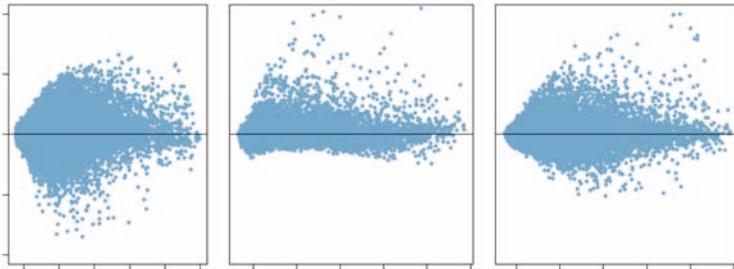


Expressionsanalyse Interferon- α -positiver und -negativer humaner plasmacytoider dendritischer Zellen

Linda Schneider



INAUGURALDISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Doktors der Medizin**
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei dem Autor dieses Werkes.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2014

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2014

© 2014 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition linguistique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

**Expressionsanalyse Interferon- α -positiver und -negativer
humaner plasmacytoider dendritischer Zellen**

INAUGURALDISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

Linda Schneider

aus Engelskirchen

Gießen 2013

Aus dem Institut für Klinische Immunologie und Transfusionsmedizin,
der Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen,

Leiter Prof. Dr. Gregor Bein

Gutachter: Prof. Dr. H. Hackstein

Gutachter: Prof. Dr. L. Schmitz

Tag der Disputation: 30.01.2014

Meiner Tochter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis.....	i
1. Einleitung.....	1
1.1 Allgemeine Grundlagen.....	1
1.1.1 Angeborenes und Adaptives Immunsystem.....	1
1.1.2 Dendritische Zellen.....	2
1.1.3 Plasmacytoide dendritische Zellen.....	5
1.2 Stand der Forschung.....	17
1.3 Fragestellung.....	20
1.4 Lösungsansatz.....	21
2. Material und Methoden.....	23
2.1 Reagenzien.....	23
2.2 Zellmaterial.....	27
2.3 Zellaufbereitung.....	27
2.4 Kultivierung und Stimulation als Vorbereitung auf die Oberflächen- markierung der IFN- α -Produktion.....	27
2.5 IFN- α -Sekretions-Phase – Markierung der Zellen und IFN- α -Produktion..	28
2.6 Färbung der Zellen.....	30
2.7 Aufreinigung der Zellen in eine IFN- α -positive und IFN- α -negative Fraktion.....	32
2.8 RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung der RNA.....	33
2.9 Umschreiben in cDNA.....	35
2.10 RT-PCR – mRNA-Expressionsanalyse für humane Zytokine und Zelloberflächenmarker.....	36
2.11 Whole-Genome-DNA-Oligonukleotid-Microarray.....	39

2.12	Oberflächenfärbung unstimulierter und stimulierter Zellen – Untersuchung auf humane Zelloberflächenmarker	40
2.13	CD9 Expression.....	43
2.14	Intrazellulärfärbung mit TLR9	43
3.	Ergebnisse	45
3.1	Leitfaden/ Kurzübersicht der Ergebnisse	45
3.2	Stimulation mit CpG-ODN 2216, Dotap und IL-3.....	45
3.3	Untersuchung der pDCs auf TLR9.....	50
3.4	Zellpopulationen und Reinheit IFN- α -positiver und IFN- α -negativer Zellen.....	51
3.5	Vitalität IFN- α -positiver und IFN- α -negativer Zellen	55
3.6	RNA-Menge und Reinheit der RNA beider Zellfraktionen	57
3.7	RT-PCR – Humane Zytokine	57
3.8	RT-PCR – Humane Zelloberflächenmarker.....	59
3.9	Oberflächenfärbung von pDCs.....	60
3.9.1	Markierung der Zellen mit ausgewählten Antikörpern – aus dem Experiment: RT-PCR zu humanen Zelloberflächenmarkern.....	60
3.9.2	Untersuchung der pDCs auf CD9	61
3.10	Whole-Genome-DNA-Oligonukleotid-Microarray.....	62
4.	Diskussion	69
4.1	Optimierung der Ausbeute IFN- α produzierender pDCs durch Stimulation mit CpG-ODN 2216, Dotap und IL-3	69
4.2	Validierung der Stimulation mit CpG-ODN 2216	70
4.3	Homogenität der Zellpopulationen, Reinheit sowie Vitalität IFN- α -positiver und IFN- α -negativer Zellen	71
4.4	IFN- α -positive und IFN- α -negative Zellen weisen unterschiedliche Gene für humane Zytokine und Zelloberflächenmarker auf	72

Inhaltsverzeichnis

4.5	Oberflächenfärbung mit ausgewählten Antikörpern	76
4.6	Whole-Genome-DNA-Oligonukleotid-Microarray – differentielle Gen- expression in den beiden Subpopulationen IFN- α -positiver und IFN- α - negativer Zellen	77
4.7	Methodendiskussion	81
4.8	Ausblick	83
	Zusammenfassung	84
	Summary	85
	Abkürzungsverzeichnis	iv
	Abbildungsverzeichnis	vii
	Tabellenverzeichnis	ix
	Literaturverzeichnis	x
	Anhang	xxv
	Publikationsverzeichnis	xliv
	Ehrenwörtliche Erklärung	xlvi
	Danksagung	xlvi

1. Einleitung

1.1 Allgemeine Grundlagen

1.1.1 Angeborenes und Adaptives Immunsystem

Das Immunsystem wird in ein angeborenes und adaptives Immunsystem unterschieden, welches jeweils unterschiedliche Abwehrmechanismen bereitstellt (Germain 2004).

Das angeborene Immunsystem wird genetisch determiniert und fungiert als primäres Abwehrsystem des Körpers. Es bewirkt prompt Reaktionen auf Gefahrensignale, wobei die immunologische Antwort zu einem inflammatorischen Prozess führt. Es beinhaltet neben mechanischen Barrieren, wie Hautepithelien, die Zellen des Immunsystems, wie Granulozyten, Mastzellen, Makrophagen und natürliche Killer-Zellen (NK-Zellen) sowie Proteine, wie das Komplementsystem und Zytokine (Chaplin 2010).

Ergänzt wird das angeborene Immunsystem durch das adaptive Immunsystem, bestehend aus T- und B-Lymphozyten mit den von ihnen produzierten Antikörpern für die humorale Abwehr. Es wird innerhalb von Wochen oder Monaten erworben (Blanco 2007). Es zeichnet sich durch eine spezifische Reaktion auf präsentierte Antigene aus. Dabei erkennen T-Lymphozyten Peptide durch Moleküle des *Major-Histocompatibility-Complex* (MHC) nach stattgefundener Antigen-Prozessierung. MHC-Klasse-I-Moleküle werden auf allen kernhaltigen Zellen und Thrombozyten exprimiert und zeigen eine Veränderung bzw. Infektion der Zelle an. Diese Fragmente werden cytotoxischen T-Lymphozyten (CTL) – $CD8^+$ T-Zellen – präsentiert. MHC-Klasse-II-Moleküle werden auf Antigen-präsentierenden Zellen (APC), wie Makrophagen, B-Zellen und dendritischen Zellen (DC) gefunden. Die präsentierten Peptidfragmente wurden zuvor aus der extrazellulären Flüssigkeit aufgenommen und können von abgestorbenen körpereigenen Zellen, Bakterien, Viren, Helminthen oder Tumorzellen stammen. Sie werden von $CD4^+$ T-Helferzellen erkannt, die im weiteren Verlauf die Immunantwort über Zytokine steuern (Shortman 2002, Murphy 2009).

Weiterhin bilden T- und B-Lymphozyten Gedächtniszellen, die im Falle einer Reexposition auf ein Antigen eine schnellere und qualifiziertere Antwort ausbilden können. Sie bewirken die sekundäre Immunität (Borghans 1999).

Adaptive Immunantworten beinhalten immunogene und tolerogene Reaktionen, wobei erstere Resistenzen gegenüber Infektionen und der möglichen Entstehung von Krebs

umfassen und letztere die Vermeidung von Autoimmunreaktionen beinhalten. Hierfür stehen auf verschiedenen Ebenen eine Vielzahl von Mechanismen während der Entwicklung des Immunsystems zur Verfügung (Hackstein 2001, Steinman 2003).

1.1.2 Dendritische Zellen

Dendritische Zellen (DCs) wurden erstmals 1973 von Steinman und Cohn als neuer Zelltyp in adhärennten Zellpopulationen, die aus peripheren lymphoiden Organen – Milz, Lymphknoten, Peyer-Plaques – präpariert worden waren, beschrieben. Morphologisch zeigen DCs einen großen Zellkern und reichlich Zytoplasma mit großen Mitochondrien sowie feine Dendriten (Steinman 1973). Bei den dendritischen Zellen handelt es sich um eine heterogene Gruppe, die sich hinsichtlich ihrer Lokalisation, ihrer Besetzung mit Oberflächenmarkern und ihrer Funktion unterscheiden (Banchereau 1998).

DCs stammen von hämatopoetischen CD34-positiven Stammzellen im Knochenmark ab (Lipscomb 2002). Im weiteren Verlauf werden sie sowohl aus lymphatischen als auch myeloiden Vorläuferzellen gebildet (Jacobs 2008b). Diese Vorläuferzellen gelangen über das Blut in die Gewebe oder periphere Lymphknoten, wo sie sich als unreife DCs ansiedeln, welche CD14-negative Langerhans Zellen und CD14-positive interstitielle DCs inkludieren (Lipscomb 2002). Mithilfe der zytoplasmatischen Ausläufer sind sie in der Lage, Antigene via Phagozytose, Makropinozytose sowie über eine Vielfalt von *Pattern-Recognition-Receptors* (PRR), zu denen die intrazellulären Toll-ähnlichen Rezeptoren (TLR, *Toll-like receptor*) sowie die oberflächlichen Mannose-Rezeptoren, sog. C-Typ Lecitin-Rezeptoren (CLR) gehören, aufzunehmen (Sallusto 1995, Hartgers 2000, Ardavin 2004, Blanco 2007). Nach Degradierung und Prozessierung der Antigene zu Peptiden werden endogene Antigene an MHC-I-Moleküle gebunden. Dahingegen werden exogene Antigene, auf den im Vergleich zu anderen APC 10-100fach höher exprimierten MHC-II-Molekülen, an der Zelloberfläche präsentiert (Jacobs 2008b, Banchereau 1998). Darüber hinaus können die DCs auch Peptide von apoptotischen Zellen oder Tumorzellen präsentieren (Reid 2000, Santini 2000).

Durch Einwirkung von Gefahrensignalen wie Gewebeschäden, *Pathogen-associated molecular patterns* (PAMP), inflammatorischen Zytokinen oder nach Kontakt zu Toll-like Rezeptor-Liganden sowie in Anwesenheit von co-stimulatorischen Molekülen, wie CD40, CD80, CD86 von dendritischen Zellen und CD28 von T-Zellen stammend, reifen DCs und wandern in lymphatische Organe im Abflussgebiet aus (Hackstein 2001,

Lipscomb 2002, Liu 2005, Chaplin 2006, Ueno 2007). Die Fähigkeit zur Migration und ortsansässig zu werden beruht auf der unterschiedlichen Expression von Chemokinrezeptoren wie CCR1, CCR5, CCR6 und CCR7, bei denen es sich um Sieben-Transmembran-Rezeptoren handelt (Dieu 1998, Banchereau 2000). *Homing*-Moleküle auf der Oberfläche dendritischer Zellen, wie $\alpha_4\beta_7$ -Integrin sind bei der Migration richtungweisend. Durch die Sezernierung von Chemokinen im lymphatischen Gewebe werden sie gemäß des Chemokin-Gradienten zum Ort der Infektion geleitet. Nach Antigen-Aufnahme erfolgt die Herunterregulation von CCR6 (MIP-3a-Rezeptor), wodurch die DCs reifen und ihre Fähigkeit verlieren, auf das entsprechende Chemokin MIP-3a (CCL20) zu reagieren. Sie wandern in Richtung drainierender Lymphknoten, exprimieren CCR7 und binden Chemokine, wie CCL19 und CCL21 aus parakortikalen T-Zell-Arealen der Lymphknoten, um mit Lymphozyten in Interaktion zu treten (Dieu-Nosjean 1999, Tang 1999, Banchereau 2000, Geissmann 2002, Facchetti 2003). Dort interagieren sie als potente Antigen-präsentierende Zellen mit dem T-Zell-Rezeptor von $CD8^+$ cytotoxischen Zellen bzw. $CD4^+$ T-Helferzellen und lösen somit eine Immunreaktion aus (Jacobs 2008b). In Abhängigkeit vom Vorkommen weiterer Faktoren in der Mikroumgebung während der DC-Aktivierung und DC-Reifung, wie IL-27, IL-23 oder $IFN-\gamma$, produzieren diese großen Mengen an IL-12, wodurch T_H1 -Reaktionen hervorgerufen werden (Kapsenberg 2003). Das von den T_H1 -Zellen ausgeschüttete IL-2, $IFN-\gamma$ und $TNF-\beta$ dient zur Stimulation von DCs, Makrophagen, NK-Zellen und cytotoxischen T-Zellen (Banchereau 1998, Kadowaki 2000, Jacobs 2008b). Sie vermitteln so eine zelluläre Immunantwort. Wird die Fähigkeit der DCs IL-12 zu produzieren hingegen durch Moleküle wie IL-10 oder $TGF-\beta$ supprimiert, können T_H2 -Reaktionen angestoßen werden, womit eine humorale Immunantwort ausgelöst wird. Darüber hinaus können T_H2 -Zellen durch IL-4 aktiviert werden. Sie produzieren dann IL-4, IL-5, IL-10 und IL-13 (Rissoan 1999, Vieira 2000, Hackstein 2001, Deenick 2007). In Anwesenheit von IL-23, IL-21, IL-6 oder $TGF-\beta$ entstehen aus naiven T-Zellen T_H17 -Zellen, die v.a. das proinflammatorische Zytokin IL-17 produzieren. Sie werden in ihrer Rolle als Schlüssel-Mediatoren veranlasst, eine Immunreaktion und Gewebsverletzung zu vermitteln. Eine weitere Zelllinie, die aus naiven T-Zellen nach Kontakt mit DCs entstehen kann, ist die regulatorische T-Zelle (Treg), die verhindert, dass immunologische Reaktionen gegen körpereigene Strukturen gerichtet werden. Die Fähigkeit zur Produktion von IL-10 ist hierbei im Hinblick auf verschiedene Erkrankungen besonders interessant (Swiecki 2010a). Die Treg wird durch Aktivierung des spezifischen Transkriptionsfak-

tors FoxP3 mittels TGF- β zur Immunsuppression angeregt (Deenick 2007). Unterstützend zu den gegenregulatorischen Mechanismen können sie periphere T-Zell-Toleranz durch direkte Elimination von Erregern induzieren (Shannon 2002, Jacobs 2008b).

Die DCs sind maßgeblich an der Aktivierung von NK-Zellen als auch an der Reifung, Differenzierung und Proliferation von B-Zellen beteiligt (Kadowaki 2000, Liu 2005, Ardavin 2008). Die DCs stellen Bindeglieder zwischen dem angeborenem und adaptiven Immunsystem dar (Abb. 1) (Liu 2005, Fitzgerald-Bocarsly 2008, Jacobs 2008b).

