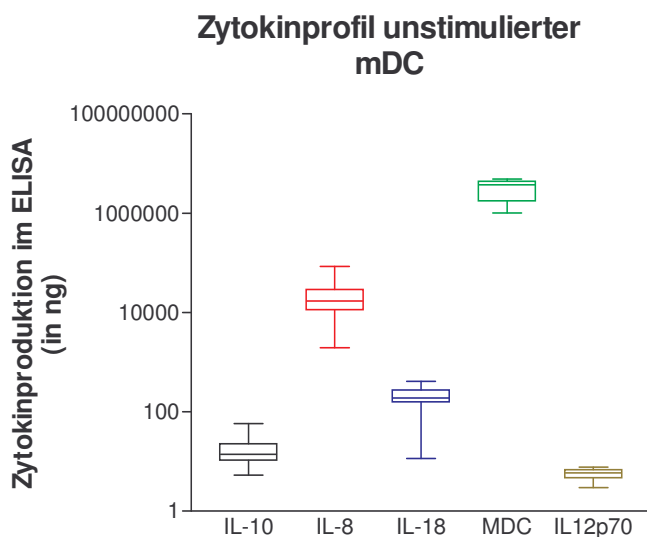


Abbildung 5:

Das Zytokinprofil *in vitro* generierter humaner dendritischer Zellen gemessen im ELISA in absoluten Werten in ng. Die Messwerte von circa 20 Isolaten verschiedener Spender werden als Box and Whisker Plots dargestellt. Wegen der starken Unterschiede in der Expression musste ein logarithmischer Maßstab gewählt werden.

Sehr hohe Spiegel wurden für MDC und IL-8 gemessen. Interleukin 10 und 18 waren in mittleren Werten nachweisbar. Für Interleukin 12p70 konnte nur eine sehr niedrige Produktion nachgewiesen werden.

Die mit dieser Methode quantitativ messbaren Zytokinspiegel zeigen sehr deutliche Unterschiede in der Konzentration der verschiedenen Zytokine,

Wie aus der Grafik ersichtlich sind die gemessenen Spiegel für IL-12p70 extrem niedrig. Eine genauere Überprüfung der Daten ergab, dass die Werte größtenteils nicht mindestens zwei Standardabweichungen über dem Nullwert der Standardkurve lagen. Damit konnten diese Werte im Rahmen der Messgenauigkeit der verwendeten Nachweismethode nicht als aussagekräftig betrachtet werden.

Änderungen der Zytokinspiegel wurden im folgenden in Beziehung zur jeweiligen Kontrolle gesetzt: d.h. mit einer Messung nach Stimulation mit der entsprechenden

Ethanolkonzentration oder mit der entsprechenden Menge Medium, falls das Hormon nicht in Ethanol gelöst war. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte der besseren Übersichtlichkeit wegen als prozentuale Veränderung der Zytokinspiegel gegenüber dem Kontrollwert.

1.2 Einfluss des Lösemittels Ethanol

Da die verwendeten Hormone Progesteron, β -Estradiol und β HCG nur in Ethanol löslich waren, musste der Einfluss der verwendeten Ethanolkonzentrationen auf die Funktion der DC untersucht werden.

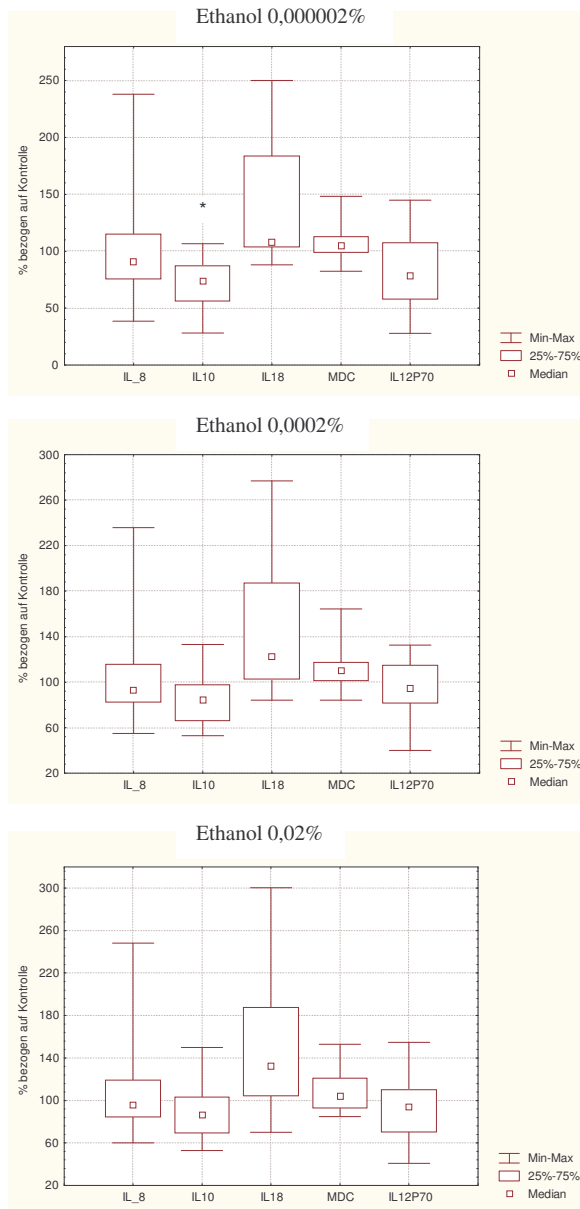


Abbildung 6: Veränderungen der Zytokinspiegel Ethanol-stimulierter mDC. Dargestellt sind die Änderungen in Prozent, verglichen mit dem entsprechenden Messwert eines unbehandelten Kontrollansatzes des selben Spenders. Die Ethanolkonzentrationen entsprechen den in den Hormonansätzen verwendeten Konzentrationen. Die Messwerte zeigen zwar Schwankungen, die aber nur in einem Fall signifikant sind.

In der Produktion von IL-8, IL-18, MDC und IL-12p70 der mDC zeigte sich in den ELISA-Messungen keine Veränderung des Zytokinprofils nach Stimulation der Zellen mit verschiedenen Ethanolkonzentrationen. Einzig bei Kultivierung mit Ethanol in der Konzentration 0,000002% (v/v) wurde eine signifikante Senkung der IL-10-Produktion beobachtet (siehe Abb. 6).

1.3 Untersuchung geschlechtsspezifischer Unterschiede

Für die Bestimmung der Zytokinproduktion dendritischer Zellen wurden die gleiche Anzahl an Zellisolaten weiblicher Spender, wie männlicher Spender getestet und getrennt ausgewertet. Der statistische Vergleich der Daten zeigte keine signifikanten Unterschiede in Zytokin- oder Chemokinproduktion zwischen Zellen weiblicher und Zellen männlicher Spender. Im folgenden wurden daraufhin die Daten der männlichen und weiblichen Spender zusammengefasst und gemeinsam statistisch ausgewertet.

2. Zytokinspiegel reifer mDC nach Hormonstimulation

2.1 IL-10

Bei der Stimulation von mDC mit Progesteron zeigte sich eine hoch signifikante Steigerung der IL-10-Sekretion sowohl bei Stimulation mit 0,1 ng/ml als auch mit 10 ng/ml Progesteron.

Die Stimulation der Zellen mit β HCG führte dagegen zu einer signifikanten Reduktion der IL-10-Produktion der mDC in allen drei getesteten Konzentrationen (10 mIE/ml, 50 mIE/ml, 250 mIE/ml) des Peptidhormons.

Bei der Kombination von β HCG und Progesteron ließ sich nur in der Konzentration von 0,1 ng/ml Progesteron und 50 mIE/ml β HCG ein signifikanter Anstieg der IL-10-Produktion nachweisen.

Die Messungen der IL-10-Konzentration nach Stimulation mit 17 β -Estradiol ergaben einzig nach der Stimulation mit 1000 ng/ml Estradiol eine signifikant gesteigerte Produktion von IL-10 in mDC, während die übrigen Konzentrationen keine signifikanten Effekte zeigten.

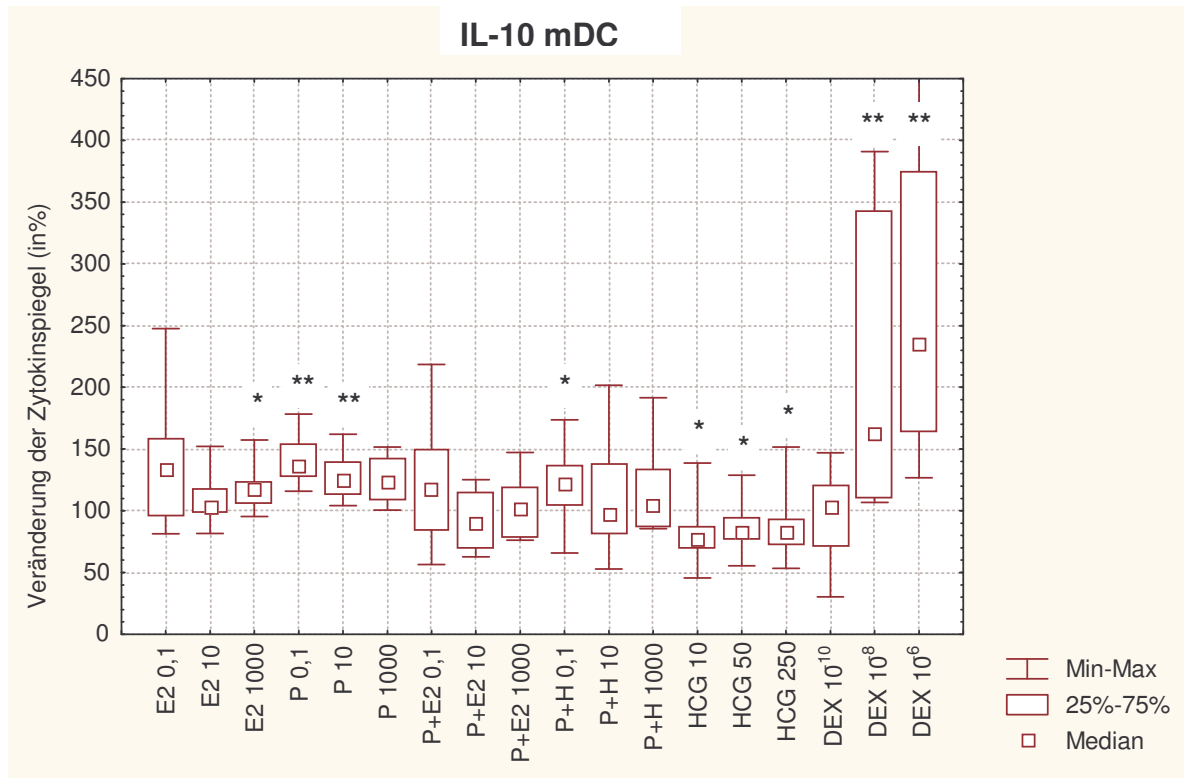


Abbildung 7:

Die IL-10-Produktion hormonbehandelter mDC, dargestellt als Box and Whisker Plots der prozentualen Veränderung der Zytokinspiegel im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle.

Sehr deutlich erkennbar war der Anstieg der IL-10-Spiegel in den Überständen Dexamethason-stimulierter mDC. Statistisch hoch signifikant war die Steigerung allerdings nur in den beiden höheren Konzentrationen 10⁻⁸ und 10⁻⁶ mol/l.

2.2 IL-18

In mDC ließ sich eine signifikante Senkung der IL-18-Sekretion der Zellen nach Stimulation mit einer Kombination aus Progesteron und β HCG nachweisen. Dieser

Effekt zeigte sich in allen 3 getesteten Kombinationen von Progesteron 0,1 ng/ml, 10 ng/ml und 1000 ng/ml mit jeweils 50 mIE/ml β HCG. Für die isolierten Wirkungen von Progesteron oder β HCG konnten keine signifikanten Veränderungen nachgewiesen werden.

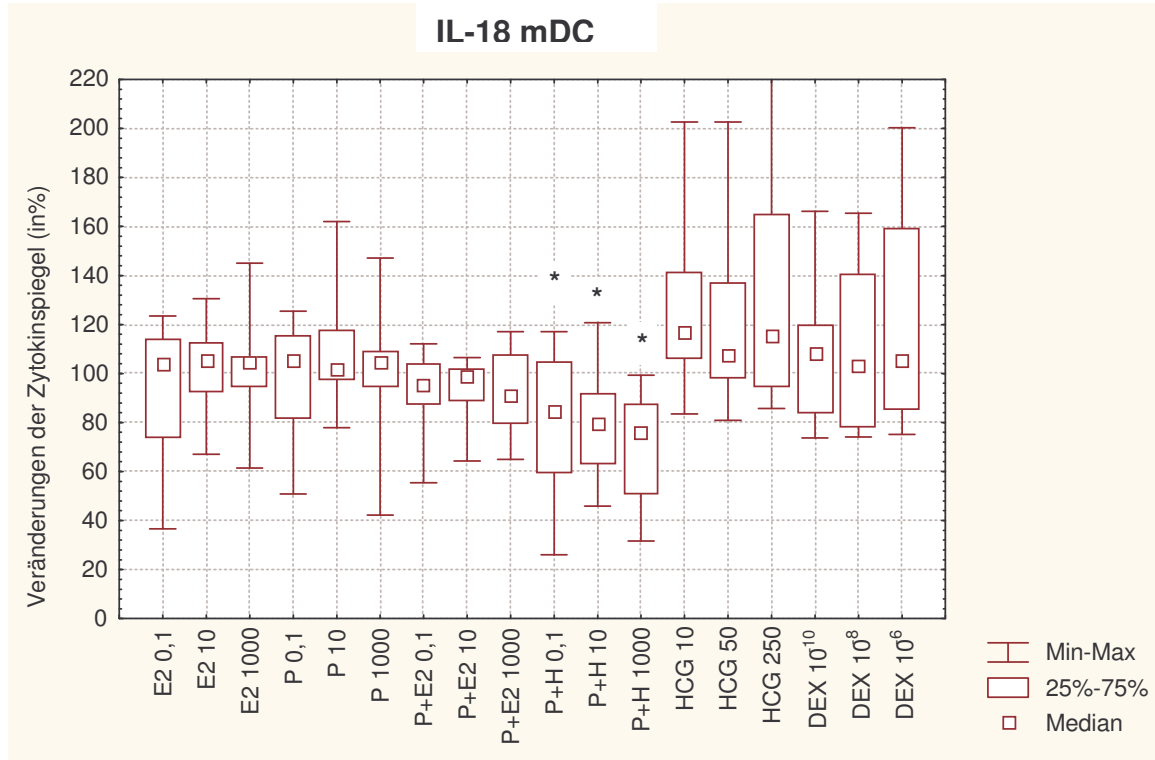


Abbildung 8:
prozentuale Veränderung der IL-18-Produktion hormonbehandelter mDC, dargestellt als Box and Whisker-Plots.

2.3 IL-8

IL-8 und MDC (macrophage derived chemokine) wurden als Vertreter der Chemokinfamilie auf eine hormonelle Beeinflussung untersucht. Einzig in einer Konzentration von 1000 ng/ml β -Estradiol zeigte sich eine Senkung der IL-8-Produktion, die anderen getesteten Hormone verändern die IL-8-Sekretion der mDC nicht signifikant.

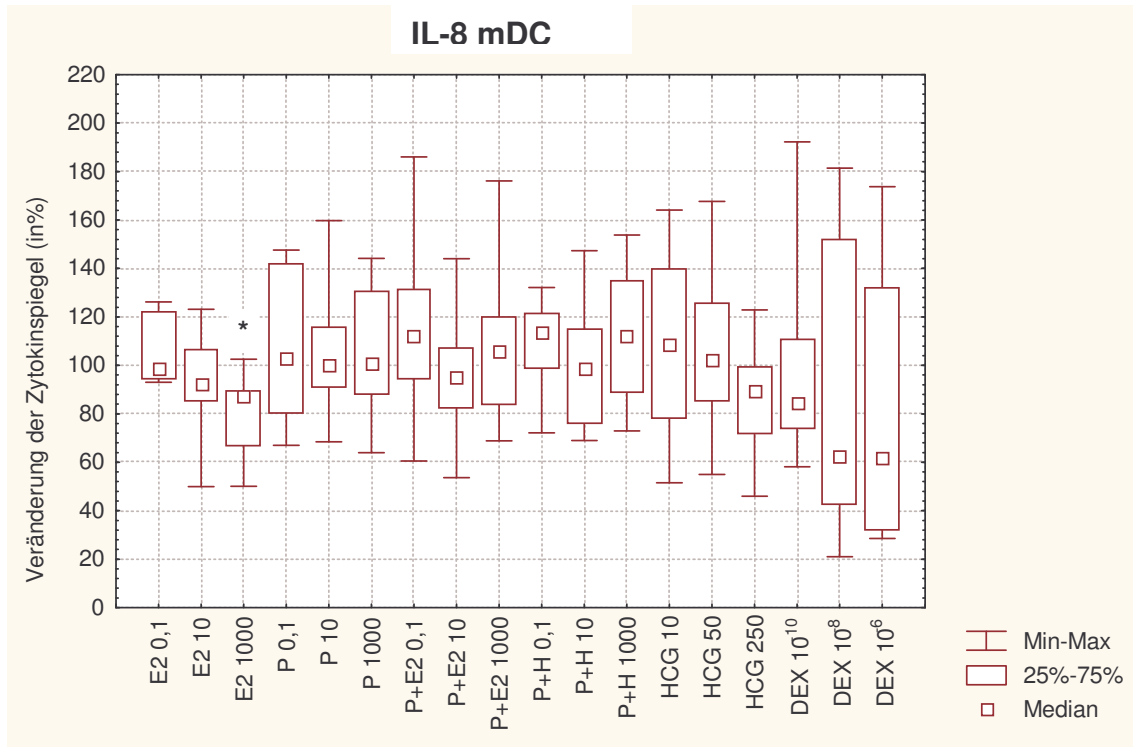


Abbildung 9:

Die IL-8-Produktion hormonbehandelter mDC, dargestellt als Box and Whisker Plots der prozentualen Veränderung der Zytokinspiegel im Vergleich zur jeweiligen unbehandelten Kontrolle

2.4 MDC

β HCG in einer Konzentration von 10 mIE/ml steigerte signifikant die MDC-Produktion in mDC. 10 ng/ml Estradiol senkten dagegen signifikant die Sekretion dieses Chemokins.

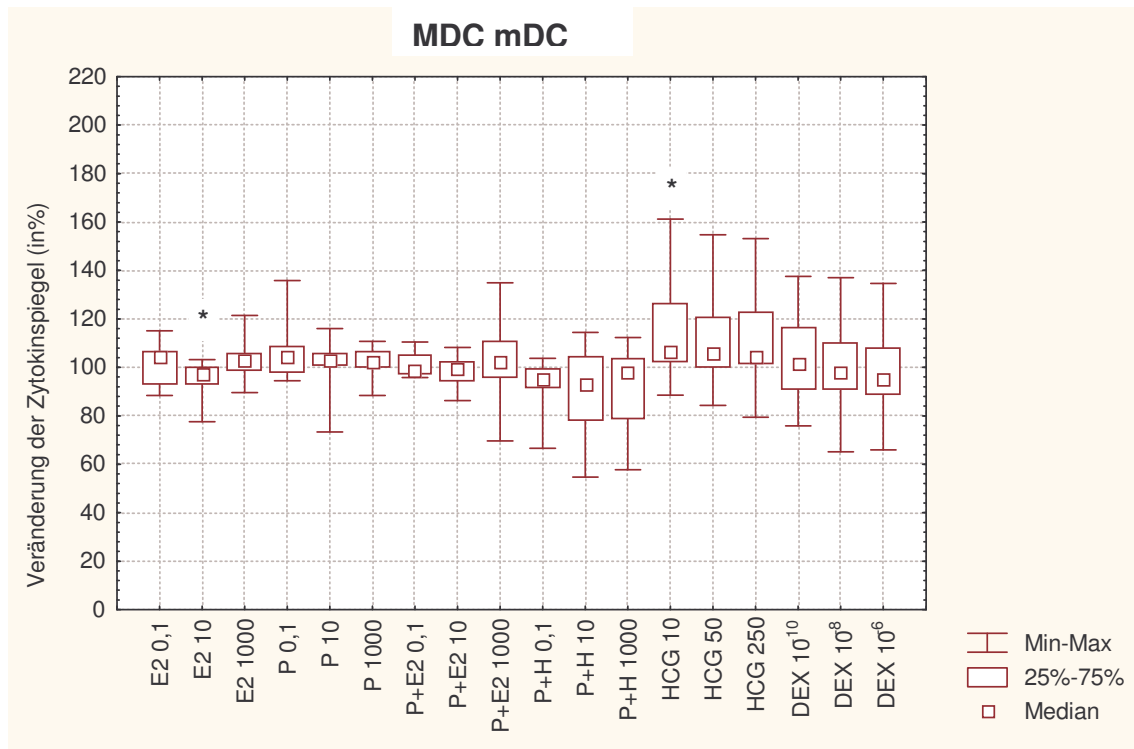


Abbildung 10:
prozentuale Veränderung der MDC-Produktion hormonbehandelter mDC, dargestellt als Box and Whisker-Plots

3. FACS-Messungen

3.1 Phänotypische Charakterisierung der DC im FACS

Mittels Durchflusszytometrie wurden Veränderungen des zellulären Phänotyps der DC erfasst. Ein Vergleich der in Medium mit GM-CSF und IL-4 kultivierten iDC mit den in Medium plus Reifungscocktail gereiften mDC bestätigte die Reinheit der Zellpopulationen und zeigte die erwarteten Änderungen in der Expression der Oberflächenmarker bei Reifung der DC. Unreife DC exprimierten die Oberflächenmarker HLA-DR, CD40 und CD86 nur schwach und waren nahezu ausschließlich CD83 negativ. Nach Reifung der DC konnte eine Steigerung der Expressionslevel von HLA-DR und CD40 festgestellt werden, die Expression des Reifungsmarkers CD83 und des Aktivierungsmarkers CD86 wurde deutlich hochreguliert.