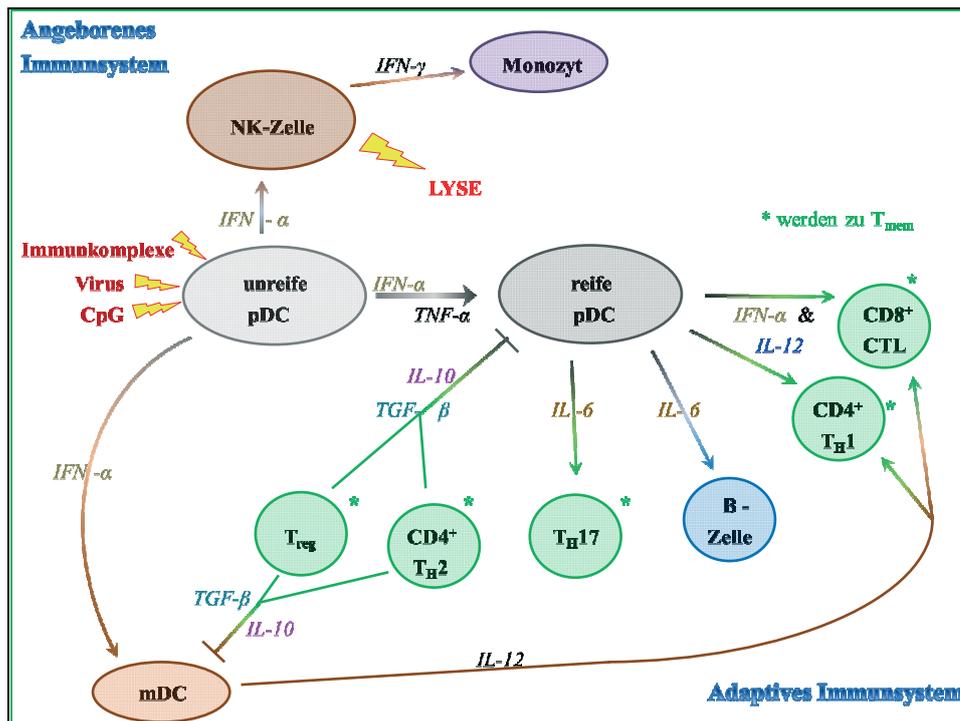


Abbildung 1: DCs verbinden angeborenes und adaptives Immunsystem (modifiziert nach Fitzgerald-Bocarsly 2008).

Unreife plasmacytoide dendritische Zellen (pDCs) produzieren nach Kontakt mit Viren, CpG-ODN oder nukleotidhaltigen Immunkomplexen IFN- α und proinflammatorische Zytokine, wodurch Zellen des angeborenen Immunsystems (NK-Zellen, Monozyten, myeloide dendritische Zellen (mDCs)) aktiviert werden. Reife pDCs wandern in Lymphknoten ein, fördern die Ausschüttung co-stimulatorischer Moleküle und treten als Antigen-präsentierende Zellen mit Zellen des adaptiven Immunsystems in Kontakt (CD4+ T-Helferzellen, CD8+ cytotoxischen Lymphozyten, regulatorischen T-Zellen sowie T_H17-Zellen). In Abhängigkeit vom Stimulus fördern sie T_H1- oder T_H2-Immunantworten. Darüber hinaus tragen sie zur B-Zell-Reifung und Entstehung eines immunologischen Gedächtnisses bei.

Da die DCs sowohl aus myeloiden als auch lymphatischen Vorläuferzellen entstehen können, werden konventionelle myeloide dendritische Zellen (mDCs) mit den Subpopulationen Langerhans-Zellen und interstitiellen (dermalen) Zellen sowie plasmacytoide dendritische Zellen (pDCs) unterschieden (Lipscomb 2002). Verschiedene Arbeitsgruppen, wie Shigematsu et al., Jacobs et al. oder Kawamoto demonstrierten, dass pDCs

sowohl aus myeloiden als auch lymphoiden Vorläuferzellen hervorgehen können und damit eine hohe Plastizität aufweisen (Shigematsu 2004, Kawamoto 2006, Jacobs 2008b). Ob die unterschiedlichen Funktionen der pDCs durch einen einzigen Zelltyp oder verschiedene Subpopulationen gewährleistet werden können, ist bislang unklar (Björck 2011).

1.1.3 Plasmacytoide dendritische Zellen

Heute ist bekannt, dass pDCs in zentralen und sekundären lymphatischen Organen mit hohem T-Zell-Anteil lokalisiert sein können, wie der Medulla des Thymus, der periarteriolen lymphatischen Scheide (PALS) sowie der parakortikalen Zone von Lymphknoten (Facchetti 1991). Somit können sie eine erste Abwehr von Viren und anderen Pathogenen, welche über Zirkulation in das lymphatische Gewebe eintreffen, gewährleisten (Marafioti 2008). Darüber hinaus zeigen sie auch Präsenz im Knochenmark und im peripheren Blut. Sie werden nach Exposition auf geeignete Stimulantien in verschiedene Areale des Körpers rekrutiert. Dazu zählen die Haut, der Liquor, die Synovia, der Gastrointestinaltrakt, die Vaginalmukosa und die Lunge (Fitzgerald-Bocarsly 2002). Morphologisch weisen die pDCs einen großen Zellkern mit ein oder zwei Nukleoli sowie ein opulentes Zytoplasma mit einem gut entwickelten rauem endoplasmatisches Retikulum für die Produktion von Proteinen auf (Abb. 2) (Siegal 1999, Fitzgerald-Bocarsly 2008).

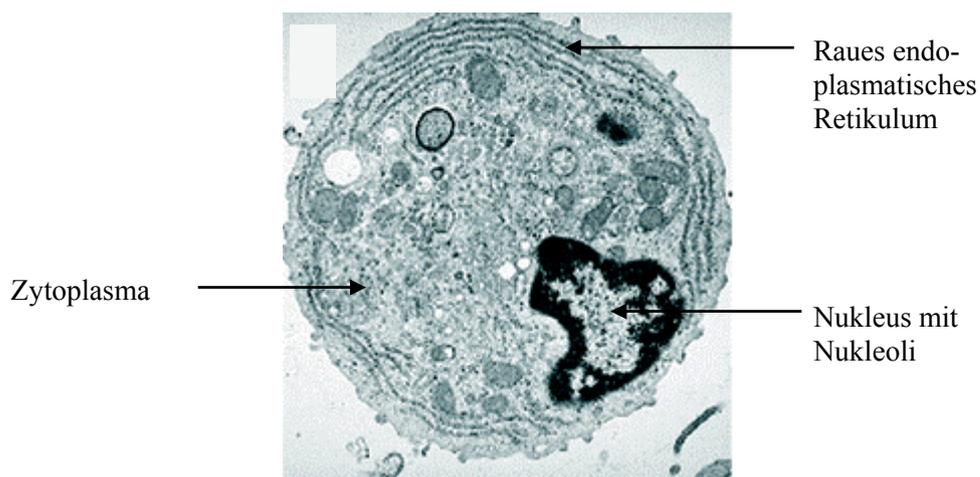


Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer plasmacytoiden dendritischen Zelle (modifiziert nach Liu 2005).

Morphologisch sichtbar ist ein opulentes Zytoplasma, ein gut entwickeltes raues endoplasmatisches Retikulum zur Proteinbiosynthese sowie ein großer Zellkern.

Die pDCs stellen mit einem Anteil von 0,2-0,8 % an den mononukleären Zellen im peripheren Blut eine kleine aber bedeutende Gruppe dar (Cella 1999, Liu 2005). Aufgrund ihrer geringen Menge bedarf es eines höheren Aufwandes sie zu identifizieren und isolieren zu können. Die pDCs können vornehmlich T_H2-Reaktionen und zudem – besonders nach geeigneter Stimulation (Rothenfusser 2002) – auch T_H1-Reaktionen hervorrufen (Grouard 1997, Ito 2001, Liu 2005, Bratke 2011). Sie interagieren als APCs, indem sie eine Antigen-spezifische T-Zell-Antwort induzieren (Gilliet 2008, Ochando 2006). So können sie naive T-Zellen zur Produktion von IFN- γ und IL-10 veranlassen (Kadowaki 2000). Darüber hinaus verfügen sie über aktivierende oder hemmende regulatorische Einflüsse auf weitere Komponenten des Immunsystems. Sie aktivieren NK-Zellen und veranlassen B-Zellen zur Differenzierung zu Plasmazellen. Damit haben sie Bedeutung bei inflammatorischen Prozessen (Barchet 2005, Lande 2007, Irla 2010). Es wird davon ausgegangen, dass pDCs eine entscheidende Rolle bei der Aufrechterhaltung der T-Zell-Toleranz haben, welche auch Bedeutung für die Entstehung von Autoimmunerkrankungen hat (Abb. 3) (de Heer 2004, Ochando 2006, Goubier 2008, Dubois 2009). Dabei werden die im Thymus entstehenden T-Zellen bei der Etablierung der zentralen Toleranz nach Präsentation von Autoantigenen entsprechend positiv oder negativ selektiert (Fujimoto 2002). Indem die pDCs Antigene in Abwesenheit von co-stimulierenden Entzündungsfaktoren aufnehmen und diese T-Zellen präsentieren, wird die periphere Toleranz gefördert (Ardavin 2004). Zu dieser werden die Deletion und Anergie von T-Zellen sowie die Suppression durch regulatorischen T-Zellen gezählt (Steinman 2003). Durch ihre hohe Produktion von IFN- α ermöglichen pDCs den initialen Abwehrmechanismus gegen virale Infektionen (Gilliet 2008, Mittelbrunn 2008, Swiecki 2010b, Ueno 2010). Darüber hinaus produzieren sie auch proinflammatorische Zytokine (Hoshino 2006). Takagi et al. konnten weiterhin demonstrieren, dass pDCs auch eine gewisse Schutzfunktion gegenüber bakteriellen Infektionen haben, indem sie via CD8⁺ T-Zellen antibakterielle cytotoxische T-Zellen aktivieren (Takagi 2011).

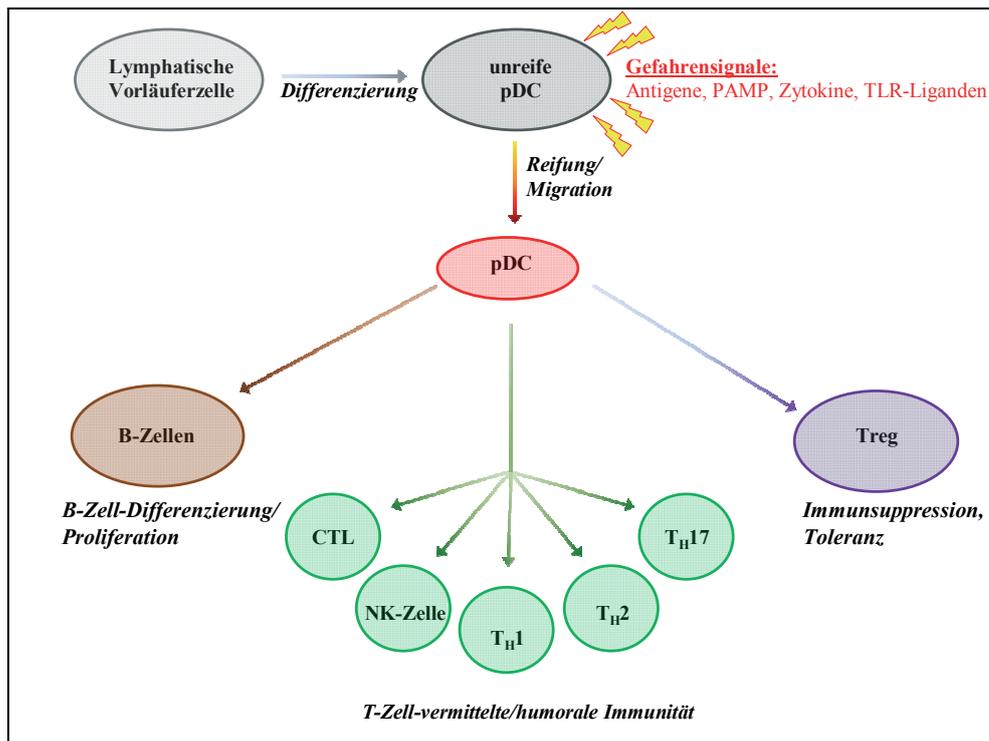


Abbildung 3: Rolle der pDCs im Immunsystem (modifiziert nach Ardavin 2004).

Die pDCs haben eine bedeutende Rolle im Immunsystem. Im inflammatorischen Prozess wirken sie zum einen auf B-Zellen und fördern deren Differenzierung und Proliferation. Des Weiteren sind sie wichtig für die Aufrechterhaltung der zentralen und peripheren T-Zell-Toleranz. Durch ihren Einfluss auf die T-Zellen des Immunsystems vermitteln sie humorale Immunität.

Oberflächenmarker der pDCs

Plasmacytoide dendritische Zellen weisen bestimmte phenotypische Oberflächenmarker auf. Sie sind positiv für CD4, CD45RA, BDCA-2, BDCA-4 und CD123. Weiterhin sind sie schwach positiv bis negativ für CD11c, welches den myeloiden DCs zugeschrieben wird, sowie Lineage Cocktail 1-negativ, wozu CD3, CD14, CD19, CD20 und CD56 gehören. Dabei wird CD3 von T-Zellen exprimiert, CD14 von Monozyten, CD19 von B-Lymphozyten und CD56 von NK-Zellen. Anhand dieser Schlüssel-Marker können pDCs im peripheren Blut diskriminiert und isoliert werden (Liu 2005, Fitzgerald-Bocarsly 2008, Schwab 2010). Dabei konnten Dzionek et al. zeigen, dass die Produktion von IFN- α durch die Bindung von Anti-BDCA-2-Antikörpern herunterreguliert wird. Bei dem Oberflächenmolekül BDCA-2, syn. CD303, handelt es sich um einen transmembranären Endozytose Typ II C-Typ Lectin-Rezeptor aus der Familie der Mannose-Rezeptoren. Es besitzt die Eigenschaft T-Zellen initialisierte und prozessierte Antigene zu präsentieren. Das BDCA-4, syn. CD304 oder Neuropilin-1, stellt einen membrangebundenen Co-Rezeptor eines Tyrosinkinase-Rezeptors für den *Vascular endothelial*

growth factor (VEGF) sowie Mitglieder der Semaphorin-Familie dar. Es hat vielfältige Funktionen im Rahmen der Angiogenese, für das Wachstum von Axonen, das Überleben von Zellen sowie die Migration und Invasion von Zellen (Dzionic 2000, Dzionic 2001). Bei dem Oberflächenmarker CD123 handelt es sich um die α -Kette des IL-3 Rezeptors (Grouard 1997, Lipscomb 2002).

Toll-like Rezeptoren und Aktivierung der pDCs

Zu den Gefahrensignalen, die im Rahmen von Immunreaktionen erkannt werden, gehören molekulare Strukturen auf eingedrungenen Pathogenen, sog. PAMPs. Diese können von PRRs gebunden werden, zu denen die Toll-like Rezeptoren gehören.

Eine Bindung von entsprechenden Liganden an das Adapterprotein MyD88 führt zu dessen spezifischer Aktivierung über den nukleären Faktor κ B (NF- κ B) und leitet mehrere Differenzierungswege ein. Hierzu gehören die Ausreifung von Antigen-präsentierenden Zellen, vermehrte Phagozytose, Ankurbeln der Kaskade des Komplementsystems, Hochregulation von co-stimulatorischen Molekülen sowie die Produktion von inflammatorischen Zytokinen (Kaisho 2003, Wagner 2004, Agrawal 2007). MyD88 kommt auf allen TLRs vor, außer auf TLR3 (Akira 2004). Somit sind TLRs entscheidende Proteine bei der Verknüpfung der Reaktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems (Akira 2001).

Bei den TLRs handelt es sich um Rezeptorproteine, die einerseits intrazellulär vorkommen (TLR3, TLR7, TLR8, TLR9) und dort mikrobielle Nukleinsäuren erkennen oder andererseits als Transmembranproteine (TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6, TLR11) – hauptsächlich auf Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen – lokalisiert sind. Sie dienen vornehmlich zur Erkennung von mikrobiellen Membranbestandteilen. Daneben sind sie auch auf Epithel- und Endothelzellen zu finden (Akira 2001, Ito 2005, Kawai 2010). Diese Proteine weisen extrazellulär eine N-terminale Region mit leucinreichen Sequenzabschnitten zur Erkennung von Liganden auf. Intrazellulär erfolgt die Signaltransduktion über die zytosolische Toll-IL-1 R-Domäne (TIR). Diese TIR-Domäne des Rezeptors war auch namensgebend für die Rezeptoren, indem sowohl eine strukturelle Homologie mit dem Toll-Protein der *Drosophila melanogaster*-Fliege als auch dem IL-1 Rezeptor von Säugetieren nachgewiesen werden konnte. Beide Moleküle werden evolutionär mit Immunabwehrreaktionen in Verbindung gebracht (Wagner 2004). Die TLRs können aufgrund ihrer Liganden und ihrer Lokalisation innerhalb

einer Zelle in Subfamilien unterschieden werden. So stellen Lipide die Liganden für TLR1, TLR2, TLR4 und TLR6 dar, während Nukleinsäuren von TLR3, TLR7, TLR8 und TLR9 erkannt werden. Dabei erkennt TLR3 doppelsträngige RNA (dsRNA) von RNA-Viren, TLR7 und TLR8 identifizieren einzelsträngige RNA (ssRNA) von Viren und TLR9 hat sich auf die Erkennung von unmethylierten CpG-Sequenzen bakterieller und viraler DNA spezialisiert (Bauer 2001, Heil 2004, Mogensen 2005, Akira 2006). Die Gruppe der TLRs, die extrazellulär Lipide – beispielsweise aus Zellmembranen von Pathogenen – als Liganden verwendet, ist auf der Zelloberfläche zu finden. Dahingegen kommt die Gruppe, die fremde endozytierte Nukleinsäuren erkennt, intrazellulär vesikulär auf Endolysosomen vor (Heil 2003). In diesen mit Pathogenen beladenen Endosomen erfolgt eine Bahnung für den Einsatz des angeborenen oder adaptiven Immunsystems (Kapsenberg 2003, Wagner 2004). So erfolgt über MHC-I der Prozess der Antigen-Präsentation oder die Stimulierung cytotoxischer CD8⁺ T-Zellen zur Abwehr von Virus- und Tumorzellen durch den Einfluss der Mitglieder der TLR9-Subfamilie. Zur TLR9-Subfamilie werden TLR7, TLR8 und TLR9 gezählt, welche ihrerseits eine phylogenetische, strukturelle und funktionelle Homologie aufweisen (Tab. 1) (Wagner 2004).

Die verschiedenen Untergruppen der dendritischen Zellen exprimieren ein unterschiedliches Repertoire an TLRs, womit ihre unterschiedliche Funktion im Immunsystem reguliert werden kann. So exprimieren mDCs hohe Level an TLR1, TLR2 und TLR3 sowie geringere Level an TLR5, TLR6, TLR8 und TLR10. Dahingegen exprimieren pDCs TLR1, TLR6 und TLR10 sowie hohe Level an TLR7 und TLR9 (Kadowaki 2001). Bemerkenswerterweise wird humaner TLR9 vornehmlich von pDCs exprimiert. Sie weisen mRNA für TLR9 auf. Auch auf B-Zellen konnte eine Expression von TLR7 und TLR9 nachgewiesen werden, diese brachten aber kein IFN- α hervor. Weiterhin sind auch Monozyten, mDCs und NK-Zellen nicht in der Lage TLR9 in adäquatem Maß für eine erfolgreiche Stimulation zu exprimieren (Kadowaki 2001, Hornung 2002, Kawai 2010).

Tabelle 1: Toll-like Rezeptoren der TLR9-Subfamilie (modifiziert nach Kawai 2010).

Rezeptor	Lokalisation	Liganden	Expression auf dendritischen Zellen
TLR3	Endolysosomen	dsRNA aus Viren	mDC
TLR7	Endolysosomen	ssRNA aus Viren	pDC
TLR8	Endolysosomen	ssRNA aus Viren	mDC
TLR9	Endolysosomen	Unmethylierte CpG-DNA aus Bakterien und Viren	pDC

Neben dem natürlichen Liganden ssRNA zur Stimulation des TLR7-Rezeptors, vermögen auch synthetische Liganden, wie Resiquimod (R848) und Imiquimod (R837) eine Aktivierung von TLR7. Es konnte gezeigt werden, dass pDCs nach Stimulation mit diesen Reagenzien IFN- α , IL-6 und TNF- α produzieren (Dockrell 2001, Sauder 2003).

Dabei wirkt die von dem TLR9-Rezeptor erkannte unmethylierte CpG-DNA aus Bakterien und Viren stimulierend auf pDCs und ruft immunstimulatorische Effekte hervor indem diese im Besonderen IFN- α und darüber hinaus noch geringere Mengen an IFN- β , IFN- γ , IL-2, IL-6, IL-8 und TNF- α synthetisieren (Rothenfusser 2002, Jaehn 2008, Calzada-Nova 2010). In der Literatur wird kontrovers diskutiert, ob pDCs auch hohe Mengen des T_H1-induzierenden Zytokins IL-12 herstellen können (Krug 2001b, Rothenfusser 2002, Cox 2005, Liu 2005, Björck 2011).

Bei den synthetisch hergestellten CpG-Oligonukleotiden werden Typ A, B und C CpG-ODN unterschieden. Sie weisen Unterschiede in ihrer Nukleotidsequenz auf. Rothenfusser et al. sowie Krug et al. konnten in ihren Untersuchungen an dendritischen Zellen verdeutlichen, dass nur die pDCs sensitiv auf CpG-Oligonukleotide 2216 (Typ A) reagieren. Ähnliche Mengen an IFN- α werden von pDCs nur nach Virus-Kontakt produziert, was vermuten lässt, dass die Erkenntnis der strukturellen Beschaffenheit von ODN 2216 von pDCs einer viralen Infektion gleichgesetzt wird (Krug 2001a, Krug 2001b, Rothenfusser 2002). Weiterhin gehören die Produktion und Sekretion von Zytokinen der T_H1-Immunantwort, B-Zell-Proliferation und Hochregulation von co-stimulatorischen Molekülen, wie CD40, CD80 und CD86 zu den beschriebenen Effekten nach CpG-Kontakt (Bauer 2001, Kadowaki 2001, Agrawal 2007). Auch Struthers et al. verdeutlichten die Notwendigkeit struktureller Anforderungen an Oligonukleotide, um eine stimulierende Immunantwort über TLR9 hervorrufen zu können. Dabei ist es

bedeutend, dass mindestens ein freies 5'-Ende der Oligonukleotide vorhanden ist. Noch bessere Ergebnisse im Hinblick auf Immunreaktionen konnten in neuesten Untersuchungen mit Oligonukleotiden mit zwei freien 5'-Enden sog. *Immune stimulatory Motifs* (IMOs) erzielt werden (Struthers 2010).

Da sich auf pDCs sowohl eine hohe Dichte von TLR7- als auch TLR9-Rezeptoren befindet, bewirken diese nach Aktivierung vornehmlich die Sekretion großer Mengen an IFN- α (Facchetti 2003, Ito 2005).

Das Transfektionsreagenz Dotap kann die Übertragung von u.a. Oligonukleotiden, wie dem Stimulans CpG-ODN, in Zellen erleichtern, indem es als monokationisches Lipid die Nukleotide umlagert und Nukleinsäuren transfiziert. So wird die zelluläre Aufnahme des Mediators erhöht und das Co-Stimulans stabilisiert (Hansmann 2008). Weiterhin besitzt humanes IL-3 die Eigenschaft, dendritische Zellen zu stabilisieren und in ihrer Produktivität zu unterstützen (Jaehn 2008), indem ihre Differenzierung in Kultur mit IL-3 gefördert wird (Krug 2001b). Dieser überlebensfördernde Effekt des IL-3 auf pDCs (Ito 2001) wird auf ihre hohe Expression der IL-3-Rezeptor α -Kette, dem CD123 zurückgeführt (Grouard 1997, Colonna 2004).

Syntheseprodukte der pDCs – Interferon- α , Zytokine, Chemokine

Die besondere Fähigkeit von pDCs ist es im Vergleich zu allen anderen Zellen des humanen Blutes, exzeptionelle Mengen an Typ I Interferon herzustellen (Siegal 1999) und dies frühestens 4 Stunden nach viraler Stimulation (Kadowaki 2000). Dabei bildet den größten Anteil das IFN- α , in deutlich geringerer Menge können zudem IFN- β und IFN- ω sezerniert werden (Facchetti 2003, Liu 2005).

Die Typ I Interferone haben direkte inhibitorische Effekte auf die virale Replikation infizierter Zellen, induzieren den Abbau viraler Nukleinsäuren, führen zur Einleitung der Apoptose virusinfizierter Zellen und tragen zu der Aktivierung von Zellen des Immunsystems – insbesondere NK-Zellen, Makrophagen, B-Zellen, T-Zellen und mDCs – bei, um eine antivirale Immunantwort zu bewirken (Biron 1999, Kadowaki 2002). Akira et al. und Takeuchi et al. konnten darüber hinaus auch deutlich machen, dass IFN- α darüber hinaus eine bedeutende Rolle in der Bekämpfung von bakteriellen und parasitären Infektionen hat (Akira 2001, Takeuchi 2009).

Sowohl die Typ I Interferone als auch das proinflammatorische TNF- α tragen zur Reifung und Differenzierung der pDCs bei, die entscheidenden Einfluss auf die T-Zell-Antwort und Etablierung der T-Gedächtniszellen haben (Liu 2005). IFN- α gilt neben IL-12 als eines der Hauptmetabolite, um T_H1-Reaktionen zu induzieren (Rothenfusser 2002). Es verbindet über seine unterschiedlichen Funktionen das angeborene und adaptive Immunsystem (Belardelli 2002a).

Die pDCs exprimieren intrazellulär endosomal TLR7 und TLR9, welche einzelsträngige RNA respektive CpG-DNA von eingedrungenen RNA/DNA-Viren erkennen. Dieser Vorgang dient zur Aktivierung von NF- κ B über den MyD88-abhängigen Signalweg (Ito 2005). Durch die virale Infektion kommt es zur Phosphorylierung und Translokation des Transkriptionsfaktors IRF-3 in den Nukleolus, wo die Transkription des Gens für IFN- β angestoßen wird. Über einen weiteren Jak/Stat-Signalweg kommt es zur Synthese des Transkriptionsfaktors IRF-7, welcher eine starke Aktivierung der Transkription von Genen für IFN- α und IFN- β bewirkt. Die Fähigkeit der pDCs IRF-7 herzustellen führt zur schnellen Produktion großer Mengen IFN- α (Abb. 4) (Liu 2005).

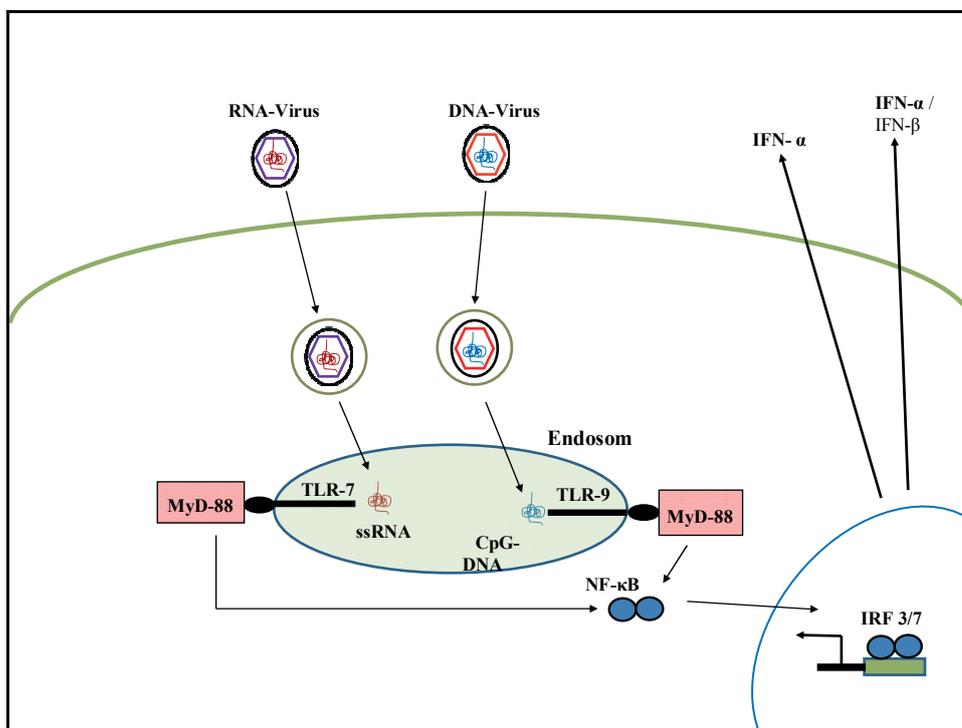


Abbildung 4: Signalkaskade der IFN- α Produktion durch pDCs (modifiziert nach Ito 2005).

Die pDCs exprimieren intrazellulär endosomal TLR7 und TLR9 zum Erkennen eingedrungener RNA/DNA-Viren. Über die gezeigte Signalkaskade kommt es zur Synthese der Transkriptionsfaktoren IRF-3 und IRF-7, wodurch die Transkription von Genen für IFN- α und IFN- β bewirkt wird.

Die pDCs stellen neben ihrem Hauptprodukt, dem IFN- α noch weitere Zytokine her, welche Funktionen im Immunprozess übernehmen. Darüber hinaus veranlassen sie weiterhin andere Immunzellen Zytokine zu produzieren (Tab. 2).

Tabelle 2: Zytokinproduktion der pDCs und deren Wirkung (modifiziert nach Jaehn 2008, Calzada-Nova 2010).

Zytokine	Wirkung
IFN- α	Antiviral
IFN- β	Antiviral
IFN- γ	Fördert T _H 1 und zelluläre Immunität, aktiviert Makrophagen
IL-6	Inflammation, B-Zell-Differenzierung, CTL-Differenzierung
IL-8	Chemotaxis
IL-12	Aktivierung von T _H 1, antikanzerogen → Hemmung der Angiogenese
TNF- α	Differenzierung von pDCs in APCs, Inflammation – Akutphase

So zeigten Farkas et al., dass pDCs nach Stimulation mit CpG-ODN 2216 IFN- α ausschütten, welches wiederum CD4⁺ T-Gedächtniszellen dazu veranlasst, heranzureifen und ihrerseits IFN- γ und IL-10 zu produzieren. IFN- γ und IL-10 spielen eine Rolle in mehreren infektiösen Erkrankungen, wobei IL-10 eine immunregulatorische Funktion zum Schutz vor autoaggressiven Mechanismen hat und in T_H2-Reaktionen involviert ist. Es wirkt antiinflammatorisch und hemmt die T_H1-Antwort (Belardelli 2002b, Farkas 2006). Weiterhin können allogene pDCs CD8⁺ regulatorische T-Zellen induzieren, die ihrerseits in der Lage sind, Antworten von T-Gedächtniszellen zu hemmen. Diese Fähigkeit könnte als Immuntherapeutikum in der Transplantationsmedizin von Nutzen sein (Boor 2011). Die einzigartige Fähigkeit der pDCs regulatorische T-Zellen zur Produktion von IL-17 zu veranlassen, wurde von Gautreau et al. untersucht. Dabei wird ihre Differenzierung durch sezerniertes IL-6 begünstigt (Gautreau 2011). Giordani et al. konnten zeigen, dass IFN- α einen induktiven Effekt auf naive B-Zellen und die Immunglobulin-Produktion, vornehmlich IgG und IgM, sowie die Sekretion von IL-6, IL-10, TNF- α und IL-1- β hat (Jego 2003, Giordani 2009).