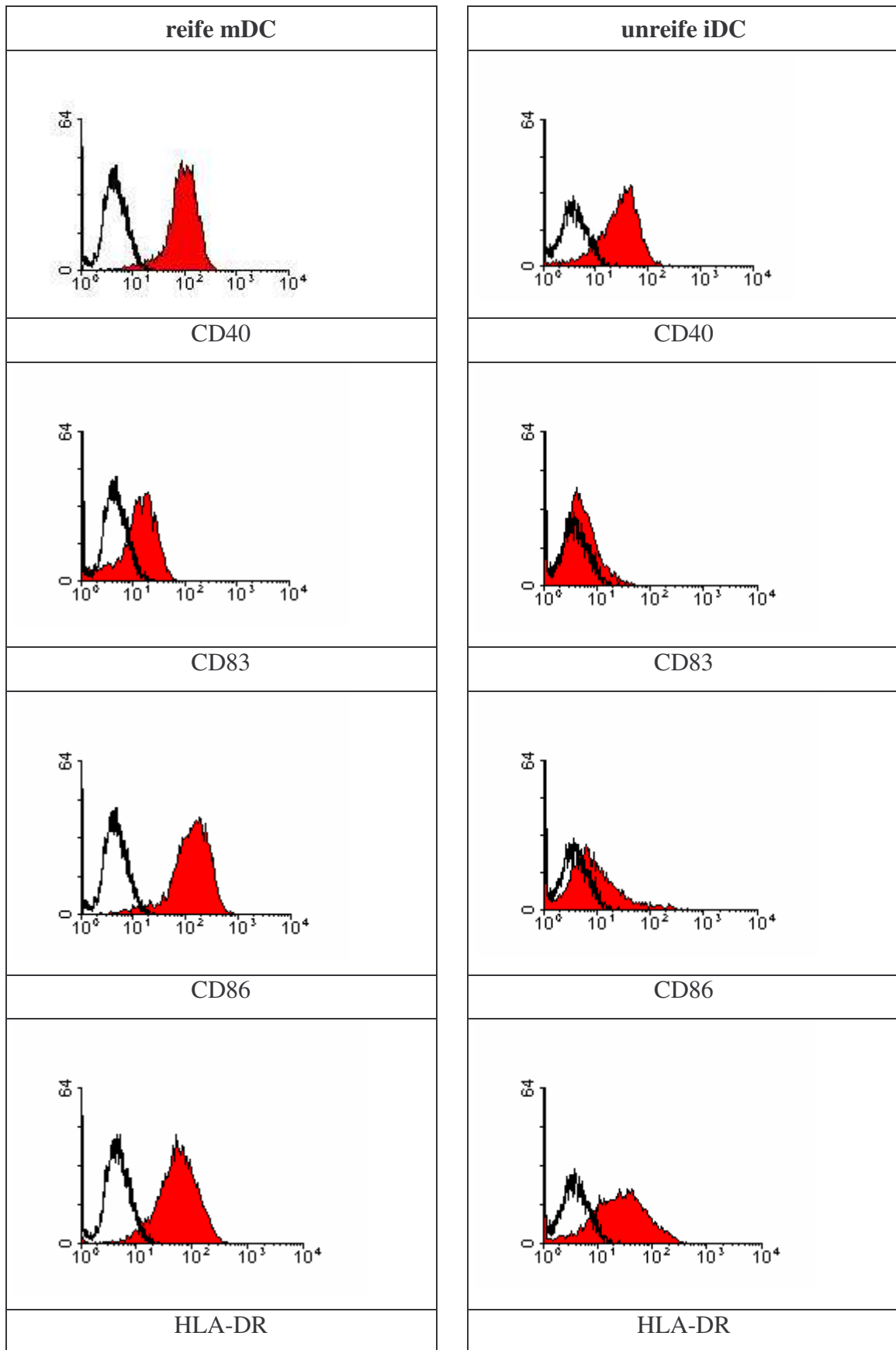


Abbildung 11:

Bestimmung der Oberflächenmarkerexpression unbehandelter mDC im FACS. Die Abbildung zeigt repräsentative Histogramme aus einem von drei unabhängigen Experimenten. Auf der X-Achse ist die Fluoreszenzintensität, auf der Y-Achse die Anzahl der Zellen mit der jeweiligen Intensität aufgetragen. In den Histogrammen werden die Fluoreszenzwerte im Vergleich zur jeweiligen Isotypkontrolle (unausgefüllte Fläche), die zur Abgrenzung zu unspezifischen Färbungen mitgeführt wird, dargestellt.

3.2 Einfluss des Lösemittels Ethanol auf die Oberflächenmarkerexpression

In Kontrollversuchen mit dem Lösungsmittel Ethanol zeigte sich keine wesentlich veränderte Oberflächenmarkerexpression und damit auch keine Hinweise auf eine signifikante Beeinflussung des Reifungszustandes der mDC.

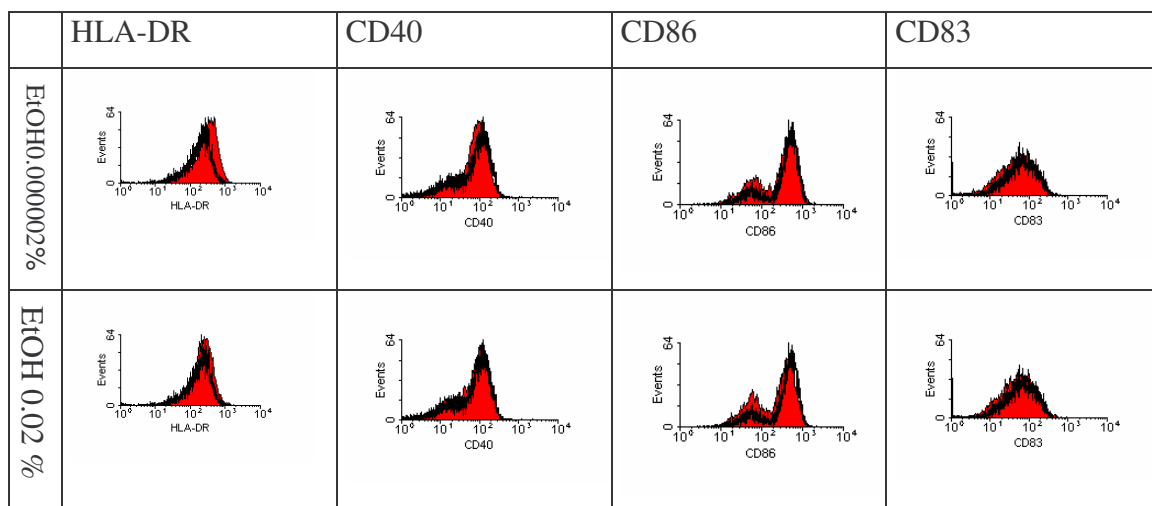


Abbildung 12:

Dargestellt sind die ethanolstimulierten Zellen (rote Fläche) im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollzellen des selben Probanden (schwarz umrandete, unausgefüllte Fläche).

3.3 Oberflächenmarkerexpression hormonstimulierter reifer DC

Der Vergleich der hormonstimulierten iDC mit reifen Kontroll-DC ergab keinen eindeutigen Einfluss der getesteten Konzentrationen von Progesteron, β -Estradiol und β HCG auf die Expression von CD40, CD86, CD83 und HLA-DR. Neben der

graphischen Darstellung in Histogrammen wurde zum Datenvergleich auch die „mean fluorescence intensity ratio“, also das Verhältnis der gemittelten Fluoreszenzintensität der Proben, zur mittleren Fluoreszenz des Kontrollantikörpers herangezogen. Tabelle 1 zeigt die so ermittelten Zahlenwerte und Standardabweichungen.

	CD40	CD83	CD86	HLA-DR
P 0,1 ng/ml	15,4 ± 11,4	9,6 ± 11,5	49,3 ± 53,5	37,1 ± 49,6
P1000 ng/ml	16,1 ± 11,4	8,0 ± 9,0	47,5 ± 49,5	43,0 ± 60,2
E2 0,1 ng/ml	15,8 ± 9,9	6,6 ± 7,1	39,3 ± 37,0	42,2 ± 55,1
E2 1000 ng/ml	15,7 ± 9,8	8,9 ± 8,2	44,7 ± 43,7	39,0 ± 48,1
βHCG 10 mIE/ml	14,4 ± 10,8	8,0 ± 9,0	41,1 ± 42,8	33,3 ± 48,2
βHCG 250 mIE/ml	15,5 ± 14,6	7,6 ± 7,5	49,5 ± 54,3	44,8 ± 53,1
P 0,1 ng/ml + E2 10 ng/ml	14,9 ± 15,9	10,6 ± 11,7	54,7 ± 59,1	43,4 ± 58,8
P 1000 ng/ml + E210 ng/ml	21,0 ± 23,3	12,0 ± 15,2	74,0 ± 93,9	43,0 ± 59,4
P 0,1 ng/ml + βHCG 50 mIE/ml	7,4 ± 6,8	5,5 ± 3,7	22,5 ± 12,0	18,3 ± 12,9
P 1000 ng/ml +βHCG 50 mIE/ml	15,8 ± 16,3	10,1 ± 11,6	56,8 ± 63,5	45,9 ± 68,3
Dexa 10 ⁻¹⁰ mol/l	7,7 ± 2,1	4,2 ± 2,7	19,2 ± 9,6	12,8 ± 6,4
Dexa10 ⁻⁶ mol/l	8,5 ± 3,0	2,6 ± 1,4	14,9 ± 5,7	26,8 ± 14,3
Ethanol 0,000002%	11,8 ± 4,7	6,1 ± 4,0	33,7 ± 24,0	23,0 ± 17,5
Ethanol 0,02%	21,4 ± 18,8	7,0 ± 6,8	32,1 ± 27,1	25,7 ± 21,4
Medium pur	14,5 ± 8,1	6,4 ± 5,8	34,5 ± 29,4	28,8 ± 25,6

Tabelle 1:

Mean fluorescence intensity ratios der FACS-Messungen zur Bestimmung der Oberflächenmarkerexpression. Dargestellt sind Mittelwerte und Standardabweichungen aus je 3 unabhängigen Experimenten.

Die Standardabweichungen sind sehr groß, allerdings ist dies bereits bei den Kontrollen mit reinem Medium der Fall. Insgesamt zeigt die Tabelle, dass in keinem Fall ein signifikanter Unterschied durch die Stimulation mit Hormonen erreicht werden kann.

In der Histogrammdarstellung der FACS-Daten, die die Daten anschaulicher darstellt, zeigt sich, was an den Zahlenwerten ablesbar ist: Dexamethason in der Konzentration 10^{-6} mol/l führte zu einer deutlichen Reifungsverzögerung der mDC mit wesentlich niedrigerer Expression des Reifungsmarkers CD83 und der kostimulatorischen Moleküle CD86 und CD40.

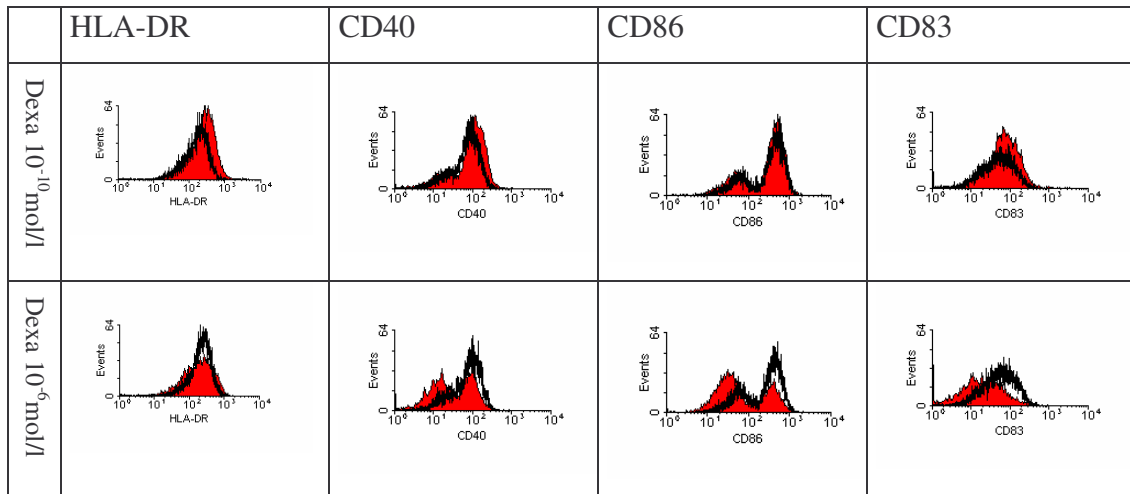


Abbildung 13:

FACS Messungen zur Oberflächenmarkerexpression Dexamethason-behandelter mDC dargestellt als Histogramme. Die hormonbehandelten Zellen werden in rot im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarze Linie) dargestellt.

Ähnliche, wenn auch schwächer ausgeprägte Effekte zeigte die Kombination aus 0,1 ng/ml Progesteron und 50 mIE/ml β HCG. Gut sichtbar war eine verminderte Expression der Oberflächenmarker CD86 und CD40, während sich für HLA-DR und CD83 keine Veränderungen beobachten ließen. Die zusätzlich getestete Kombination aus 50 mIE/ml β HCG und der höheren Progesteronkonzentration von 1000 ng/ml zeigte jedoch eine eher gegensätzliche Wirkung. Hier zeigte sich eine geringfügige Hochregulation der Aktivierungsparameter.

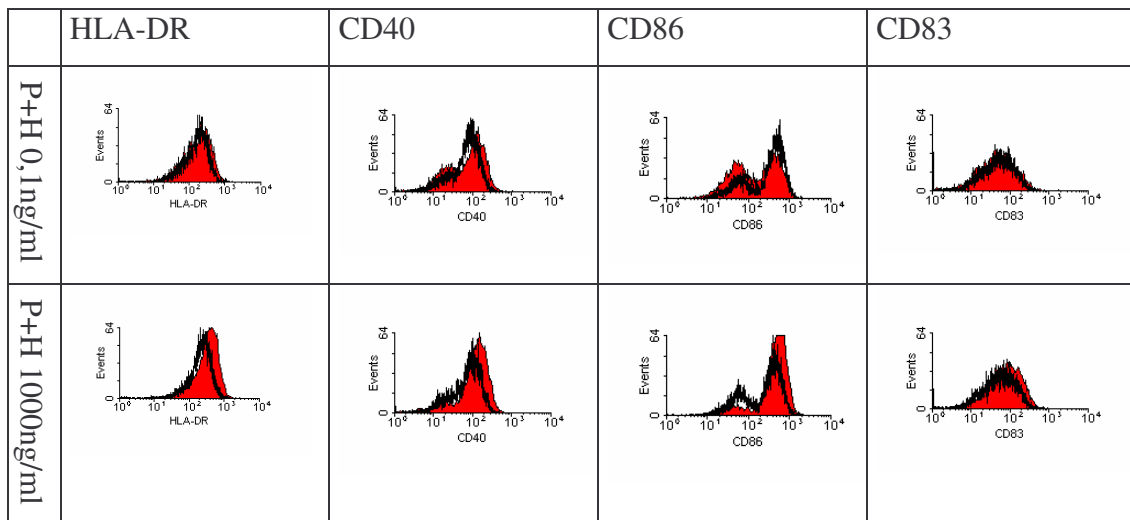


Abbildung 14:

Veränderung der Oberflächenmarkerexpression nach Stimulation der mDC mit 0,1 ng/ml Progesteron plus 50 mIE β HCG und 1000 ng/ml Progesteron plus 50 mIE β HCG. Die hormonbehandelten Zellen werden in rot im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle (schwarze Linie) dargestellt.

4. Mixed Lymphocyte Reaction

4.1 Vergleich der Stimulationskapazitäten reifer und unreifer DC

In den MLR-Ansätzen wurde die Fähigkeit der DC zur Stimulation allogener T-Zellen untersucht. Insgesamt lagen im Vergleich die Stimulationskapazitäten für reife mDC nur geringfügig über den Kapazitäten für iDC.

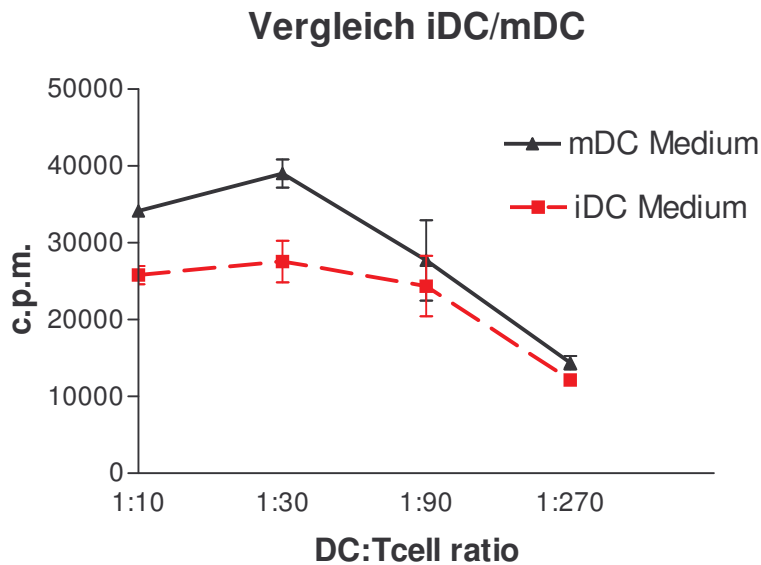


Abbildung 15:
 Vergleich zwischen unreifen DC und ausgereiften mDC; exemplarisch dargestellt ist ein repräsentatives Diagramm aus 3 Experimenten. Die Einzelexperimente setzen sich wiederum aus je 3 Ansätzen zusammen. Die Ergebnisse sind als Mittelwerte der gemessenen Radioaktivität (in counts per minute, c.p.m.) dargestellt, die Fehlerbalken geben die Standardabweichung zwischen den Experimenten wider

4.2 Einfluss des Lösemittels Ethanol auf die Stimulationskapazität

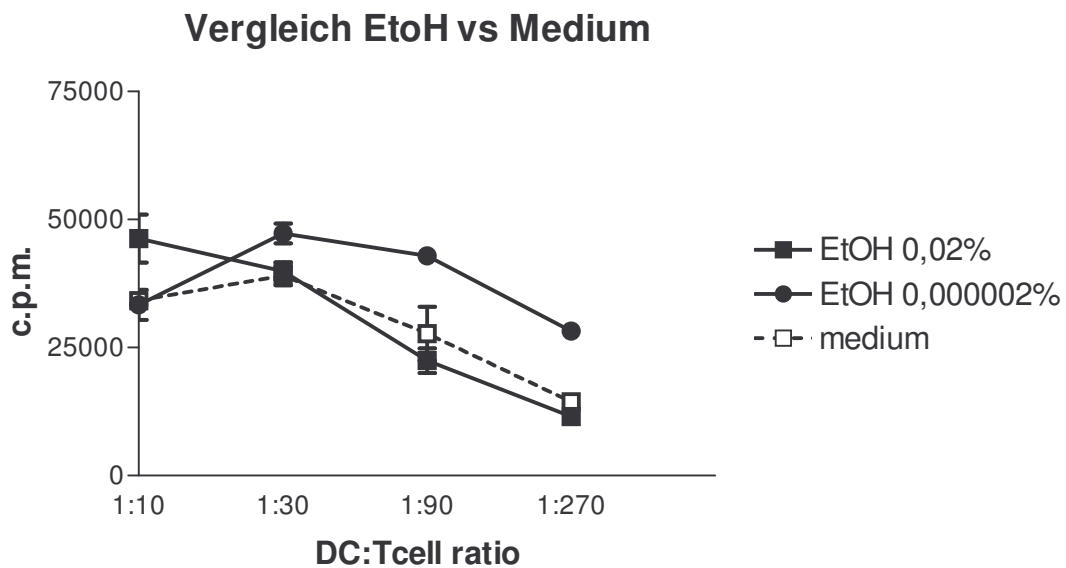


Abbildung 16:
 Ethanolbehandelte im Vergleich zu unbehandelten mDC

Mit Ethanol in zwei Konzentrationen stimulierte mDC wurden mit rein in Medium kultivierten MDC verglichen. Hier zeigte sich eine quasi identische Stimulationskapazität für die Konzentration 0,02% und die Kontrolle. Ethanol in der Konzentration 0,000002% zeigte dagegen eine leicht gesteigerte Stimulationskapazität.

4.3 Stimulationskapazität reifer DC

Der Vergleich der reifen DC ergab keine signifikanten Unterschiede zwischen mDC, die in Nährlösung mit Reifungscocktail plus Hormonen stimuliert wurden, und den Ansätzen, in denen zusätzlich Hormonzugaben zum Nährmedium erfolgt waren.