Weitere Zytokine, die von den pDCs produziert werden, sind die Chemokine. Sie sind in der Lage eine Immunantwort zu initiieren, indem sie eine Chemotaxis, d.h. eine zielgerichtete Fortbewegung von Immunzellen in Richtung eines Konzentrationsgradienten zum Ort der höchsten Konzentration, bewirken. Chemokine werden zum einen

nach ihrer Funktion in zwei Gruppen eingeteilt: konstitutiv/ homöostatisch versus induzierbar/ inflammatorisch. Des Weiteren werden sie aufgrund ihrer Aminosäuresequenz in zwei unterschiedliche Familien eingeteilt: CC- bedeutet dabei zwei Zysteine im N-terminalen Teil respektive CXC- wenn sich zwischen beiden Cysteinen eine weitere Aminosäure befindet. Ergänzt wird die jeweilige Bezeichnung durch ein L sowie eine Nummer, wobei das L für Ligand steht. Erkennt werden Chemokine von Chemokinrezeptoren, deren Benennung jener der Chemokine folgt. Dabei gilt, dass mehrere unterschiedliche Chemokine in der Lage sind, einen Rezeptor zu aktivieren. Dahingegen vermag auch ein einzelnes Chemokin an verschiedene Rezeptoren zu binden (Zlotnik 2000, Rot 2004, Allen 2007).

Piqueras et al. konnten zeigen, dass pDCs eine Reihe von Chemokinen produzieren. So wurde aufgezeigt, dass unstimulierte pDCs CXCL4 und CXCL7 ausschütten sowie geringe Mengen an CXCL8 und CXCL16. Nach Exposition der pDCs gegenüber einem Influenza-Virus wurden diese Chemokine herunterreguliert und zwölf weitere Chemokine vornehmlich produziert. Dazu gehörten Chemokine, welche Neutrophile anlocken: CXCL1, CXCL2 und CXCL3. Weiterhin Chemokine, die an der inflammatorischen Immunantwort beteiligt sind: besonders CCL3, CCL4 und CCL5 sowie Interferon-induzierbare Chemokine: CXCL9, besonders CXCL10, und CXCL11. Auch Chemokine, die sonst in lymphoidem Gewebe nachgewiesen werden, konnten dargestellt werden: CCL19, besonders CCL22 und CXCL13. Diese Chemokine werden nach unterschiedlichen Zeitintervallen von einigen Stunden sezerniert. Dabei sind CXCL1, CXCL2, CXCL3 und CXCL16 in der Lage als initiale angeborene Abwehr Neutrophile, cytotoxische T-Zellen und NK-Zellen anzulocken, wodurch die Ausbreitung einer Infektion limitiert werden kann. Als nächstes werden CCL3, CCL4, CCL5, CXCL8, CXCL9, CXCL10 sowie CXCL11 ausgeschüttet, um T-Gedächtniszellen und Monocyten zu aktivieren. Wahrscheinlich erfolgt dieser Schritt um den Pool an DCs aufzufüllen und um Gewebs-Makrophagen bereitzustellen. Die reifen DCs sezernieren angekommen in den sekundären lymphatischen Organen Chemokine, um B-Zellen und naive T-Lymphozyten anzulocken und zu *primen*: CCL19, CCL22 und CXCL13 (Tab. 3) (Penna 2002, Charo 2006, Piqueras 2006, Pérez-Cabezas 2011).

Tabelle 3: Von aktivierten pDCs produzierte Chemokine und exprimierte Chemokinrezeptoren (modifiziert nach Zlotnik 2000, Piqueras 2006).

Chemokinrezeptor	Chemokine	Wirkung auf:
CCR1 (CD191), CCR5 (CD195)	CCL3	T _{mem} , Monozyten
CCR5 (CD195)	CCL4	T _{mem} , Monozyten
CCR1 (CD191), CCR3 (CD193), CCR5 (CD195)	CCL5	T _{mem} , Monozyten
CCR7 (CD197)	CCL19	B-Zellen, naive T-Zellen
CCR4 (CD194)	CCL22	B-Zellen, naive T-Zellen
CXCR2 (CD182) > CXCR1 (CD181)	CXCL1	Neutrophile, CTL, NK-Zellen
CXCR2 (CD182)	CXCL2	Neutrophile, CTL, NK-Zellen
CXCR2 (CD182)	CXCL3	Neutrophile, CTL, NK-Zellen
CXCR3 (CD183)	CXCL9	T _{mem} , Monozyten
CXCR3 (CD183)	CXCL10	T _{mem} , Monozyten
CXCR3 (CD183)	CXCL11	T _{mem} , Monozyten
CXCR5 (CD185)	CXCL13	B-Zellen, naive T-Zellen

pDCs in der Immunabwehr humaner Erkrankungen und Autoimmunität

Plasmacytoide dendritische Zellen spielen, neben ihrer Funktion als Antigen-präsentierende Zellen, besonders durch ihre Fähigkeit IFN- α und andere Zytokine sowie Chemokine zu produzieren, eine entscheidende Rolle in Abwehrreaktionen des angeborenen und erworbenen Immunsystems. Unterschiedliche Spiegel, an insbesondere IFN- α , haben großen Einfluss auf die Entstehung von Autoimmunerkrankungen, wie dem systemischen Lupus erythematodes (SLE), der Psoriasis Vulgaris oder der Rheumatoiden Arthritis (RA), viralen Infektionen, dazu gehörend auch das humane Immundefizienz-Virus (HIV), dem Hepatitis-C-Virus (HCV) und Herpes-Infektionen sowie der Entstehung von Karzinomen (Abb. 5) (Shannon 2002, Ueno 2007, Fitzgerald-Bocarsly 2008, Swiecki 2010a).

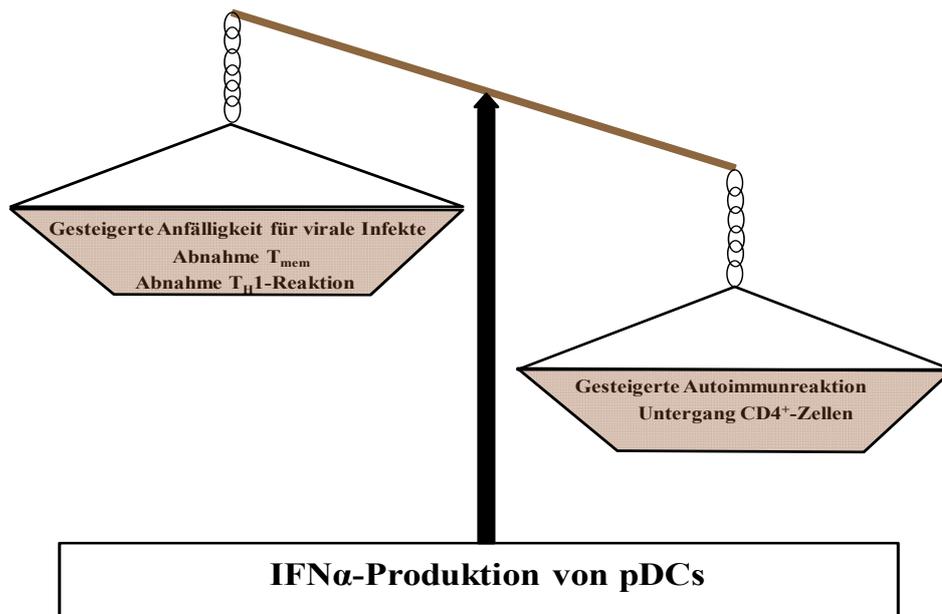


Abbildung 5: Unterschiedliche Spiegel an IFN- α – Einfluss auf das Immunsystem (modifiziert nach Fitzgerald-Bocarsly 2008).

Der Spiegel an IFN- α hat Einfluss auf eine regelrechte Immunantwort. Eine Verschiebung aus dem Gleichgewicht hin zu höheren oder niedrigeren IFN- α -Mengen bewirkt pathologische Veränderungen (\uparrow Autoimmunität bzw. \downarrow Immundefizienz).

Im Falle der Autoimmunerkrankungen SLE, Psoriasis und RA konnte gezeigt werden, dass pDCs die Zielorgane, wie Haut und Synovia der Gelenke infiltrieren (Demidem 1991, Thomas 1994, Denfeld 1997). Dort produzieren sie, nach Kontakt mit Verbindungen bestehend aus körpereigener DNA/RNA und antimikrobiellen Immunkomplexen, exzessive Mengen an IFN- α (Johnson-Huang 2009, Swiecki 2010a).

Hingegen steht bei einer Infektion mit HIV der Abbau respektive die Dysfunktion der pDCs im Vordergrund. Durch ihre Expression an geringen Mengen von CD4 sowie den HIV Co-Rezeptoren CXCR4 und CCR5 stellen sie Zielzellen des HI-Virus dar (Patterson 2001). Die zunächst hohe Produktion an IFN- α , hervorgerufen durch das HI-Virus, führt zur Hochregulation des TNF-Liganden (TRAIL), welcher als Ligand zur Einleitung der Apoptose von uninfizierten CD4⁺ T-Zellen führt (Herbeuval 2006). Der im weiteren Verlauf fortschreitende Untergang von pDCs und der daraus resultierenden Abnahme an IFN- α steht in Zusammenhang mit der Entstehung opportunistischer Infektionen, wie dem Kaposi-Sarkom (Soumelis 2001).

Im Falle einer Infektion mit HCV vermitteln pDCs die Rekrutierung von T-Zellen in die Leber (Lau 2008). Auch beim Auftreten von Herpes simplex-Infektionen begünstigen

sie die Rekrutierung von cytotoxischen T-Zellen, die sich gegen die eingedrungenen Viren richten. Zudem können sie durch ihre Produktion von IFN- α die Immunreaktion kontrollieren (Wang 2006). Die pDCs sind zwingend notwendig, um bei Infektionen mit persistierendem Virus die Kontrolle über Virusverbreitung und Virämie durch CD8⁺ T-Zellen aufrechtzuerhalten (Cervantes-Barragan 2012).

Ebenfalls beachtlich ist die Rolle der pDCs bei Krebserkrankungen. So können pDCs solide Tumore infiltrieren (Vicari 2002). Diese pDCs zeichnen sich durch Induktion von regulatorischen T-Zellen, die IL-10 produzieren und damit Immuntoleranz bewirken, aus. Die Fähigkeit zur Aktivierung von T-Zellen hingegen scheint bei diesen pDCs verloren gegangen zu sein. Somit kann die Entwicklung der Tumorzellen begünstigt werden (Zou 2001). Treilleux et al. zeigten, dass hohe Mengen an pDCs bei Brustkrebs positiv mit einem erhöhten Risiko für ein Tumorrezidiv bzw. die Tumorzellstreuung korrelieren (Treilleux 2004).

Physiologischerweise wird IFN- α ein antitumoröser Effekt zugeschrieben, indem es als Mediator bei der Aktivierung cytotoxischer T-Lymphozyten und NK-Zellen dient (Jacobs 2008a). Des Weiteren konnten Papewalis et al. den pDCs eine antitumorale Aktivität über TRAIL zuschreiben. Darüber hinaus haben sie auch eine negative Wirkung auf die Angiogenese, so dass die Blutversorgung eines Tumors reduziert werden kann (Papewalis 2008). Auch den von pDCs produzierten Chemokinen wird eine protektive Funktion gegen Karzinome zugeschrieben (Zlotnik 2000).

1.2 Stand der Forschung

Methoden – Stimulation und Färbung von pDCs

Die in der vorliegenden Arbeit verwendete Methode wurde entwickelt, indem immer wieder alternative Versuchsansätze, die Verwendung geeigneter Reagenzien und Versuchsabläufe sowie die Konzentrationen der Reagenzien optimiert wurden. Unter Berücksichtigung von entsprechender Fachliteratur zu vergleichbaren Zielsetzungen konnten im Rahmen dieser Methodik wichtige Hinweise verwendet werden. So zeigten Krug et al., dass die Verwendung von CpG-ODN 2216 für die Stimulation von pDCs in einer bestimmten Konzentration die höchste Menge an IFN- α hervorbringen kann (Krug 2001a). Auch Adam et al. bestätigten, dass die beste Ausbeute an IFN- α mit CpG-Oligonukleotiden vom Typ A erzielt werden kann. Eine Inkubationszeit von ca. 4 Stunden erbrachte die besten Ergebnisse, nach noch längerer Einwirkungszeit der Stimulan-

Die Ausschüttung des Zytokins ab. Zudem konnten sie aufzeigen, dass unter Zugabe von Dotap zu dem Stimulans CpG-ODN 2216 die IFN- α -Produktion noch weiter verbessert werden konnte, da Dotap die Oligonukleotide zu stabilisieren vermochte (Adam 2012). Hansmann et al. machten ebenfalls von diesem stabilitätsfördernden Effekt Gebrauch und konnte eindeutige Ergebnisse erzielen (Hansmann 2007). Dzionek et al. führten vor, dass pDCs sowohl BDCA-2 als auch BDCA-4 exprimieren. Jedoch stellte sich heraus, dass Anti-BDCA-2 Antikörper an eine Subpopulation der pDCs binden und die Produktion von IFN- α inhibieren. Dadurch sei es sinnvoller, pDCs mit BDCA-4 anzufärben, um derartige unerwünschte Wirkungen auszuschließen (Dzionek 2001). Adams et al. zeigten zudem eindrucksvoll, dass pDCs spezifisch mit BDCA-4 sowie CD123 markiert werden können. Sie waren Lineage Cocktail 1-negativ und exprimierten MHC-II (Adams 2012).

Unter Kenntnis dieser Details konnte die hier verwendete Methode weiter optimiert werden. Die Konzentrationen der einzelnen Reagenzien wurden weiterhin angepasst, um die besten Resultate zu erzielen.

Zytokinproduktion von pDCs

Die außerordentliche Fähigkeit der pDCs große Mengen an IFN- α herzustellen, wurde ausführlich von Siegal et al. beschrieben (Siegal 1999).

Im Laufe der vergangenen Jahre konnten weitere Untersuchungen von verschiedenen Autoren aufzeigen, dass pDCs darüber hinaus, nach geeigneter Stimulation, in der Lage sind, noch weitere Zytokine hervorzubringen. So konnten Jaehn et al. demonstrieren, dass humane pDCs nach Stimulation mit CpG-ODN 2216 (Typ A) in Kombination mit IL-3 die Zytokine IFN- α , IL-6, IL-8, TNF- α und TNF- β hervorbringen konnten. Darüber hinaus wiesen sie nach, dass diese pDCs zur selben Zeit auch bestimmte Oberflächenmarker, wie CD40, CD80 und CD86 exprimierten (Jaehn 2008).

Krug et al. führten eine Aktivierung von humanen pDCs durch Stimulation mit CpG-ODN 2006 durch und fanden heraus, dass diese neben IFN- α , IL-8 und IL-12 produzieren. Die Menge an IL-12 konnte dabei durch Zugabe von IL-3 zum Stimulans gesteigert werden. Es fand eine Verschiebung der Produktion von IFN- α hin zu IL-12 statt. Auch sie zeigten, dass die Marker CD40, CD80, CD83 und CD86 nach Stimulation vermehrt exprimiert wurden. Ferner konnten sie verdeutlichen, dass pDCs nach Aktivierung den Chemokinrezeptor CCR7 rapide hochregulieren. Dieser gilt als Mediator für das

„*homing*“ von Immunzellen und befähigt die pDCs sich mit naiven T-Zellen und T-Gedächtniszellen zu vergesellschaften. Die Expression des Chemokins CXCR3 blieb unverändert (Krug 2001b).