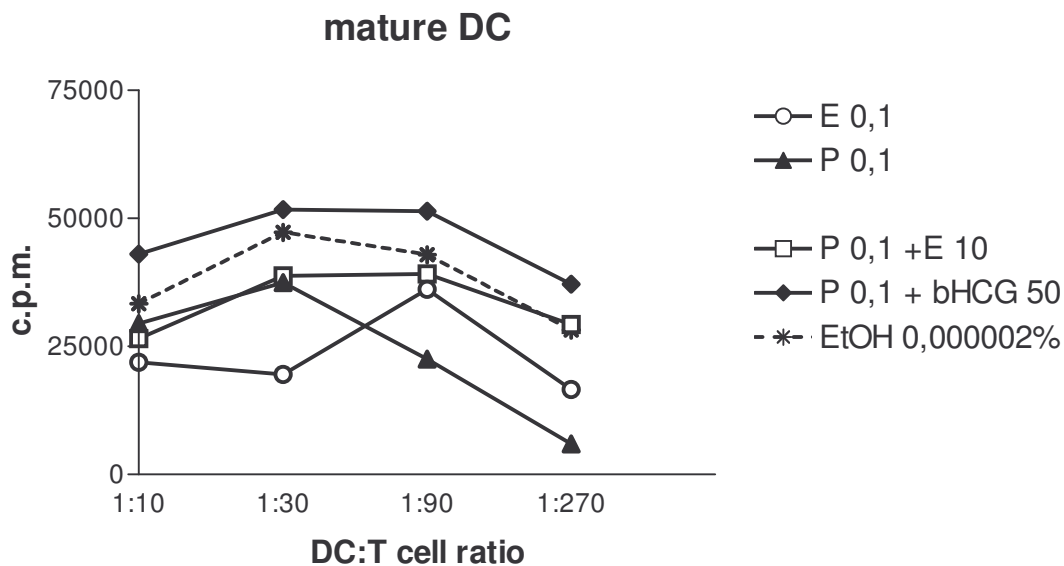


Abbildung 17:

mDC nach Stimulation mit Hormonen in niedriger Konzentration im Vergleich zu Kontrollansätzen, die mit der jeweils entsprechenden Konzentration des Lösemittels Ethanol versetzt wurden. Gesteigerte T-Zell-Proliferation zeigte sich in den Ansätzen mit 0,1 ng/ml Progesteron + 50 IE/ml β HCG behandelter mDC. Im Vergleich zur Kontrolle eher weniger Stimulationskapazität zeigten die mit 0,1 ng/ml β -Estradiol, 0,1 ng/ml Progesteron und der Kombination aus Progesteron und β -Estradiol behandelten mDC

Zwar zeigten sich tendenzielle Unterschiede zwischen den verschiedenen getesteten Hormonen, die auch in den zwei unterschiedlichen Konzentrationen stabil blieben, insgesamt muss aber festgestellt werden, dass die Steigerungsraten so gering waren, dass Sie nicht als signifikant anzusehen sind. (Möglicherweise liegt hier ein mangelnder

Stimulationseffekt der DC aufgrund technischer Probleme vor. T-Zellen der selben Charge, zeigten jedoch in anderen Experimenten ausreichende Stimulationswirkung (Daten nicht gezeigt)).

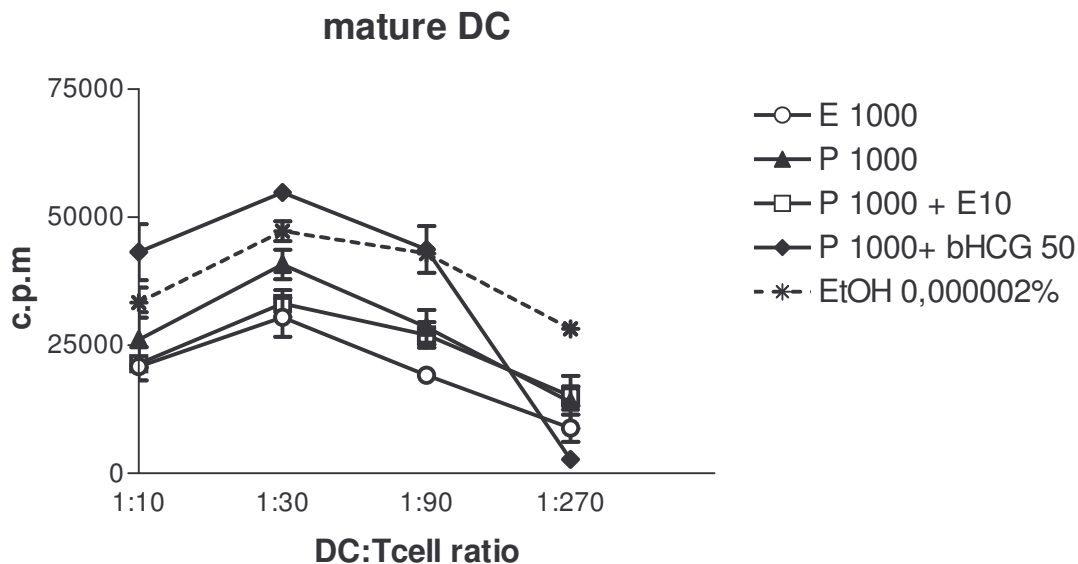


Abbildung 18:
mDC nach Stimulation mit Steroidhormonen in höherer Konzentration. Die Kombination aus 1000 ng/ml Progesteron und 50 IE/ml β HCG zeigte geringfügig bessere Stimulationkapazität als die übrigen getesteten Hormone. Insgesamt zeigten sich aber keine großen Unterschiede in der Stimulationkapazität.

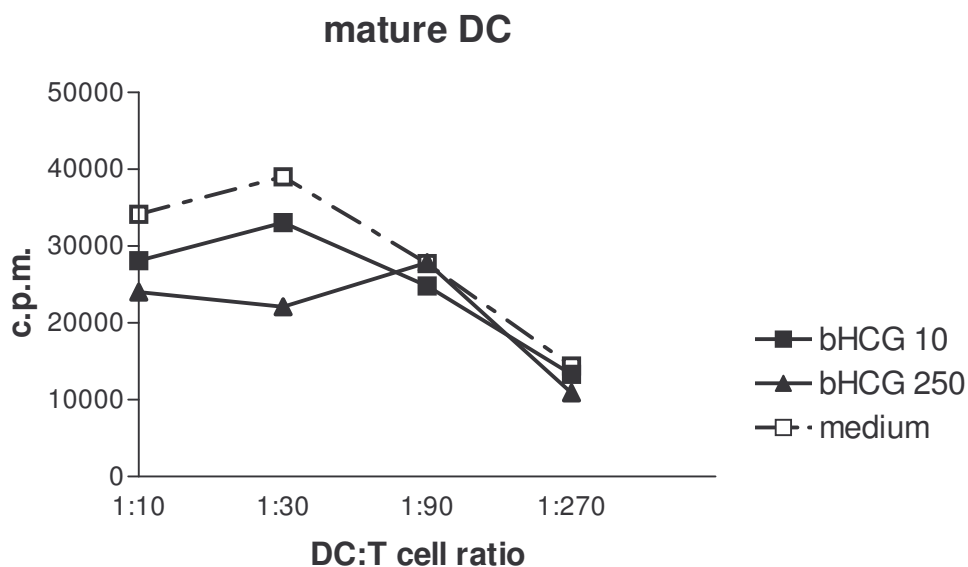


Abbildung 19:
In den getesteten Konzentrationen von 10 mIE/ml und 250 mIE/ml zeigte β HCG keinen signifikanten Einfluss auf die T-Zellstimulationskapazität von mDC

IV. Diskussion

1. Einflüsse auf das Modellsystem

Reifungszustand der DC

Zahlreiche Studien belegen den wichtigen Einfluss des Reifungszustands der DC auf ihre Funktion nicht nur in der Vermittlung von immunologischen Abwehrreaktionen, sondern auch in Bezug auf ihre tolerogene Wirkung. Erkenntnisse über den Reifungszustand lassen sich durch die Bestimmung der Oberflächenmarker und des Zytokinprofils gewinnen. Von den verschiedenen von DC gebildeten Zytokinen wird insbesondere IL-12 eine herausragende Rolle bei der Vermittlung inflammatorischer Immunantworten zugeschrieben. In dieser Arbeit wurde daher die aktive Form des IL-12, IL-12p70, gemessen. Betrachtet man jedoch das Zytokinprofil der in unserem System *in vitro* gereiften DC, so fallen die sehr niedrigen IL-12p70 Spiegel auf. Diese Beobachtung steht im Einklang mit zahlreichen Untersuchungen zur IL-12-Produktion bei aus Monozyten gereiften humanen DC. Erst nach Stimulation beispielsweise mit LPS, IFN γ oder CD40-Ligand werden hohe Spiegel der funktionellen Form des IL-12 gemessen (*Heufler et al., 1996; Saint-Vis et al., 1998*). Eine weitere mögliche Ursache für die niedrigen IL-12p70-Spiegel in der verwendeten Zellpopulation könnte der Zusatz von PGE₂ zum Reifungscocktail sein. PGE₂ ist im klassischen Reifungscocktail für die Differenzierung von DC aus Monozyten beschrieben (*Romani et al., 1996*) und wurde daher in der vorliegenden Arbeit verwendet. Es konnte jedoch zwischenzeitlich gezeigt werden, dass die Reifung der DC mit PGE₂ die Produktion inflammatorischer Zytokine in DC inhibiert (*Kalinski et al., 2001*). Eine weitere Möglichkeit für die beobachtete niedrigen IL-12p70-Konzentrationen in den Zellkulturüberständen besteht darin, dass es sich bei der verwendeten Zellpopulation der mDC um nicht restlos ausgereifte Zellen handeln könnte (*Mosca et al. 2000*).

Betrachtet man jedoch in diesem Zusammenhang die FACS-Daten genauer, so zeigt sich im direkten Vergleich der Zellpopulationen von iDC und mDC eine deutliche Hochregulierung der Aktivierungsmarker CD86, CD40 und HLA-DR und ein signifikanter Nachweis des Reifungsmarkers CD83 bei den mit Reifungscocktail kultivierten, ausgereiften mDC. Die in der vorliegenden Arbeit eingesetzten Zellen

erscheinen also unter diesem Aspekt zweifelsfrei ausgereift. Zieht man zusätzlich die Ergebnisse der MLR zu Rate, zeigen sich zwar insgesamt nur mäßige Stimulationskapazitäten, die Kapazitäten der mDC liegen jedoch erwartungsgemäß über denen der iDC. Die mDC zeigen also sowohl den Phänotyp als auch die funktionellen Eigenschaften ausgereifter Zellen. Insgesamt erscheint es also sehr unwahrscheinlich, dass hierdurch die Experimente zur Hormonwirkung wesentlich beeinflusst werden.

Einfluss des Lösemittels Ethanol

Ausführlich untersucht wurde auch der mögliche Einfluss des Lösemittels Ethanol auf die Versuche. In den mit zahlreichen Probanden (n(10) durchgeführten quantitativen Zytokinmessungen konnte im statistischen Vergleich der Daten kein Einfluss des Lösemittels nachgewiesen werden, der die ohnehin starke interindividuelle Streuung der Daten eindeutig überwog. In den qualitativen Messergebnissen von MLR und FACS können möglicherweise geringfügige Einflüsse der Ethanolkonzentration 0,000002% gesehen werden. Da insbesondere in der MLR alle Datenpunkte in einem sehr engen Bereich liegen, ist eine diesbezügliche Interpretation jedoch nicht als objektiv anzusehen.

Darüber hinaus zeigt sich auch keine konsistente Beeinflussung der weiteren Versuchsergebnisse, das heißt auch Vergleiche zwischen den ethanolhaltigen Hormonansätzen mit Progesteron, β -Estradiol und Dexamethason und den ethanolfreien Ansätzen mit β HCG zeigen keine eindeutigen Tendenzen. Um aber ganz sicher etwaige Einflüsse des Lösemittels auszuschließen, wurden stets Ethanolkontrollen in allen Versuchsreihen mitgeführt und die Ergebnisse der einzelnen Messungen unter Hormoneinfluss, auf die entsprechende Kontrolle bezogen.

2. Einfluss von Progesteron auf Phänotyp und Funktion der DC

Von allen getesteten Hormonen zeigte Progesteron die deutlichste Wirkung auf die DC. Zwar zeigten sich weder in FACS noch MLR signifikante Effekte, die Zytokinproduktion jedoch wird durch das Steroidhormon offensichtlich wesentlich beeinflusst.

In mDC induzierte Progesteron einen hochsignifikanten Anstieg des Th2-Zytokins IL-10. Dieser Effekt war in allen drei getesteten Konzentrationen signifikant nachweisbar und könnte auf eine Beteiligung des Hormons an einer Toleranzinduktion während der Schwangerschaft hinweisen. Die Sekretion des Th2-Zytokins IL-10 spielt eine besondere Rolle, da gezeigt werden konnte, dass IL-10 nicht nur T-Zellantworten sondern auch antigenpräsentierende Zellen in Richtung einer Toleranz beeinflusst (Steinbrink *et al.*, 1997). Mit IL-10 vorbehandelte DC zeigten eine Inhibition der Produktion inflammatorischer Zytokine, eine verhinderte Ausreifung und Hochregulierung von MHC II und kostimulatorischer Oberflächenmarker (Jonuleit *et al.*, 2001). Aber auch die Entwicklung von Antigen-spezifischen anergischen T-Zellen konnte nach Stimulation mit IL-10 behandelten DC gezeigt werden (Steinbrink *et al.*, 1999). Die meisten bisher durchgeführten Untersuchungen betonen hier die Rolle unreifer iDC, vor kurzem jedoch konnte die Produktion von IL-10 und die Stimulation zur Entwicklung CD4+ regulatorischer T-Zellen auch für phänotypisch reife DC aus Lungengewebe gezeigt werden (Akbari *et al.*, 2001).

Die in dieser Arbeit gezeigte Wirkung von Progesteron steht im Einklang mit Beobachtungen an Antigen-stimulierten humanen PBMC. Hier konnte nach einer Behandlung mit Progesteron ein signifikanter Anstieg des Th2-Zytokins IL-4 gezeigt werden. (Hamano *et al.*, 1998). Aber auch zahlreiche Beobachtungen am Mausmodell stützen die These, dass Progesteron möglicherweise entscheidend zum Shift des Zytokinprofils an der fetomaternalen Grenzzone beiträgt.

So konnten Miyaura und Mitarbeiter zeigen, dass Progesteron direkt auf T-Zell-Ebene eine Differenzierung in Richtung des Th2-Zelltyps und die Produktion von IL-10 induziert, während Th1- Entwicklung und IFN γ Produktion gehemmt werden (Miyaura & Iwata, 2002). Auch in T-Zelllinien konnte die Entwicklung einer Th2-Antwort, charakterisiert durch die Produktion von IL-4 und IL-5, nach Stimulation mit Progesteron in Konzentrationen > 200 ng/ml beobachtet werden (Piccini *et al.*, 1995). In vivo-Experimente zeigten eine deutliche Steigerung der IL-4-Produktion nach subkutaner Implantation von Progesteronpellets in Mäusen (Moro *et al.*, 2001).

Postuliert man nun aber einen entscheidenden Einfluss des Progesterons auf dendritische Zellen, so muss der Tatsache Rechnung getragen werden, dass bisher keine Progesteronrezeptoren in Makrophagen (Hunt *et al.*, 1997) oder DC identifiziert werden

konnten. Eine sehr wahrscheinliche Erklärung für die dennoch zu beobachtende Wirkung von Progesteron auf DC ist die bekannte signifikante Kreuzreaktivität zwischen Progesteron und Glukokortikoidrezeptoren (*Kontula et al., 1983*).

3. Einfluss von Dexamethason auf Phänotyp und Funktion der DC

Dexamethason zeigt in den Zytokinmessungen, wie auch Progesteron, eine signifikante Steigerung von IL-10, während die anderen Zytokine im wesentlichen unbeeinflusst bleiben. In der MLR wird keine Abschwächung der Proliferationsrate beobachtet. Im FACS lässt sich dagegen eine deutliche Herunterregulierung der Reifungs- und Aktivierungsmarker CD83, CD86 und CD40 feststellen. Dies bestätigt die Ergebnisse mehrerer Autoren, die unter dem Einfluss von Kortikosteroiden eine Reifungsverzögerung bei DC beobachten. Diese DC zeigen einen unreifen Phänotyp und sind nicht in der Lage, effektive Th1-Antworten zu induzieren (*Matyszak et al., 2000; de Jong et al., 1999; Canning et al., 2000*).

4. Einfluss von β -Estradiol auf Phänotyp und Funktion der DC

Bei nichtschwangeren Frauen erreichen die 17β -Estradiol-Spiegel im Serum maximale Werte von 0,3 ng/ml zum Zeitpunkt der Ovulation. Diese können während der Spätschwangerschaft auf Werte von 10 ng/ml ansteigen. In unserem in vitro-System konnten weder für die dem normalen Zyklus entsprechende Konzentration von 0,1 ng/ml noch für die der Spätschwangerschaft entsprechenden 10 ng/ml 17β -Estradiol signifikante Effekte nachgewiesen werden. Einzig in der supraphysiologischen Konzentration von 1000 ng/ml zeigte sich eine Steigerung der IL-10-Produktion in mDC. Jedoch wurden auch hier weder die Expression der Oberflächenmarker noch die Stimulationskapazität der T-Zellen signifikant beeinflusst. In Einklang mit diesen Beobachtungen steht die in der Literatur beschriebene Dosisabhängigkeit der immunmodulatorischen Wirkung von Östrogenen. In niedrigen physiologischen Dosen scheinen Östrogene Immunantworten eher zu stimulieren (*Cutolo et al., 1995; Maret et*

al., 2003), während hohe Dosen, wie sie beispielsweise während der Schwangerschaft vorkommen können, eher immunsuppressiv wirken (*Gilmore et al.*, 1997). Untersuchungen über die Östrogenwirkung auf DC, die an Mausmodellen durchgeführt wurden, zeigen eine signifikante Senkung der proinflammatorischen Zytokine TNF α und IFN γ , während die Produktion von IL-10 unverändert bleibt. Diese immunsuppressiven Wirkungen des Hormons 17 β -Estradiol werden ergänzt durch eine signifikante Verminderung der Antigenpräsentation und damit der stark reduzierten Fähigkeit zur T-Zellstimulation. Eine Modifikation der Oberflächenmarker durch Östrogene ließ sich jedoch auch in dieser Arbeit nicht zeigen (*Liu et al.*, 2002).

Die Mechanismen der Immunmodulation durch Östrogene sind zahlreich und umfassen sowohl Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren zentraler Bedeutung wie NF κ B und AP-1 (*McMurray et al.*, 2001) als auch Einflüsse auf die Expression von Genen, die an der Steuerung der Apoptose beteiligt sind (*Cutolo et al.*, 1995). Aufgrund der vielfältigen Wirkmechanismen sowie der Dosisabhängigkeit der Östrogenwirkung weichen die bisher veröffentlichten Daten in vielen Punkten voneinander ab (*Hamano et al.* 1998; *Piccini et al.*, 1995; *McMurray et al.*, 2001), was sich zumindest teilweise auch durch die sehr unterschiedlichen Untersuchungsbedingungen erklären lässt. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass die immunmodulatorische Wirkung von Östrogenen in hohem Maße von Zelltyp und Hormondosis abhängig zu sein scheint.

Neben dem direkten Einfluss auf den Ablauf von Immunantworten ist für Östrogene auch eine Beeinflussung der chemotaktisch induzierten Einwanderung von Immunzellen in Zielgewebe beschrieben. Gezeigt werden konnte dies bereits für die Einwanderung von Makrophagen in den Uterus, die höchstwahrscheinlich durch Estradiol gesteuert wird (*Hunt et al.*, 1998; *Wira & Rossoll*, 1995). Für die in dieser Arbeit untersuchten Chemokine IL-8 und MDC konnten gegensätzliche Regulationsmuster gezeigt werden. Während auf der einen Seite die IL-8-Produktion bei Stimulation mit 1000 ng/ml Estradiol signifikant gesenkt wird, und damit die postulierte Immunsuppression hoher Östrogendosen stützt, wird MDC bei Östrogenstimulation in der Konzentration 10 ng/ml signifikant gesenkt. Entscheidend ist hier möglicherweise die Sonderrolle des Chemokins MDC, da es selektiv Th2-polarisierte T-Zellen, insbesondere CCR4-exprimierende Gedächtniszellen (*Hartgers et al.*, 2000), anlockt und für die Regulation von Th2-Immunantworten verantwortlich zu sein scheint (*Mantovani et al.*, 2000).

Kombinationen der Steroidhormone Progesteron und Estradiol wurden in drei verschiedenen Dosen getestet. Weder in der Dosierung von 0,1 ng/ml Progesteron und 10 ng/ml Estradiol, was ungefähr den Hormonspiegeln während der Follikulären Phase des Menstruationszyklus entspricht, noch in der Konzentration von 10 ng/ml Progesteron und 10 ng/ml Estradiol, entsprechend der Lutealphase des weiblichen Zykluses, konnten signifikante Effekte auf mDC beobachtet werden. Auch in der ergänzend untersuchten, als supraphysiologisch anzusehenden Konzentration von 1000 ng/ml Progesteron mit 10 ng/ml Estradiol konnten keine signifikanten Einflüsse auf Dendritische Zellen gezeigt werden.