Auch Calzada-Nova et al. stimulierten pDCs von Schweinen mit CpG-ODN Typ A und stellten fest, dass diese proinflammatorische Cytokine, wie IL-6, IL-8, IL-12, IFN- γ und TNF- α hervorbringen konnten. Dabei zeigten sich für IL-6, IL-12 und TNF- α signifikante Mengen, wobei IL-8 und IFN- γ nur in geringer Menge ausgeschüttet werden konnte. Es wurde auch demonstriert, dass weder IL-1, IL-4 noch IL-10 detektierbar waren. Auch sie konnten aufführen, dass eine vermehrte Expression von CD80 und CD86 stattfand (Calzada-Nova 2010).

Litinskiy et al. zeigten auf, dass pDCs neben der Produktion von IFN- α und Interleukinen auch BAFF, einen B-Zell-Aktivierungsfaktor aus der Familie der TNF-Rezeptoren Familie, auf ihrer Membran exprimieren. Es kann durch IFN- α hochreguliert werden (Litinskiy 2002). Auch MacLennan et al. bestätigten das Vorkommen von BAFF auf pDCs (MacLennan 2002).

Die Fähigkeit der pDCs IL-12 zu produzieren, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So sind beispielsweise Rothenfusser et al., Cox et al., Krug et al. und Hoshino et al. durch ihre Untersuchungen zu den Schluss gekommen, dass humane pDCs in der Lage sind, IL-12 zu produzieren (Krug 2001, Rothenfusser 2002, Cox 2005, Hoshino 2006). Wohingegen Hammond et al., Ito et al. und Rissoan et al. postulieren, dass pDCs nicht in der Lage sind, IL-12 zu sezernieren, sondern, dass dies nur die mDCs leisten können (Rissoan 1999, Ito 2005, Hammond 2010, Liu 2005). Liu et al. sowie Björck et al. deklarieren, dass nur pDCs der Maus fähig sind, IL-12 zu sezernieren (Liu 2005, Björck 2011).

Rolle und Funktionen der pDCs im Immunsystem

Da die pDCs eine kontroverse Rolle hinsichtlich ihrer Funktionen im Immunsystem einnehmen, ist diese kleine Population der peripheren Blutzellen in besonderem Interesse von Forschungsüberlegungen.

Dass sie die Hauptproduzenten von Typ I Interferonen, insbesondere IFN- α sind, konnte schon früh demonstriert werden. Auch dass sie darüber hinaus befähigt sind, noch weitere immunregulatorische Zytokine zu produzieren, wurde an vorheriger Stelle dieser

Arbeit beschrieben. Aufgrund dieser Fähigkeiten werden ihnen verschiedene Funktionen in Immunprozessen zugeschrieben, wodurch sie das angeborene und adaptive Immunsystem verbinden können. Die pDCs kombinieren dabei Eigenschaften, welche den Lymphozyten zugeschrieben werden und Eigenschaften, die zu klassischen dendritischen Zellen passen (Reizis 2011).

Aufgrund der Produktion von IFN- α spielen sie eine entscheidende Rolle in der Abwehr viraler Infektionen (Biron 1999, Kadowaki 2002). In diesem Zusammenhang tragen sie zu einer antigen-spezifischen T-Zell-Antwort bei und übernehmen wichtige Aufgaben in der Regulation von Entzündungen. Dementgegen steht ihre bedeutende Rolle bei der Ausübung von Toleranzfunktionen, u.a. auch in Autoimmunprozessen und kanzerogenen Prozessen (Reizis 2011, Takagi 2011).

1.3 Fragestellung

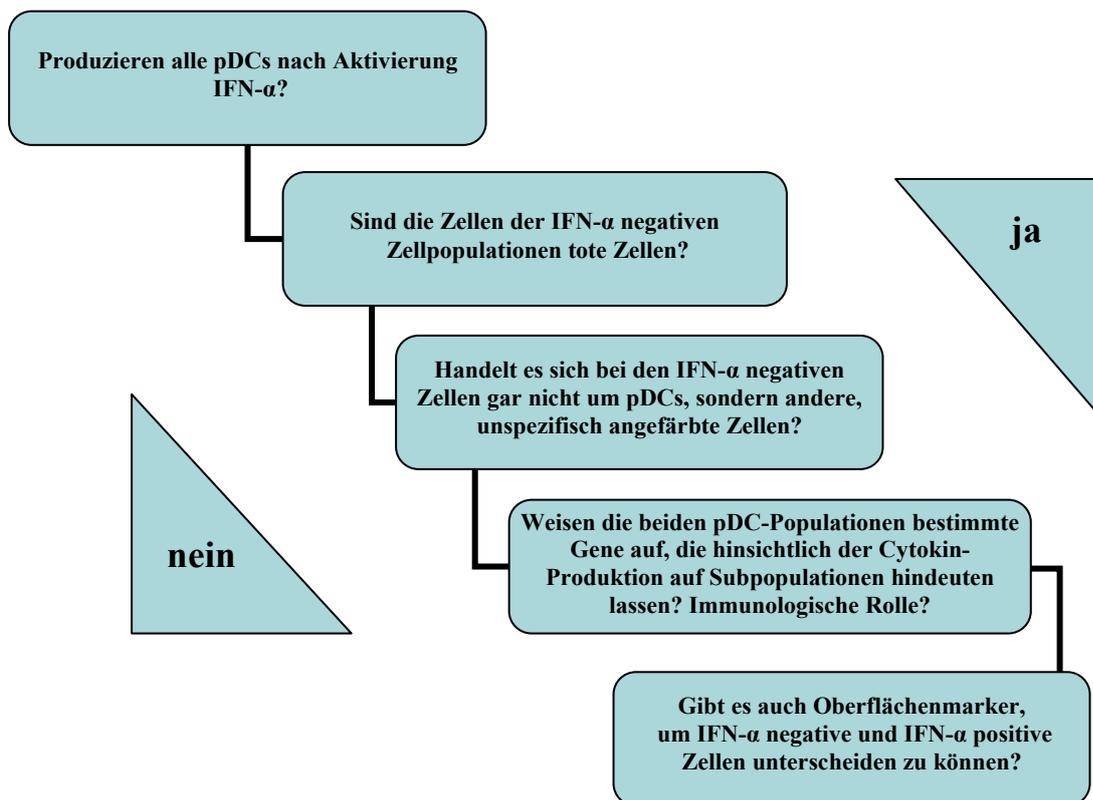


Abbildung 6: Übersicht zur Fragestellung

Gegenstand der Untersuchung in diesem Projekt sind humane pDCs. Aus der Literatur ist bekannt, dass sie nach Aktivierung als die Hauptproduzenten von IFN- α gelten (Cella 1999, Siegal 1999, Kadowaki 2000, Colonna 2002). Sie stellen eine sehr kleine Popu-

lation im peripheren Blut, mit einem Anteil von 0,2-0,8 %, dar und sind Teil des angeborenen Immunsystems (Liu 2005).

Diese kleine Zellpopulation soll anhand ihrer Fähigkeit, IFN- α zu produzieren in zwei Subpopulationen aufgeteilt werden. Nach der Sortierung soll weiterhin eine genauere Untersuchung dieser beiden Subpopulationen erfolgen. Basierend auf ihrer Genexpression können dann ihre Zytokinproduktion und damit verbundene immunologische Funktionen sowie ihre Oberflächenmarkerexpression zur ggf. leichteren Differenzierung der Fraktionen genauer betrachtet werden.

Da den pDCs in der Literatur verschiedene konträre immunologische Funktionen zugeschrieben werden, die nicht allein auf ihre IFN- α -Produktion zurückgeführt werden können, gilt ein besonderes Interesse der IFN- α -negativen Zellpopulation. Sie sollen daher genauer erforscht werden. Hierbei stellt sich die Frage, ob diese Zellen die Fähigkeit haben, stattdessen ein anderes Zytokin zu produzieren, das ihnen damit eine bestimmte immunologische Rolle zukommen lässt. Oder produzieren diese Zellen gar keine Zytokine, sind sie tote Zellen oder ist eine etwaige Produktion nicht nachweisbar? Denkbar wäre auch, dass diese Zellen einer unterschiedlichen Kinetik folgen und aufgrund regulatorischer Mechanismen besondere Voraussetzungen benötigen, um Zytokine produzieren zu können.

Um diesen interessanten Punkten (Abb. 6) nachzugehen, wurde im Folgenden ein Lösungsansatz entwickelt.

1.4 Lösungsansatz

Um der Fragestellung nachzugehen, sollten die Zellen intrazellulär für IFN- α angefärbt werden. Dabei wurde ein Protokoll entwickelt, um die Zellen möglichst schonend zu behandeln und dadurch ihre RNA für weitere Schritte erhalten zu können. Dabei wurde nach vorangegangener Präparation und Stimulation der Zellen Paraformaldehyd 4 % zum Fixieren sowie Saponin 0,1 % für die Permeabilisation der Zellen verwendet, um sie für Antikörper aufnahmefähig zu machen. Danach folgte die Intrazellulärfärbung. Leider konnte aufgrund der Aggressivität der verwendeten Materialien, auch nach mehrfacher Abwandlung des Protokolls und Konzentrationsänderung der verwendeten Reagenzien, kein zufriedenstellender Erhalt der RNA erreicht werden. Ein weiteres Problem war die unzureichende Vitalität der Zellen nach erfolgter Behandlung. Die Qualität und Menge der isolierten RNA war für Genexpressionsanalysen nicht geeignet.

Um einen besseren Erhalt der Zellen und ihrer RNA zu gewährleisten, sollte eine andere Methode zum Einsatz kommen. Mittels des Protokolls zur Oberflächenmarkierung der IFN- α -Produktion wurde das ausgeschüttete IFN- α der pDCs nach vorheriger Stimulation an den Zellen gebunden und diese somit markiert. Ferner war somit eine Identifikation als IFN- α produzierend oder nicht-IFN- α produzierend möglich.

Zur Validierung der Stimulation sollte eine Intrazellulärfärbung der pDCs mit TLR9 erfolgen.

Die so markierten Zellen wurden im weiteren Verlauf mittels des Durchflusszytometer/Sorter FACS Aria III sortiert und unter Berücksichtigung ihrer Vitalität – festgestellt durch Zugabe des Sytox® Blue *Dead Cell Stain* – differenziert.

Nach Erhalt der gewünschten Zellpopulationen sollte die RNA isoliert werden und in cDNA, als Vorbereitung für Genexpressionsanalysen, umgeschrieben werden.

Nach Erhalt der cDNA konnte diese in zwei Versuche, der Durchführung einer RT-PCR zur Betrachtung der Genexpression im Hinblick auf humane Zytokine sowie humane Zelloberflächenmarker, eingehen. Diese Array-Analysen dienten zum einen als Validierung für die Methodik der pDC-Gewinnung anhand des Protokolls zur Oberflächenmarkierung der IFN- α -Produktion und des Sortierungsvorgangs als auch zum anderen als Vorbereitung auf das Hauptprojekt – die Durchführung eines *DNA-Oligonukleotid-Microarray*-Experiments.

Dieser DNA-Oligonukleotid-Microarray sollte neue Erkenntnisse über die Genexpression und damit verbundene Zytokinproduktion der pDCs hervorbringen, als auch einen Einblick in die Zuordenbarkeit immunologischer Funktionen zu den einzelnen Subpopulationen liefern. Besondere Beachtung sollte hier die IFN- α -negative Population finden, da es zu ihr nur wenig Literatur gibt und es interessant erscheint herauszufinden, ob ihnen spezielle bekannte Funktionen im Immunsystem zugeordnet werden können, die als konträr zur eigentlichen immunologischen Rolle der pDCs gelten.

Daneben sollte nach Durchführung der RT-PCR zur Feststellung der Genausstattung für Oberflächenmarker für einen weiteren Zugewinn an Erkenntnissen eine Färbung mit ausgewählten Oberflächenmarkern, u.a. auch CD9, erfolgen. Von Interesse war dabei, ob pDCs schon unstimuliert anhand von bestimmten Oberflächenmarkern diskriminierbar sein könnten und ob die beiden Subpopulationen – IFN- α -positiv und IFN- α -negativ – anhand einzelner Oberflächenmarker unterscheidbar sein könnten.

2. Material und Methoden

2.1 Reagenzien

Reagenzien und Puffer:

BSA (Bovine serum albumin), *ServaElectrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland*

EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure), *Titriplex®III, Merck, Darmstadt, Deutschland*

Eosin Y, *Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.*

Eukitt Eindeckmittel, *VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland*

Ficoll-Paque™ Plus, *GE Healthcare, Uppsala, Schweden*

Hämatoxylin Formulierung Gill Nr.1, *Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.*

HBSS (Hank's Buffered Salt Solution), *PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich*

HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure, 1M), *Invitrogen, Auckland, Neuseeland*

Paraformaldehyd 4 %, *Merck, Darmstadt, Deutschland*

PBS (Phosphate-buffered saline, pH 7,2), *PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland*

RNeasy Lyse-Puffer (RLT), *Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland* + β -Mercaptoethanol (β -ME), *Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.* (1 ml + 10 μ l)

Saponin from Quillaja Bark purified 0,1 %, *Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.*

Sorting Puffer (HBSS/EDTA (2 mM)/HEPES (25 mM), pH 8,0

Staining Puffer (0,1 % PBS + 0,5 % BSA)

Sytox® Blue *Dead Cell Stain, InvivoGen, San Diego, USA*

Washing Puffer PBS (pH 7,2)/EDTA (2 mM)/BSA (0,5 %)

Xylen, *Sigma-Aldrich, Missouri, U.S.A.*

Zellkulturmedium:

RPMI 1640, *PAA Laboratories GmbH, Pasching, Österreich* plus 5 % Humanserumalbumin, *CSL Behring, Marburg, Deutschland*

X-Vivo™ 15, Serum-freies Medium, *Lonza GmbH, Köln, Deutschland*

Stimulantien:

CpG-ODN 2216 (CpG oligonucleotide type A-Human TLR9 ligand), *InvivoGen, San Diego, USA*

Dotap (Liposomal Transfection Reagent), *Roche Applied Sciences, Mannheim, Deutschland*

IL-3 (recombinant Human Interleukin 3), *PromoKine, Heidelberg, Deutschland*

R848 (Imidazoquinoline Compound – TLR7/8 ligand), *InvivoGen, San Diego, USA*

Antikörper:

CD2 (PE-Cy7), *BioLegend, San Diego, USA*

CD 3 (APC-H7), *BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*

CD 9 (FITC), *BioLegend, San Diego, USA*

CD19 (Pacific Blue), *BioLegend, San Diego, USA*

CD21 (FITC), *BioLegend, San Diego, USA*

CD22 (FITC), *BioLegend, San Diego, USA*

CD26 (FITC), *BioLegend, San Diego, USA*

CD95 (PE-Cy7), *BioLegend, San Diego, USA*

CD123 (PE-Cy7), *BioLegend, San Diego, USA*

CD161 (FITC), *BioLegend, San Diego, USA*

CD209 (PE-Cy7), *BioLegend, San Diego, USA*

CD303 (BDCA-2) (APC), *Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland*

CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) (APC), *Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland*

CD304 (BDCA-4/Neuropilin-1) (PE), *Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland*

IFN- α Catch Reagent (PE) (IFN- α Secretion Assay Detection Kit human, *Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland*)

IFN- α Detection Antibody (PE) (IFN- α Secretion Assay Detection Kit human, *Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland*)

Lineage Cocktail 1 – CD3, CD14, CD16, CD19, CD20, CD 56 (FITC), *BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*

TLR9 (APC), *BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*

Isotyp-Kontrollen

Mouse IgG1, k (PE), *BioLegend, San Diego, USA*

Mouse IgG1, k (PE-Cy7), *BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*

Mouse IgG1, k (FITC), *BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*

Mouse IgG2a, k (APC), *BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*

Assays:

BD Cytotfix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit, *BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*

QuickAmp Labeling Kit (*Agilent Technologies, Böblingen, Germany*).