5. Einfluss von β HCG auf Phänotyp und Funktion der DC

β HCG wird normalerweise ausschließlich während der Schwangerschaft in Konzentrationen von bis zu 150 mIE/ml im Serum gemessen. In dieser Arbeit zeigt β HCG eine signifikante Senkung der IL-10-Produktion der mDC in allen drei getesteten Konzentrationen. Diese Ergebnisse werden von neuen Untersuchungen zu Wirkung von β HCG in der Schwangerschaft bestätigt (*Yoshimura et al., 2003*). Eindeutige Hinweise auf eine verstärkte proinflammatorische Aktivität konnten aber weder in der MLR noch in der FACS-Analyse der Oberflächenmarker gewonnen werden.

Ältere Studien berichten dagegen vom antiinflammatorischen Einfluss des Peptidhormons in einem Mausmodell der Arthritis mit Senkung der Produktion von Zytokinen wie IL-1 β , IL-6 und TNF α (*Song et al., 2000*). Auch in PBMC wurden inhibitorische Effekte auf die IL-2-Produktion und die IL-2-Rezeptorexpression beobachtet (*Komorowski et al., 1997*). β HCG scheint also insbesondere in der Frühphase der Schwangerschaft durchaus wichtige Funktionen in der Feinregulation der Immunantwort zu übernehmen (*Alexander et al., 1998*). Der genaue Einfluss, den β HCG auf die einzelnen Zellpopulationen der fetomaternalen Grenzzone ausübt, muss jedoch erst in weiteren Untersuchungen ermittelt werden. Indirekt ist die β HCG-Sekretion darüber hinaus über den Erhalt des Corpus luteums an der Aufrechterhaltung

der Progesteronsekretion und damit an der immunsuppressiven Wirkung des Progesterons beteiligt.

Die getesteten Kombinationen von β HCG und Progesteron entsprechen ungefähr dem tatsächlich während der Schwangerschaft vorliegenden hormonalen Milieu. Hier scheint sich die immunsuppressive Wirkung des Progesterons deutlich gegen die proinflammatorische Einzelwirkung des β HCG durchzusetzen. Eine signifikante Senkung der IL-18-Produktion in allen untersuchten Hormonkonzentrationen zeigt gemeinsam mit der - allerdings nur in einer Konzentration statistisch signifikanten - Steigerung des IL-10 einen möglichen Richtungswechsel des Zytokinmilieus mit Steigerung der Th2- und Senkung der Th1-Zytokine an. Die biologische Wirkung des IL-18 scheint insbesondere in einer IL-12-abhängigen Aktivierung des Th1-Systems zu bestehen, wobei IL-18 die IFN γ Produktion in aktivierten T-Zellen induzieren kann (Stoll *et al.*, 1998). Die Untersuchung des zellulären Phänotyps zeigt nach Stimulation mit 0,1 ng/ml Progesteron und 50 mIE/ml β HCG eine leichte, wenn auch nicht als signifikant zu wertende Senkung der Aktivierungsmarker CD40 und CD86.

Wesentlich für das Verständnis endokriner Einflüsse auf das Immunsystem der fetomaternalen Grenzzone ist also möglicherweise nicht nur die Berücksichtigung von Einzeleffekten, sondern das Zusammenspiel verschiedener Hormone zu den verschiedenen Zeitpunkten der Schwangerschaft.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen, dass möglicherweise Progesteron entscheidend zur Ausbildung eines Immuntoleranz auslösenden Phänotyps dendritischer Zellen beiträgt. Inwieweit hier ein möglicher Schlüsselmechanismus zur Toleranzinduktion in der Schwangerschaft vorliegt, werden künftige Untersuchungen zeigen müssen.

V. Zusammenfassung

Dendritische Zellen spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation von Immunantworten. Neuere Forschungsergebnisse zeigen, wie vielfältig diese außergewöhnliche Zellpopulation die Richtung einer Immunantwort beeinflussen kann. So stellen DC nicht nur die wohl wichtigsten antigenpräsentierenden Zellen dar und induzieren hocheffektive inflammatorische Immunantworten, sondern spielen auch eine entscheidende Rolle bei der Vermittlung immunologischer Toleranz.

Die Entdeckung dendritischer Zellen in menschlicher Dezipua wirft die Frage nach der Beteiligung der DC an den immunologischen Vorgängen an der fetomaternalen Grenzzone auf. Trotz der großen Zahl an Untersuchungen konnte bis heute nicht abschließend geklärt werden, welche Mechanismen zur immunologischen Akzeptanz des Feten durch das mütterliche Immunsystem beitragen. Während der Schwangerschaft finden sich neben den veränderten Spiegeln für Progesteron, β -Estradiol, β HCG und weiteren Hormonen auch wesentliche Veränderungen im Zytokinmilieu des uterinen Gewebes. Für einige Zellpopulationen sind Interaktionen zwischen dem Immunsystem und dem endokrinen System bereits nachgewiesen - für DC lag bisher jedoch noch keine systematische Untersuchung vor. Im Rahmen dieser Arbeit sollte die Wirkung schwangerschaftsassoziierter Hormone auf humane DC gezeigt werden. Als Modellsystem wurden *in vitro* aus Monozyten des peripheren Blutes differenzierte DC gewählt. Ausgereifte DC (mDC) wurden mit verschiedenen Konzentrationen von Progesteron, 17β -Estradiol, β HCG und Dexamethason behandelt. Untersucht wurden Veränderungen der Zytokinspiegel in den Zellkulturüberständen mittels ELISA. Die Veränderung der Oberflächenmarkerexpression wurde durchflusszytometrisch im FACS gemessen und Veränderungen der T-Zellstimulationskapazität in Stimulationsversuchen (MLR) gemessen.

Die Messungen zeigten deutliche Veränderungen der Zytokinspiegel nach Stimulation der Zellen mit schwangerschaftsassozierten Hormonen. Dagegen bestätigte die Untersuchung der Oberflächenmarkerexpression im FACS zwar den ausdifferenzierten Phänotyp der DC, konnte ansonsten aber nur für mit Dexamethason behandelte DC signifikante Veränderungen der Reifungs- und Aktivierungsmarker zeigen. Die T-Zellstimulationsassays zeigten keine wesentliche Beeinflussung der DC durch

schwangerschaftsassoziierte Hormone. Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass eine endokrine Beeinflussung der reifen dendritischen Zellen durchaus stattfindet, eine wesentliche Wirkung allerdings nur auf die Zytokinexpression dendritischer Zellen nachweisbar ist. Signifikant sind hier die verminderte Produktion inflammatorischer Th1-Zytokine und hochsignifikante Steigerung der IL-10-Sekretion nach Behandlung der Zellen mit Dexamethason und Progesteron, insbesondere in der Kombination von Progesteron mit β HCG. Die für den Erhalt der Schwangerschaft entscheidenden Veränderungen des Zytokinmilieus an der fetomaternalen Grenzzone mit erniedrigten Th1- und erhöhten Th2-Zytokinspiegeln könnten also durch die veränderte Zytokinproduktion der DC mitbestimmt werden.

VI. Literaturverzeichnis

- (1) Akbari O, DeKruyff RH, Umetsu DT. Pulmonary dendritic cells producing IL-10 mediate tolerance induced by respiratory exposure to antigen. *Nat Immunol* 2001; 2(8):725-731.
- (2) Alexander H, Zimmermann G, Lehmann M, Pfeiffer R, Schone E, Leiblein S, Ziegert M. HCG secretion by peripheral mononuclear cells during pregnancy. *Domest Anim Endocrinol* 1998; 15(5):377-387.
- (3) Banchereau J, Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* 1998; 392(6673):245-252.
- (4) 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.
- (5) Canning MO, Grotenhuis K, de Wit HJ, Drexhage HA. Opposing effects of dehydroepiandrosterone and dexamethasone on the generation of monocyte-derived dendritic cells. *Eur J Endocrinol* 2000; 143(5):687-695.
- (6) Canning MO, Grotenhuis K, de Wit H, Ruwhof C, Drexhage HA. 1-alpha,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25(OH)(2)D(3)) hampers the maturation of fully active immature dendritic cells from monocytes. *Eur J Endocrinol* 2001; 145(3):351-357.
- (7) Cutolo M, Sulli A, Seriola B, Accardo S, Masi AT. Estrogens, the immune response and autoimmunity. *Clin Exp Rheumatol* 1995; 13(2):217-226.
- (8) de Jong EC, Vieira PL, Kalinski P, Kapsenberg ML. Corticosteroids inhibit the production of inflammatory mediators in immature monocyte-derived DC and induce the development of tolerogenic DC3. *J Leukoc Biol* 1999; 66(2):201-204.
- (9) Dealtry GB, O'Farrell MK, Fernandez N. The Th2 Cytokine environment of the placenta. *Int Arch Allergy Immunol* 2000; 123(2):107-119.
- (10) Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Rheumatoid arthritis. *Cell* 1996; 85(3):307-310.
- (11) Flores-Romo L. In vivo maturation and migration of dendritic cells. *Immunology* 2001; 102(3):255-262.
- (12) Friedl P, Gunzer M. Interaction of T cells with APCs: the serial encounter model. *Trends Immunol* 2001; 22(4):187-191.
- (13) Gilmore W, Weiner LP, Correale J. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol* 1997; 158(1):446-451.

- (14) Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* 2002; 20:621-667.
- (15) Hamano N, Terada N, Maesako K, Hohki G, Ito T, Yamashita T, Konno A. Effect of female hormones on the production of IL-4 and IL-13 from peripheral blood mononuclear cells. *Acta Otolaryngol Suppl* 1998; 537:27-31.
- (16) Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; 90(9):3245-3287.
- (17) Hartgers FC, Figdor CG, Adema GJ. Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. *Immunol Today* 2000; 21(11):542-545.
- (18) 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-gamma production by T helper 1 cells. *Eur J Immunol* 1996; 26(3):659-668.
- (19) Hunt JS, Miller L, Platt JS. Hormonal regulation of uterine macrophages. *Dev Immunol* 1998; 6(1-2):105-110.
- (20) Jonuleit H, Schmitt E, Schuler G, Knop J, Enk AH. Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells. *J Exp Med* 2000; 192(9):1213-1222.
- (21) Jonuleit H, Schmitt E, Steinbrink K, Enk AH. Dendritic cells as a tool to induce anergic and regulatory T cells. *Trends Immunol* 2001; 22(7):394-400.
- (22) Kalinski P, Hilkens CM, Wierenga EA, Kapsenberg ML. T-cell priming by type-1 and type-2 polarized dendritic cells: the concept of a third signal. *Immunol Today* 1999; 20(12):561-567.
- (23) Kalinski P, Vieira PL, Schuitemaker JH, de Jong EC, Kapsenberg ML. Prostaglandin E(2) is a selective inducer of interleukin-12 p40 (IL-12p40) production and an inhibitor of bioactive IL-12p70 heterodimer. *Blood* 2001; 97(11):3466-3469.
- (24) Kammerer U, Schoppet M, McLellan AD, Kapp M, Huppertz HI, Kampgen E, Dietl J. Human decidua contains potent immunostimulatory CD83(+) dendritic cells. *Am J Pathol* 2000; 157(1):159-169.
- (25) Kauma SW. Cytokines in implantation. *J Reprod Fertil Suppl* 2000; 55:31-42.
- (26) Komorowski J, Gradowski G, Stepień H. Effects of hCG and beta-hCG on IL-2 and sIL-2R secretion from human peripheral blood mononuclear cells: a dose-response study in vitro. *Immunol Lett* 1997; 59(1):29-33.

- (27) Kontula K, Paavonen T, Luukkainen T, Andersson LC. Binding of progestins to the glucocorticoid receptor. Correlation to their glucocorticoid-like effects on in vitro functions of human mononuclear leukocytes. *Biochem Pharmacol* 1983; 32(9):1511-1518.
- (28) Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science* 1990; 248(4952):220-223.
- (29) Liu HY, Buenafe AC, Matejuk A, Ito A, Zamora A, Dwyer J, Vandenberg AA, Offner H. Estrogen inhibition of EAE involves effects on dendritic cell function. *J Neurosci Res* 2002; 70(2):238-248.
- (30) Lutz MB, Schuler G. Immature, semi-mature and fully mature dendritic cells: which signals induce tolerance or immunity? *Trends Immunol* 2002; 23(9):445-449.
- (31) Mahnke K, Schmitt E, Bonifaz L, Enk AH, Jonuleit H. Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells. *Immunol Cell Biol* 2002; 80(5):477-483.
- (32) Mantovani A, Gray PA, Van Damme J, Sozzani S. Macrophage-derived chemokine (MDC). *J Leukoc Biol* 2000; 68(3):400-404.
- (33) Maret A, Coudert JD, Garidou L, Foucras G, Gourdy P, Krust A, Dupont S, Chambon P, Druet P, Bayard F, Guery JC. Estradiol enhances primary antigen-specific CD4 T cell responses and Th1 development in vivo. Essential role of estrogen receptor alpha expression in hematopoietic cells. *Eur J Immunol* 2003; 33(2):512-521.
- (34) Matyszak MK, Citterio S, Rescigno M, Ricciardi-Castagnoli P. Differential effects of corticosteroids during different stages of dendritic cell maturation. *Eur J Immunol* 2000; 30(4):1233-1242.
- (35) McMurray RW, Ndebele K, Hardy KJ, Jenkins JK. 17-beta-estradiol suppresses IL-2 and IL-2 receptor. *Cytokine* 2001; 14(6):324-333.
- (36) Medawar PB. Some immunological and endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol* 1953; 7:320-328.
- (37) Mellor AL, Munn DH. Immunology at the maternal-fetal interface: lessons for T cell tolerance and suppression. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:367-391.
- (38) Miyaura H, Iwata M. Direct and indirect inhibition of Th1 development by progesterone and glucocorticoids. *J Immunol* 2002; 168(3):1087-1094.
- (39) Moro MH, Bjornsson J, Marietta EV, Hofmeister EK, Germer JJ, Bruinsma E, David CS, Persing DH. Gestational attenuation of Lyme arthritis is mediated by progesterone and IL-4. *J Immunol* 2001; 166(12):7404-7409.

- (40) Mosca PJ, Hobeika AC, Clay TM, Nair SK, Thomas EK, Morse MA, Lysterly HK. A subset of human monocyte-derived dendritic cells expresses high levels of interleukin-12 in response to combined CD40 ligand and interferon-gamma treatment. *Blood* 2000; 96(10):3499-3504.
- (41) Munz C, Holmes N, King A, Loke YW, Colonna M, Schild H, Rammensee HG. Human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-G molecules inhibit NKAT3 expressing natural killer cells. *J Exp Med* 1997; 185(3):385-391.
- (42) Petri M, Howard D, Repke J. Frequency of lupus flare in pregnancy. The Hopkins Lupus Pregnancy Center experience. *Arthritis Rheum* 1991; 34(12):1538-1545.
- (43) Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, Parronchi P, Manetti R, Annunziato F, Livi C, . Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 1995; 155(1):128-133.
- (44) Piccinni MP, Beloni L, Livi C, Maggi E, Scarselli G, Romagnani S. Defective production of both leukemia inhibitory factor and type 2 T-helper cytokines by decidual T cells in unexplained recurrent abortions. *Nat Med* 1998; 4(9):1020-1024.
- (45) Piccinni MP, Scaletti C, Maggi E, Romagnani S. Role of hormone-controlled Th1- and Th2-type cytokines in successful pregnancy. *J Neuroimmunol* 2000; 109(1):30-33.
- (46) Raghupathy R. Th1-type immunity is incompatible with successful pregnancy. *Immunol Today* 1997; 18(10):478-482.
- (47) Rammensee HG, Bevan MJ. Evidence from in vitro studies that tolerance to self antigens is MHC-restricted. *Nature* 1984; 308(5961):741-744.
- (48) Rice A, Chard T. Cytokines in implantation. *Cytokine Growth Factor Rev* 1998; 9(3-4):287-296.
- (49) Robertson SA, Seaman RF, Guilbert LJ, Wegmann TG. The role of cytokines in gestation. *Crit Rev Immunol* 1994; 14(3-4):239-292.
- (50) Romani N, Reider D, Heuer M, Ebner S, Kampgen 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(2):137-151.
- (51) Romani N, Koch F, Heufler C, Kämpgen E, Schuler G. Dendritic cells as donors and recipients of cytokine signals. In: Lotze M, Thomson A, editors. *Dendritic cells- Biology and Clinical applications*. San Diego: Academic Press, 1999: 653-672.

- (52) Roncarolo MG, Levings MK, Traversari C. Differentiation of T regulatory cells by immature dendritic cells. *J Exp Med* 2001; 193(2):F5-F9.
- (53) Sadovnick AD, Eisen K, Hashimoto SA, Farquhar R, Yee IM, Hooge J, Kastrukoff L, Oger JJ, Paty DW. Pregnancy and multiple sclerosis. A prospective study. *Arch Neurol* 1994; 51(11):1120-1124
- (54) Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C, Gaillard C, Vanbervliet B, Ait-Yahia S, Banchereau J, Liu YJ, Lebecque S, Caux C. The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol* 1998; 160(4):1666-1676.
- (55) Shevach EM. Regulatory T cells in autoimmunity*. *Annu Rev Immunol* 2000; 18:423-449.
- (56) Song XY, Zeng L, Jin W, Pilo CM, Frank ME, Wahl SM. Suppression of streptococcal cell wall-induced arthritis by human chorionic gonadotropin. *Arthritis Rheum* 2000; 43(9):2064-2072.
- (57) Steinbrink K, Wolf M, Jonuleit H, Knop J, Enk AH. Induction of tolerance by IL-10-treated dendritic cells. *J Immunol* 1997; 159(10):4772-4780.
- (58) Steinbrink K, Jonuleit H, Muller G, Schuler G, Knop J, Enk AH. Interleukin-10-treated human dendritic cells induce a melanoma-antigen-specific anergy in CD8(+) T cells resulting in a failure to lyse tumor cells. *Blood* 1999; 93(5):1634-1642.
- (59) 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(5):1142-1162.
- (60) Steinman RM. The dendritic cell system and its role in immunogenicity. *Annu Rev Immunol* 1991; 9:271-296.
- (61) Steinman RM, Nussenzweig MC. Avoiding horror autotoxicus: the importance of dendritic cells in peripheral T cell tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; 99(1):351-358.
- (62) Stoll S, Jonuleit H, Schmitt E, Muller 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(10):3231-3239.
- (63) Whitacre CC. Sex differences in autoimmune disease. *Nat Immunol* 2001; 2(9):777-780.
- (64) Wira CR, Rossoll RM. Antigen-presenting cells in the female reproductive tract: influence of sex hormones on antigen presentation in the vagina. *Immunology* 1995; 84(4):505-508.

- (65) Wright-Browne V, McClain KL, Talpaz M, Ordonez N, Estrov Z. Physiology and pathophysiology of dendritic cells. *Hum Pathol* 1997; 28(5):563-579.
- (66) Yoshimura T, Inaba M, Sugiura K, Nakajima T, Ito T, Nakamura K, Kanzaki H, Ikehara S. Analyses of dendritic cell subsets in pregnancy. *Am J Reprod Immunol* 2003; 50(2):137-145.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich herzlich bedanken bei:

Frau Dr. Kämmerer für die Überlassung des Themas und ihr großes Engagement bei der Betreuung der Arbeit; ganz besonders für die viele Zeit, die sie für die Beantwortung von Fragen und für Diskussionen über die Arbeit geopfert hat,

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

Herrn Prof. Dr. Steck für sein reges Interesse an der Arbeit und die Hilfe bei der Erstellung eines Publikationsmanuskriptes, sowie die finanzielle Unterstützung, die mir die Teilnahme an einem Kongress zur Präsentation der Daten ermöglichte,

Frau Prof. Dr. Bröcker für das freundliche Angebot, die Prüfung für das Rigorosum zu übernehmen,

Herrn Dr. McLellan für seine freundliche Einweisung und Hilfestellungen bei den FACS- und MLR-Untersuchungen,.

Frau Marion Habersack für die gute Zusammenarbeit und ihre große Hilfsbereitschaft und Geduld, mit der sie meinen gelegentlichen Übereifer ertragen hat,

Frau Michaela Kapp für praktische Anregungen und Hilfestellung und das angenehme Arbeitsklima.

Lebenslauf

Name: Barbara Sophie Christine Huck

Geboren: 5.10.76, in Nürnberg.

Schulzeit:

1981-1986

Grundschule Paniersplatz in Nürnberg

1986-1995

Willstätter-Gymnasium Nürnberg

Abitur 1995

Studium:

Nov. 1995 - Aug. 1996

Studium der Biochemie an der Universität Regensburg

Okt. 1996 - Sept. 1998

Studium der Humanmedizin an der Universität

Regensburg

Physikum Sept. 1998,

Okt. 1998 - März 2002

Studium der Humanmedizin an der Universität Würzburg

1. Staatsexamen August 1999

2. Staatsexamen im März 2002

April 2002 - Mai 2003

Praktisches Jahr am Klinikum der Johann Wolfgang

Goethe Universität Frankfurt (Innere Medizin, Chirurgie)

Wahlfach Neurologie in der Berner Klinik, Montana,
Schweiz

3. Staatsexamen im Mai 2003

Beruf:

seit Sept. 2003

ÄiP in der Abteilung Virologie am Institut für
medizinische Mikrobiologie und Hygiene des
Universitätsklinikums Freiburg

Freiburg, den 11.1.04

B. Huck