RNeasy Mini Kit, *Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland*

RT² Nano PreAmp cDNA-Synthesis Kit, *SABiosciences, Frederick, USA*

RT² Nano PreAmp cDNA-Synthesis Primer Mix – Human Common Cytokines, *SABiosciences, Frederick, USA*

RT² Nano PreAmp cDNA-Synthesis Primer Mix – Human Cell Surface Markers, *SABiosciences, Frederick, USA*

RT² SYBR® Green/ROX™ qPCR Master Mix, *SABiosciences, Frederick, USA*

RT² Profiler™ PCR Array: Human Common Cytokines, *SABiosciences, Frederick, USA*

RT² Profiler™ PCR Array: Human Cell Surface Markers, *SABiosciences, Frederick, USA*

Whole-Human Genome-Microarray Kit 4x44k (*Agilent Technologies, Böblingen, Germany*)

Geräte:

Automatischer Hämatologie-Analysator KX-21 N, *Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Deutschland*

Durchflusszytometer FACS Canto II, *BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*

Durchflusszytometer/Sorter FACS Aria III, *BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*

NanoDrop® ND 1000 Spektralphotometer, *NanoDrop Technologies, Wilmington, USA*

Real-Time-PCR Step One Plus RT-PCR-System, *Applied Biosystems, Foster City, USA*

Thermocycler Gene Amp PCR System 9700, *Applied Biosystems, Foster City, USA*

Zentrifuge Rotina 380R, *Hettich, Tuttlingen, Deutschland*

Zentrifuge Mikro 20, *Hettich, Tuttlingen, Deutschland*

Microarray Scanner Axon A4100, *Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, USA*

Software:

FACSDiva Software, Version 6.1.3., *BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*

R: A language and environment for statistical computing mit Erweiterungspaket Limma: linear models for microarray data, (*R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>*)

Step One Software, *Applied Biosystems, Foster City, USA*

Software des Microarray Scanners Axon A4100: GenePix Version 5.0 Pro, *Molecular Devices, LLC, Sunnyvale, USA*

Verbrauchsmaterialien

Deckgläser, *Menzel, Braunschweig, Deutschland*

FACS-Röhrchen 5 ml, 75 x 12 mm, *Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland*

Objektträger Superfrost, *Menzel, Braunschweig, Deutschland*

Polypropylen (PP)-Röhrchen, Cellstar® steril 15 ml/ 50 ml, *Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland*

24-Well Flachbodenplatte, *Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland*

2.2 Zellmaterial

Um die Zellen für die vorliegende Arbeit zu gewinnen, wurden Leukozyten aus Rest-Buffy Coats isoliert. Bei den Buffy Coats handelt es sich um eine Zellansammlung bestehend aus Leukozyten und Thrombozyten, die durch Zentrifugation aus Vollblutkonserven von Blutspendern gewonnen wurden. Die Spender setzten sich aus einer homogenen Gruppe aus gesunden Männern und Frauen im Alter von 20 bis 40 Jahren zusammen, die zuvor ihr Einverständnis gegeben hatten.

2.3 Zellaufbereitung

Aus den Rest-Buffy Coats wurden mittels Ficoll-Paque® Dichtegradienten und Zentrifugation mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs – *Peripheral Blood Mononuclear Cells*) gewonnen (Böyum 1968). Aufgrund ihrer spezifischen Dichte sammeln sich die PBMCs in einer Phase zwischen Ficoll und Plasma, während die Erythrozyten und Granulozyten das Ficoll durchwandern und sich darunter ablagern. Dazu wurden 60 ml Blut mit 60 ml PBS gemischt. In 50 ml PP-Röhrchen wurde 15 ml Ficoll vorgelegt und dann 35 ml des Blut/PBS-Gemischs vorsichtig darauf geschichtet. Danach wurden die Proben bei 1700 UpM für 30 Minuten ohne Bremse zentrifugiert (*Hettich Rotina 380R, Tuttlingen, Deutschland*). Diese Zentrifuge kam bei allen weiteren genannten Arbeitsschritten zum Einsatz. Die entstandenen Zellringe wurden mit sterilen Pipetten abgenommen und in frische 50 ml PP-Röhrchen überführt. Nachdem die Röhrchen mit PBS aufgefüllt wurden, folgte der Waschvorgang. Insgesamt folgten drei Durchläufe, einmal bei 1700 UpM, einmal bei 800 UpM und das dritte Mal bei 700 UpM, um restliche, die Probe verunreinigende Thrombozyten und tote Zellen zu beseitigen. Zum Schluss wurden die so gewonnenen Zellen in 2 ml RPMI-Medium 1640 plus 5 % Humanserumalbumin aufgenommen.

2.4 Kultivierung und Stimulation als Vorbereitung auf die Oberflächenmarkierung der IFN- α -Produktion

Nachdem die Zellen am automatischen Zell-Counter (*Sysmex F-820, Syntex, Norderstedt, Germany*) gezählt wurden, konnte die Zellzahl auf 1×10^7 eingestellt werden. Pro Spender wurden zwölf Wells einer 24-Well-Platte mit je 1×10^7 Zellen befüllt. Das Zellvolumen wurde daraufhin in den Wells bis auf ein Milliliter mit dem Medium aufgefüllt.

Für die Stimulation wurden in einem sterilen Eppendorfgefäß pro Well 17 µl des TLR9-Liganden CpG-ODN 2216 in einer Endkonzentration von 5 µg/ml, 10 µl Dotap Liposomal Transfection Reagent in einer Konzentration von 1 µg/µl sowie 1 µl Interleukin-3 (IL-3) in einer Konzentration von 20 ng/ml gründlich gemischt und in die Wells pipetiert. Die Konzentration des CpG-ODN 2216 wurde nach vorheriger Titration festgelegt. Es wurden Versuchsreihen unter der Verwendung von 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml durchgeführt. Die Zellen wurden dann für 5 Stunden im Brutschrank kultiviert.

Vorhergegangene Experimente, bei denen auf Dotap und IL-3 verzichtet wurde, zeigten eine geringere Ausbeute an IFN- α produzierenden Zellen. Auch die Stimulation mit dem TLR7-Liganden R848 1 µg/ml ergab nur schwache IFN- α -Signale, so dass sich im Laufe der Zeit die oben beschriebene Stimulation bewährt hatte. Im Vorfeld wurden auch unstimulierte Proben mitgeführt und während des gesamten Versuches gleichwertig behandelt um zu verdeutlichen, dass eine IFN- α -Produktion nur von den stimulierten Zellen ausgeht. Um eine etwaige unspezifische IFN- α -Produktion ausschließen zu können, wurden zur Kontrolle 1×10^6 Zellen nach der Stimulation von einigen Proben in Vorversuchen abgenommen und nur dem Färbeschritt unterzogen.

2.5 IFN- α -Sekretions-Phase – Markierung der Zellen und IFN- α -Produktion

Erste Versuche, die Zellen intrazellulär mit IFN- α anzufärben und deren RNA zu gewinnen, führten nicht zum gewünschten Erfolg. Die RNA-Ausbeute war aufgrund der Permeabilisation und Fixation der Zellen sehr gering. Daher wurde der Versuchsablauf unter Verwendung des im Folgenden beschriebenen Protokolls zur Oberflächenmarkierung der IFN- α -Produktion optimiert (Abb. 7).

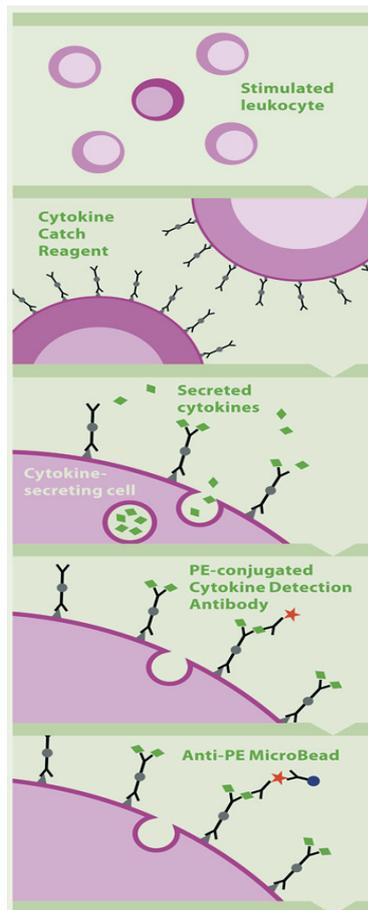


Abbildung 7: Markierung IFN- α produzierender Zellen
(modifiziert nach Assenmacher 2002 – mit freundlicher Genehmigung von Miltenyi Biotec).

Alle stimulierten Zellen werden mit einem konjugierten Paar monoklonaler Antikörper (Catch Reagent) auf ihrer Oberfläche markiert. Dieser monoklonale Antikörper ist spezifisch für IFN- α . Das während der angeregten Zytokinproduktion freigesetzte IFN- α bindet an den Catch Reagent der sezernierenden Zellen. Das eingefangene Zytokin wird mit einem weiteren Antikörper behaftet und so detektierbar gemacht.

Nach der Stimulation und Kultivierung im Brutschrank wurden die Zellen in der Platte aufgemischt und in ein PP-Röhrchen übertragen. Um zu gewährleisten, dass möglichst viele Zellen gewonnen werden konnten, wurden die Wells mit jeweils 1 ml eisgekühltem Puffer, bestehend aus PBS (*Phosphate-buffered saline*)/EDTA (2mM)/BSA (0,5 % *bovine serum albumin*) nachgespült und ebenfalls in das PP-Röhrchen übertragen. Erneut wurde die Zellzahl am automatischen Zell-Counter Sysmex bestimmt und auf 1×10^7 eingestellt. Im Vorfeld wurden Versuche mit unterschiedlichen Zellmengen (1×10^6 , 5×10^6 und 1×10^7) durchgeführt. Aufgrund des geringen Anteils der pDCs von 0,2-0,8 % im peripheren Blut, sollte eine größte mögliche Menge an Zellen eingesetzt werden, um möglichst viele Zellen aufzureinigen zu können und daraus RNA zu erhalten. Mit einer Zellzahl von 1×10^7 konnten hinsichtlich Validität und Produktivität die besten Ergebnisse erzielt werden, ohne dass unspezifische Bindungen provoziert

wurden. Alle nachfolgend benötigten Reagenzien und Antikörper wurden mittels Titration auf diese Menge angepasst. Jeweils 1×10^7 der Zellsuspension wurden in insgesamt zehn 15 ml PP-Röhrchen pro Spender gefügt. Daraufhin wurden sie mit 10 ml eisgekühltem PBS/EDTA/BSA 10 Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert sowie der Überstand abgenommen.

Das Zellpellet wurde in 90 µl eisgekühltem PBS/EDTA/BSA resuspendiert und 20 µl *IFN-α Catch Reagent* (PE) (*IFN-α Secretion Assay Detection Kit human, Miltenyi Biotec*) zur Markierung der Zellen hinzugefügt. Dieser *Catch Reagent* dockt an die Zelloberfläche aller Leukozyten der Probe an (Assenmacher 2002). Nachdem 2 ml 37 °C warmes Medium zur Verdünnung und Schaffung optimaler Bedingungen für die Sekretion hinzugefügt wurden, konnten die Zellen für 20 Minuten bei 37 °C unter langsamer Rotation inkubiert werden. Im Vorfeld wurden unterschiedliche Verdünnungsstufen sowie Inkubationszeiten für die Sekretionsphase ausgetestet. Die verwendete Menge an Medium konnte gewährleisten, dass ausreichend Platz zwischen den sezernierenden Zellen vorhanden war, so dass keine unspezifische Bindung des Zytokins an nicht-produzierende Zellen aufgrund von Platzmangel stattfand. Die ständige Rotation sollte gewährleisten, dass die Zellen nicht sedimentieren. Das freigesetzte IFN-α wurde an den *Catch Reagent* der positiv sezernierenden Zellen gebunden. Das zugegebene Volumen an Medium hatte einen entscheidenden Stellenwert während der Sekretions-Phase. Die Menge konnte in mehreren Versuchen mit unterschiedlichen Volumina optimiert werden. Es wurde somit ein zu verwendendes Volumen von 2 ml Medium festgelegt. Auch die Dauer der Inkubation während der Sekretionsphase wurde durch Erprobung unterschiedlicher Zeiträume optimiert. Nach 20 Minuten zeigte sich die optimalste Ausbeute. Bei Einhaltung längerer Zeitintervalle wurde eine Abnahme der Eventzahlen in der Durchflusszytometrie registriert.

2.6 Färbung der Zellen

Um das ausgeschüttete IFN-α zu markieren und v.a. die pDCs sichtbar zu machen, wurden die Zellen mit spezifischen konjugierten Antikörpern in verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen APC (Allophycocyanin), FITC (Fluorescein-5-isothiocyanat), PE (Phycoerythrin), PE-Cy7 (Phycoerythrin konjugiert mit Cyanin-Farbstoff Cy7) sowie APC-H7 (Allophycocyanin konjugiert mit H7, einem Cyanin-Analogon namens High 7) angefärbt.

Dazu wurden die Zellen gleich nach der IFN- α -Produktions-Phase auf Eis gestellt und mit 10 ml eisgekühltem PBS/EDTA/BSA zum Waschen aufgefüllt und anschließend für 10 Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde vorsichtig abgenommen.

Das Zellpellet wurde in 90 μ l eisgekühltem PBS/EDTA/BSA resuspendiert und nachfolgend wurden folgende Antikörper in jeweils einer Menge von 20 μ l zugefügt: IFN- α Detection Antibody (PE) (*IFN- α Secretion Assay Detection Kit human, Miltenyi Biotec*), Lineage Cocktail 1 (FITC) (*BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*), um T- und B-Lymphozyten, Natural Killer-Zellen, Monozyten, Makrophagen, Eosinophile und Neutrophile anzufärben. Es handelt sich um ein Gemisch bestehend aus CD3, CD14, CD16, CD19, CD20 und CD56). Weiterhin BDCA-4 (APC) (*Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Deutschland*), sowie CD123 (PE-Cy7) (*BioLegend, San Diego, USA*) zur Markierung der IFN- α produzierenden pDCs. Die Zellen wurden gründlich durch Vortexen gemischt. Nach einer 10-minütigen Inkubation der Zellen auf Eis folgte ein letzter Waschschrift, indem die Tubes mit 10 ml eisgekühltem PBS/EDTA/BSA aufgefüllt wurden und für 10 Minuten bei 300 g und 4 °C zentrifugiert wurden. Im Vorfeld wurden unterschiedliche Inkubationszeiten nach Zugabe der Antikörper ausgetestet. Der Überstand wurde abgenommen und das Zellpellet in 100 μ l Sorting Puffer resuspendiert. Daraufhin wurden alle Proben eines Spenders vereinigt. Während dieses Versuchs-Schrittes war es enorm wichtig die Kühlung der Zellen abseits der Sekretionsphase aufrechtzuerhalten, um eine etwaige Zytokinproduktion der Zellen zu verhindern, wenn ihre Dichte im Reagenzröhrchen zu hoch ist und eine unspezifische Bindung verursachen könnte (Assenmacher 2002).

Im Vorfeld wurden Versuche mit BDCA-2 (APC) anstelle von BDCA-4 (APC) durchgeführt. Jedoch zeigte sich hierbei, dass die Population mit BDCA-4 besser abgegrenzt werden konnte und homogener war. Hinzu kommt, dass BDCA-2 die IFN- α -Produktion herunterreguliert (Dzionic 2001). Da BDCA-4 neben pDCs auch Monozyten gering anfärbt, wurden Lineage Cocktail 1 und CD123 hinzugefügt, um unerwünschte Zellreihen sichtbar zu machen und ausschließen zu können. CD123 wird von myeloiden Vorläuferzellen, Makrophagen, dendritischen Zellen, Mastzellen, Basophilen, Megakaryozyten und einigen B-Zellen exprimiert.

2.7 Aufreinigung der Zellen in eine IFN- α -positive und IFN- α -negative Fraktion

Die Zellen wurden mit dem Durchflusszytometer/Sorter FACS Aria III getrennt und in serumfreien X-Vivo 15 Medium aufgenommen, um den Verdau der RNA durch RNasen zu vermindern. So erhielten wir eine IFN- α produzierende Positiv-Fraktion und eine Negativ-Fraktion. Mit dem Post-Sort wurde die Reinheit der Zellen überprüft, indem die aufgereinigten Zellen prozentual auf die lebenden Zellen bezogen wurden. Um tote Zellen auszuschließen, wurden 2 μ l Sytox® Blue *Dead Cell Stain* zum Post-Sort hinzugefügt. In Vorversuchen konnte unter der Zugabe von 0,2 μ l Sytox® Blue *Dead Cell Stain* zu jeder Probe demonstriert werden, dass sich die Vitalität der Positiv- und Negativ-Fraktion gleich gut darstellt. Es wurde darauf geachtet, dass die Reinheit der beiden gewünschten Zellpopulationen IFN- α -positiv und -negativ nahezu 100 % erreichte. Dafür wurde die jeweilige Gesamtzellzahl auf den Anteil an lebenden Zellen bezogen.

Die Ergebnisse wurden mit der BD FACSDiva Software, Version 6.1.3. ausgewertet.

Prinzip des Sorters/ Durchflusszytometrie:

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie lassen sich mit fluoreszierenden Antikörpern markierte Zellen anhand ihrer entsprechenden Zelloberflächenantigene unterscheiden. Dabei werden die relative Partikelgröße, die relative Granularität sowie die relative Fluoreszenzintensität bestimmt.

Die Zellsuspension wird durch eine Kapillare mit Überdruck angesaugt und in laminarer Strömung an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Durch hydrodynamische Fokussierung treffen die Zellen einzeln in den Laserstrahl und können gemessen werden. Dabei werden Tropfen, die eine zu untersuchende Zelle erhalten elektrisch aufgeladen und durch ein Spannungsfeld in die gewünschte Richtung gelenkt. So lassen sich unterschiedliche Zellen diskriminieren und ansammeln. Darüber hinaus entstehen Punktwolken, in denen die Zellen entsprechend der oben genannten Merkmale repräsentiert werden (Abb. 8) (Sack 2007). Diese können dann mit Hilfe der BD FACSDiva Software, Version 6.1.3. ausgewertet werden.

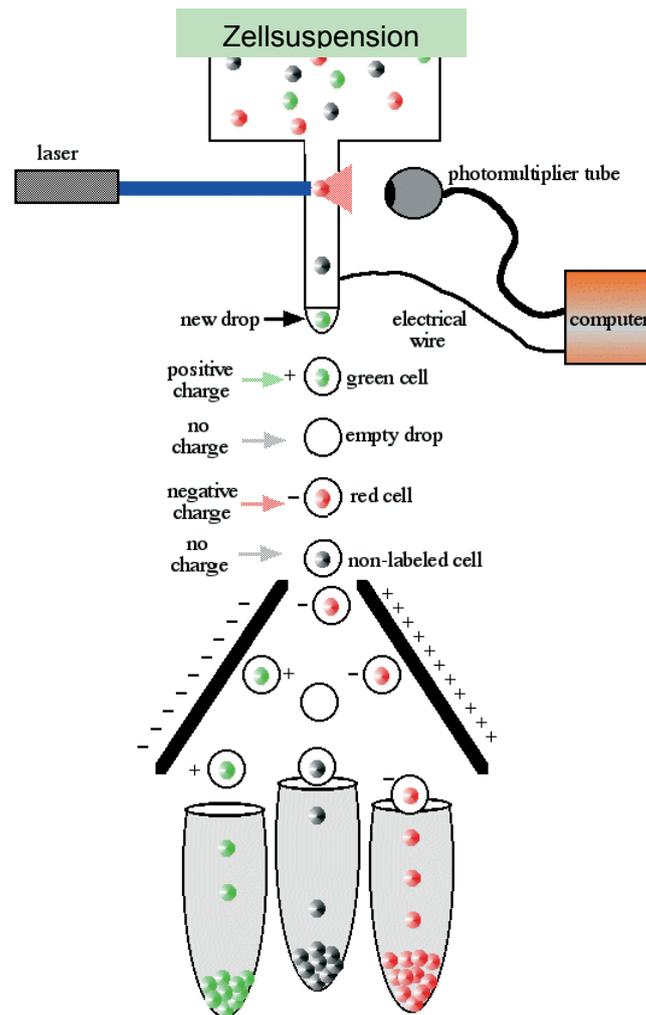


Abbildung 8: Schematische Darstellung des Sorters – Prinzip der Durchflusszytometrie (modifiziert nach Speck 2011 – mit freundlicher Genehmigung von BD Biosciences).

2.8 RNA-Isolation und Konzentrationsbestimmung der RNA

Nachdem die beiden Zellpopulationen IFN- α -negativ und IFN- α -positiv mit Hilfe des Sorters von neun Spendern gewonnen werden konnten, wurden sie gepoolt, so dass die Zellen von jeweils zwei bzw. drei Spendern mit annähernd gleichen Zellzahlen vereinigt wurden. Dabei wurde die jeweils niedrigere Zellzahl als Maßstab genommen und die entsprechenden Mengen der Proben dann verwendet. Danach erfolgte die Isolation der RNA unter Verwendung des RNeasy Mini Kits (*Qiagen GmbH, Hilden, Deutschland*) nach Angaben des Herstellers. Das selektive Bindungsverhalten von Silica-Gel-Membranen kam hierbei zum Tragen.

Zur Vorbereitung wurden sämtliche Versuchsgegenstände mit *RNase Away* gereinigt, um eine Kontamination mit RNasen auszuschließen, die die RNA abbauen würden.

Die Proben wurden zunächst um das Medium in dem sie eingefroren waren, zu entfernen, bei 1200 UpM für 5 Minuten zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die RNA-Ausbeute zu optimieren, wurde eine Zelllyse mit RNeasy Lyse-Puffer (RLT) durchgeführt, dem zuvor pro ml Puffer 10 µl β-Mercaptoethanol (β-ME) zugesetzt wurde, um einen RNA-Verlust durch RNasen zu minimieren. Zur Positiv- und Negativfraktion wurden jeweils 170 µl RLT+ β-ME hinzugefügt und gemischt. Um von den einzelnen Proben jeweils die gleiche Zellzahl an IFN-α-positiven und IFN-α-negativen Zellen zu erhalten, wurden die entsprechenden Probenmengen entnommen und jeweils zwei Proben in einem Pool vereinigt. Von den gepoolten Proben wurden jeweils 170 µl entnommen und das Zelllysate zum Homogenisieren auf QIAshredder-Säulen überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 13000 UpM für 2 Minuten (*Hettich Mikro20, Tuttlingen, Deutschland*). Diese Zentrifuge kam für die weitere RNA-Isolation zum Einsatz. Zu dem Durchfluss wurden 350 µl 70 %iger Ethanol gegeben, gemischt und auf eine RNeasy-Säule überführt. Es folgte eine Zentrifugation bei 10000 UpM für 15 Sekunden, danach wurde der Überstand verworfen. Die RNA-Gewinnung für das *DNA-Oligonukleotid-Microarray-Experiment* wurde ohne den optionalen Versuchsschritt des DNase-Verdau durchgeführt, wohingegen Verunreinigungen mit DNA in den Proben für die Real-Time-PCR eliminiert wurden. Dafür wurden 300 µl RNeasy-Wasch-1-Puffer auf die Säulen pipettiert. Es folgte eine Zentrifugation bei 10000 UpM für 15 Sekunden, wonach der Durchfluss verworfen wurde. Für die Denaturation der DNA wurden 10 µl DNase I Stocklösung zu 70 µl RNase freier RDD-Puffer gegeben und vorsichtig gemischt. Anschließend wurden diese 80 µl Gemisch direkt auf die Membran der Säule pipettiert, so dass bei Raumtemperatur der Verdau der DNA für 15 Minuten ablaufen konnte. Im weiteren Verlauf wurden 350 µl (für die Proben der *Real-Time-PCR*) bzw. 700 µl (für die Proben des *DNA-Oligonukleotid-Microarray-Experiments*) RNeasy-Wasch-1-Puffer auf die Säulen gegeben und für 15 Sekunden bei 10000 UpM zentrifugiert mit Verwerfung des Durchflusses. Um das Ethanol von den Säulen zu entfernen, folgten zwei Waschschrte mit je 500 µl RPE-Puffer und anschließender Zentrifugation bei 10000 UpM, einmal für 15 Sekunden und ein weiteres Mal für 2 Minuten. Durchfluss und Röhrchen wurden daraufhin verworfen. Unter Verwendung eines neuen Sammelgefäßes folgte ein Trockenschritt mittels Zentrifugation bei

13000 UpM für 1 Minute. Daraufhin wurden die Säulen in RNase freie Eppendorfgefäße gesteckt und 20 µl RNA-freies Wasser mittig auf die Membran der Säule pipettiert und bei 13000 UpM für 1 Minute zentrifugiert, um die RNA zu eluieren. Das Eluat wurde auf Eis gelagert. 2 µl wurden zur Konzentrationsbestimmung sowie zur Bestimmung der Reinheit der RNA verwendet, 2 µl blieben auf der Säule haften und waren Verlust. Somit wurden 16 µl RNA gewonnen, die abschließend bei -80 °C eingefroren, um für die Real-Time-PCR bzw. das *DNA-Oligonukleotid-Microarray*-Experiment verwendet werden zu können.

Die Konzentrationsbestimmung der RNA erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm mittels NanoDrop® ND-1000 Spektralphotometer (*NanoDrop Technologies, Wilmington, USA*) gemäß den Vorgaben des Herstellers. Hierfür wurden jeweils 2 µl Probe eingesetzt und die RNA-Konzentration mit Hilfe des Geräts nach folgender Formel berechnet:

$$[RNA] = \text{Absorption}_{260} \cdot \text{Extinktionskoeffizient RNA } 40 \text{ ng} \cdot \text{cm} \cdot \mu\text{L}^{-1} \cdot \text{Weg } 10 \text{ mm}$$

2.9 Umschreiben in cDNA

Als Vorbereitung für die *Real-time-PCR* (RT-PCR) wurde die gepoolte RNA von drei Spendern, die zuvor mit Hilfe des Sorters in eine IFN- α positive und IFN- α negative Fraktion unterteilt worden waren, unter Verwendung des RT² Nano PreAmp cDNA Synthese Kit (*SABiosciences, Frederick, USA*) nach Angabe des Herstellers in cDNA umgeschrieben. Dafür wurden 8 µl RNA in einer Konzentration von 3,1 ng/µl der Positiv-Fraktion und 3,3 ng/µl der Negativ-Fraktion eingesetzt. Um Verunreinigungen mit genomischer DNA zu entfernen, wurden 2 µl cDNA Eliminations-Puffer zugefügt, die Proben für 5 Minuten bei 42 °C inkubiert und anschließend auf Eis gesetzt. Für die Reaktion der reversen Transkription wurde zunächst ein Master Mix hergestellt, bestehend aus 4 µl Reverse Transkriptions-Puffer, 3 µl RNase-freiem Wasser sowie je 1 µl cDNA-Synthese Enzym-Mix, RNase Inhibitor und Primer-/Kontroll-Mix. Dann wurden diese 10 µl Master Mix zu den 10 µl der zuvor behandelten RNA gegeben und für 30 Minuten bei 42 °C inkubiert mit nachfolgender Erhitzung bei 95 °C für 5 Minuten. Die so erhaltene cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C eingefroren.

2.10 RT-PCR – mRNA-Expressionsanalyse für humane Zytokine und Zelloberflächenmarker

Prinzip der PCR – (Polymerase Chain Reaction):

Bei der Polymerase-Kettenreaktion können spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert werden. Für den Prozess sind verschiedene Bestandteile der Reaktion erforderlich. Dazu gehören neben Reaktionspuffer, Primern und einer thermostabilen DNA-Polymerase, freie Desoxynukleotidtriphosphate. Bei den Primern handelt es sich um Oligonukleotide, die an bekannten Bereichen des DNA-Einzelstrangs hybridisieren und somit als Vorlage für einen komplementären DNA-Strang dienen. An ihnen bindet die DNA-Polymerase, damit die Amplifikation ab einem bestimmten Punkt beginnen kann. Um eine gewünschte DNA-Sequenz zu vermehren, wird ein Zyklus mehrfach wiederholt. Ein PCR-Zyklus besteht aus drei Schritten (Abb. 9):

1. Denaturierung: Durch Erhitzen auf 95 °C trennt sich der DNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge, die der Polymerase als Matritze (Template) dienen.
2. Primer-Anlagerung (Annealing): Der spezifische Primer wird nach Absenkung der Temperatur an den DNA-Einzelstrang hybridisiert.
3. Extension: Die hitzestabile Taq DNA-Polymerase beginnt die DNA-Synthese und verlängert so durch Anfügen der Oligonukleotide den komplementären DNA-Strang (Mullis 1986).

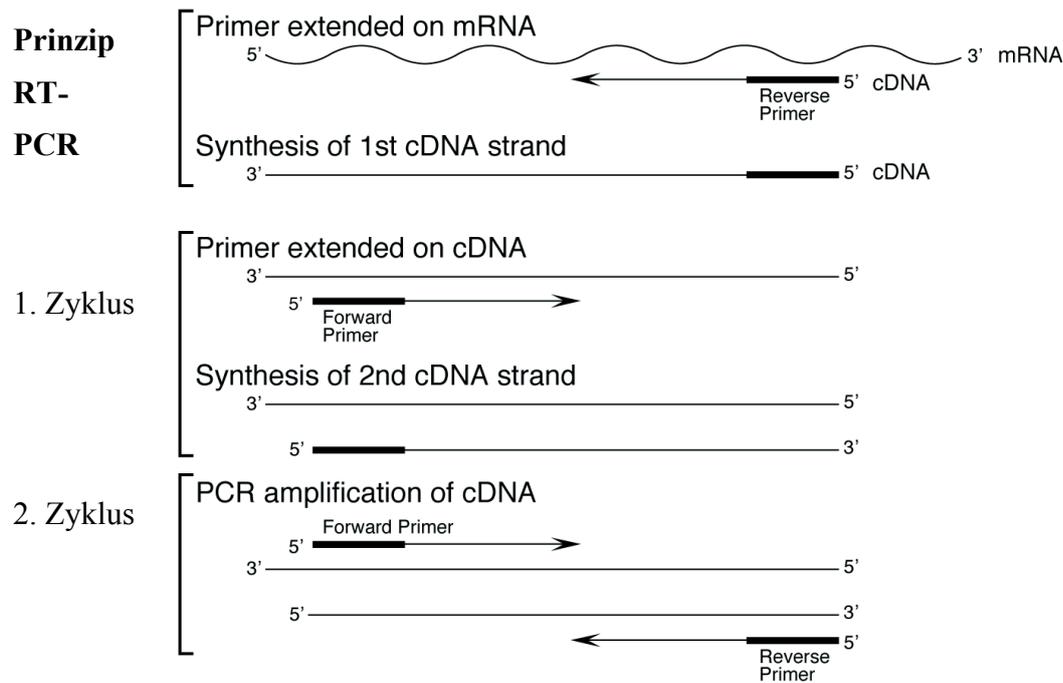


Abbildung 9: Schematische Darstellung des Prinzips der RT-PCR (modifiziert nach Applied Biosystems Reagent Guide 2010).

Mit der erhaltenen cDNA wurden zwei unterschiedliche *RT-PCR Arrays* durchgeführt. Zum einen zur Validierung der Methodik des Protokolls zur Oberflächenmarkierung der IFN- α -Produktion und zum anderen zur Erlangung weiterer Erkenntnisse im Hinblick auf die Fragestellung. Daher wurde ein *PCR Array* zur Analyse humaner Zytokine (*PCR Array – Human Common Cytokines, SABiosciences, Frederick, USA*) verwendet, um etwaige Unterschiede in der Zytokinproduktion der IFN- α -positiven Zellproben und der IFN- α -negativen Zellen zu verifizieren. Der verwendete *PCR Array* porträtiert die Expression der 84 wichtigsten Zytokin-Gene.

Des Weiteren wurde ein *PCR Array* zur Analyse humaner Zelloberflächenmarker (*PCR Array – Human Cell Surface Markers, SABiosciences, Frederick, USA*) durchgeführt, um in den oben genannten Zellpopulationen etwaige Unterschiede in der Ausstattung mit Oberflächenmarkern nachzuweisen. Auch dieser Array verfügt über die 84 wichtigsten Oberflächenmarker-Gene.

Bevor die cDNA im *PCR Array* eingesetzt werden konnte, musste diese pre-amplifiziert werden. Dafür wurden 12,5 μl RT² PreAmp PCR Master Mix aus dem oben beschriebenen cDNA Synthese Kit, der neben Nukleotiden eine High-Performance HotStart Taq DNA-Polymerase enthält, mit 7,5 μl RT² Nano PreAmp cDNA-Synthese Primer Mix – *Human Common Cytokines* bzw. *Human Cell Surface Markers* (SABiosciences,

Frederick, USA) zur genspezifischen Pre-Amplifikation als Vorbereitung für den *PCR Array* gemischt. Zu diesem Pre-Amplifikations-Mix wurden 5 µl der cDNA gegeben. Zur Aktivierung der HotStart Taq DNA-Polymerase wurden die Proben für 10 Minuten für 95 °C in einem Thermocycler (*Gene Amp PCR System 9700, Applied Biosystems, Foster City, USA*) erhitzt und anschließend wurden 12 PCR-Zyklen (15 Sekunden bei 95 °C und 2 Minuten bei 60 °C) durchgeführt, ehe die Proben auf 4 °C abgekühlt wurden. Um potenzielle unspezifische Reaktionen der PCR zu minimieren, wurden 2 µl *Side Reaction Reducer* hinzugegeben und für 15 Minuten bei 37 °C inkubiert. Es folgte eine Hitze-Inaktivierung bei 95 °C für 5 Minuten. Daraufhin wurden die pre-amplifizierten Proben mit je 84 µl Aqua bidest versetzt. Bevor die Proben in die Platte des *PCR-Array* überführt werden konnten, wurde ein weiterer Cocktail gemischt. Darin enthalten waren 102 µl der zuvor verdünnten Proben, 1248 µl Aqua bidest sowie 1350 µl des RT² SYBR® Green /ROX™ qPCR Master Mix (*SABiosciences, Frederick, USA*), der alle Reagenzien und Puffer für die *Real-Time-PCR* beinhaltet. Dazu gehören neben einem Puffer, eine HotStart DNA-Taq-Polymerase, Nukleotide, „SYBR® Green“-Farbstoff und ROX™-Farbstoff zur Referenz, um die Optik des Instruments zu normalisieren. Abschließend wurden je 25 µl dieses Cocktails in jedes Well der PCR-Platte, eine Platte für die IFN-α Negativ-Fraktion und eine Platte für die IFN-α Positiv-Fraktion pipettiert. Dann folgte die *Real-Time-PCR* RT² Profiler *PCR Array*: humane Zytokine bzw. humane Zelloberflächenmarker mit insgesamt 40 Zyklen 15 Sekunden bei 95 °C und 60 Sekunden bei 60 °C), nachdem die HotStart DNA-Taq Polymerase zuvor für 10 Minuten bei 95 °C aktiviert wurde. Anschließend wurden die Daten mit Hilfe des *PCR Array* Datenanalyse Web Portals der Firma SABiosciences ausgewertet.

Humane Zytokine – Gen-Gruppierungen:

Interferone: IFNA1, IFNA2, IFNA4, IFNA5, IFNA8, IFNB1, IFNG, IFNK.

Interleukine: IL-10, IL-11, IL-12A, IL-12B, IL-13, TXLNA, IL-15, IL-16, IL-17A, IL-17B, IL-17C, IL-25 (IL-17E), IL-18, IL-19, IL-1A, IL-1B, IL-1F10, IL-36RN, IL-36A, IL-37, IL-36B, IL-36G, IL-2, IL-20, IL-21, IL-22, IL-24, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9.

Bone Morphogenic Proteine (BMPs) und TGF-β Familie: BMP1, BMP2, BMP3, BMP4, BMP5, BMP6, BMP7, BMP8B, GDF10 (BMP3B), GDF11 (BMP11), GDF2 (BMP9), GDF3, GDF5, MSTN, GDF9, INHA, INHBA, NODAL, TGFA, TGFB1, TGFB2, TGFB3.

PDGF/VEGF Familie: FIGF (VEGFD), PDGFA.

TNF-Superfamilie: FASLG (TNFSF6), LTA, LTB, TNF, TNFRSF11B, TNFSF10, TNFSF11, TNFSF12, TNFSF13, TNFSF13B, TNFSF14, TNFSF4, CD70 (TNFSF7), TNFSF8.

Andere Wachstumsfaktoren/Cytokine: CSF1, (MCSF), CSF2 (GMCSF), FAM3B, LEFTY2 (EBAF).

Humane Zelloberflächenmarker – Gen-Gruppierungen:

B-Zell-Oberflächenmarker:

Aktivierte B-Zellen: CD28, CD38, CD69, CD80, CD83, CD86, DPP4, FCER2, IL-2RA, TNFRSF8, CD70 (TNFSF7).

Reife B-Zellen: CD19, CD22, CD24, CD37, CD40, CD72, CD74, CD79A, CD79B, CR2, IL-1R2, ITGA2, ITGA3, MS4A1, ST6GAL1.

Andere B-Zell-Oberflächenmarker: CD1C, CHST10, HLA-A, HLA-DRA, NT5E.

T-Zell-Oberflächenmarker:

Zytotoxische T-Zellen: CD8A, CD8B.

Helfer T-Zellen: CD4.

Aktivierte T-Zellen: ALCAM, CD2, CD38, CD40LG, CD69, CD83, CD96, CTLA4, DPP4, HLA-DRA, IL-12RB1, IL-2RA, ITGA1, TNFRSF4, TNFRSF8, CD70 (TNFSF7).

Andere T-Zell-Oberflächenmarker: CD160, CD28, CD37, CD3D, CD3G, CD247, CD5, CD6, CD7, FAS, KLRB1, KLRD1, NT5E, ST6GAL1.

Natürliche Killerzellen Zell-Oberflächenmarker: CD2, CD244, CD247, CD7, CD96, CHST10, IL-12RB1, KLRB1, KLRC1, KLRD1, NCAM1.

Monozyten und Makrophagen Zell-Oberflächenmarker:

Aktivierte Makrophagen: CD69, ENG, FCER2, IL-2RA.

Andere Monozyten und Makrophagen Zell-Oberflächenmarker: C5AR1, CD163, CD40, CD63, CD74, CD86, CHST10, CSF1R, DPP4, FCGR1A, HLA-DRA, ICAM2, IL-1R2, ITGA1, ITGA2, S100A8, TNFRSF8, CD70 (TNFSF7).

Endotheliale Zell-Oberflächenmarker: ENG, ICAM2, NOS3, PECAM1, SELP, TEK, VCAM1, VWF.

Glatte Muskelzellen Zell-Oberflächenmarker: MYH10, MYH9, MYOCD.

Dendritische Zellen Zell-Oberflächenmarker: CD1A, CD209, CD40, CD83, CD86, CR2, FCER2.

Mast Zellen Zell-Oberflächenmarker: C5AR1, FCER1A, FCER2, TPSAB1.

Fibroblasten (Stromale) Zell-Oberflächenmarker: ALCAM, COL1A1, COL1A2.

Epitheliale Zell-Oberflächenmarker: CD1D, KRT18, KRT5, KRT8, EPCAM.

Adipozyten Zell-Oberflächenmarker: RETN.

2.11 Whole-Genome-DNA-Oligonukleotid-Microarray

In diesem Experiment wurden Unterschiede in den Genexpressionsprofilen von INF- α -produzierenden und nicht-INF- α -produzierenden Zellen untersucht.

So wurden für dieses Experiment die oben beschriebenen Sortierungs-Experimente vier Mal mit jeweils zwei verschiedenen Spendern durchgeführt. Anschließend wurden die IFN- α -positiven Zellen sowie die IFN- α -negativen Zellen der Spender nach Einstellung einheitlicher Zellzahlen vereinigt und die RNA isoliert. Die RNA aus den vier Spenderpools wurde präamplifiziert. In Kooperation mit Dr. Jochen Wilhelm, Deutsches Zentrum für Lungenforschung (DZL, Standort Gießen) wurden die Expressionsprofile mittels des *DNA-Oligonukleotid-Microarray-Experiments* gemessen sowie die statistische Auswertung der Messdaten ausgeführt.

Die statistische Auswertung basierte auf Daten eines farb-balancierten Designs, für das die gleiche Anzahl Proben jeder Gruppe mit Cy3 als auch mit Cy5 unter Verwendung des *QuickAmp Labeling Kits (Agilent Technologies, Böblingen, Germany)*. Die Zweifarb-Hybridisierung erfolgte auf *Whole-Human Genome-Microarrays 4x44k (Agilent Technologies, Böblingen, Germany)* nach dem Agilent-Protokoll, die anschließend mit 5 μ m/ Pixel Auflösung gescannt wurden. Verwendet wurde hier der Microarray-Scanner *Axon A4100* mit der Software *GenePix Version 5.0 Pro*. Die weitere Auswertung der Daten aus der Bildanalyse erfolgte in *R* (R Core Team 2012) und dem Erweiterungspaket *limma* (Smyth 2005). Aus den mittleren logarithmierten Spotintensitäten wurden die M- und A-Werte anhand der folgenden Formeln berechnet:

$$M = \log_{[2]} \left[\frac{Cy5}{Cy3} \right], \quad A = \log_2 \left[\sqrt{Cy5 \cdot Cy3} \right]$$

Die Unterschiede in der Genexpression der beiden Gruppen wurde mit einem linearen Modell der lowess-normalisierten M-Werte analysiert. Die Signifikanz der differentiellen Expression wurde mit moderiertem t-Test bestimmt (Smyth 2005). Die Erstellung von Kandidatenlisten von differentiell exprimierten Genen erfolgte unter Kontrolle der Rate falsch-positiver Ergebnisse unter den abgelehnten Nullhypothesen (*false-discovery rate*) (Benjamini 1995).

2.12 Oberflächenfärbung unstimulierter und stimulierter Zellen – Untersuchung auf humane Zelloberflächenmarker

Um zu überprüfen, ob sich die Ergebnisse aus dem Experiment: „*PCR Array – Humane Zelloberflächenmarker*“, die auf Gen-Ebene Unterschiede in den beiden Zellpopulationen IFN- α produzierend und nicht-produzierend zeigten, auch auf Oberflächenebene widerspiegeln lassen, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Dafür wurden er-

neut Leukozyten von drei Spendern gewonnen. Diese wurden, wie bereits oben beschrieben, aus Buffy Coats isoliert. Die Oberflächenfärbung der Zellen wurde mit verschiedenen Antikörpern durchgeführt: CD2 (PE-Cy7), CD3 (APC-H7), CD19 (Pacific Blue), CD21 (FITC), CD22 (FITC), CD26 (FITC), CD95 (PE-Cy7), CD161 (FITC) und CD209 (PE-Cy7).

Darüber hinaus wurden die pDCs, wie auch zuvor beschrieben, durch Anfärbung mit BDCA-4 (APC) und CD123 (PE-Cy7) sowie Lineage Cocktail 1 (FITC) als Negativ-Kontrolle eingegrenzt. Die stimulierten Zellen wurden weiterhin mit IFN- α (PE) angefärbt, um zwischen IFN- α produzierenden und nicht-IFN- α produzierenden pDCs zu diskriminieren.

Als Isotyp-Kontrolle wurden sowohl im FITC-Kanal als auch im PE-Cy7-Kanal IgG1,k (*BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*) verwendet.

Um die Unterschiede der exprimierten Oberflächenmarker zu untersuchen, wurde jeweils ein Teil der Zellen jedes Spenders unstimuliert angefärbt und der andere Teil der Zellen erst nach vorangegangener Stimulation und Durchführung des IFN- α Catch-Assays gefärbt. So war es möglich in der letzten Gruppe erneut nach Unterschieden zwischen den uns interessierenden Zellpopulationen – IFN- α -positiv und IFN- α -negativ suchen.

Jeweils 1×10^6 Zellen des unstimulierten Zellpools wurden mit den oben aufgelisteten Antikörpern gefärbt und für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wurden sie am FACS Canto II (*BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*) durchflusszytometrisch gemessen.

Um das Protokoll zur Oberflächenmarkierung der IFN- α -Produktion zu durchlaufen, wurden wie bereits oben beschrieben, 1×10^7 Zellen stimuliert. Danach wurde die Zellzahl erneut auf 1×10^7 eingestellt, das Protokoll durchgeführt und die Zellen mit den Antikörpern gemäß unserem Standardprotokoll (siehe 2.5) angefärbt. Anschließend wurden auch diese Zellen am FACS Canto II durchflusszytometrisch gemessen.

Die Zellen wurden zusammenfassend gemäß folgendem Versuchs-Layout mit verschiedenen Antikörpern behandelt (Tab. 4):

Tabelle 4: Versuchs-Layout zur Oberflächenfärbung – Untersuchung auf „Humane Zelloberflächenmarker“

	Excitation	(405 nm)	Blue (488 nm)				Red (640 nm)
			Emission Max	452 nm	519 nm	578 nm	785 nm
		Pacific Blue	FITC	PE	PE-Cy 7	APC-H7	APC
1	Iso FITC		IgG1, k		CD123		BDCA4
2	Iso PE-Cy7		Lin1		IgG1, k		BDCA4
3	Buffy 1 unstim		Lin1		CD95		BDCA4
4			Lin1		CD209		BDCA4
5		CD19	CD26		CD123		BDCA4
6		CD19	CD22		CD123		BDCA4
7		CD19	CD21		CD123		BDCA4
8			CD161		CD123	CD3	BDCA4
9			Lin1		CD2		BDCA4
10	Buffy 2 unstim		Lin1		CD95		BDCA4
11			Lin1		CD209		BDCA4
12		CD19	CD26		CD123		BDCA4
13		CD19	CD22		CD123		BDCA4
14		CD19	CD21		CD123		BDCA4
15			CD161		CD123	CD3	BDCA4
16			Lin1		CD2		BDCA4
17	Buffy 3 unstim		Lin1		CD95		BDCA4
18			Lin1		CD209		BDCA4
19		CD19	CD26		CD123		BDCA4
20		CD19	CD22		CD123		BDCA4
23			Lin1		CD2		BDCA4
24	Iso FITC		IgG1, k	IFNa	CD123		BDCA4
25	Iso PE-Cy7		Lin1	IFNa	IgG1, k		BDCA4
26	Buffy 1 stim		Lin1	IFNa	CD95		BDCA4
27			Lin1	IFNa	CD209		BDCA4
28		CD19	CD26	IFNa	CD123		BDCA4
29		CD19	CD22	IFNa	CD123		BDCA4
30		CD19	CD21	IFNa	CD123		BDCA4
31			CD161	IFNa	CD123	CD3	BDCA4
32			Lin1	IFNa	CD2		BDCA4
33	Buffy 2 stim		Lin1	IFNa	CD95		BDCA4
34			Lin1	IFNa	CD209		BDCA4
35		CD19	CD26	IFNa	CD123		BDCA4
36		CD19	CD22	IFNa	CD123		BDCA4
37		CD19	CD21	IFNa	CD123		BDCA4
38			CD161	IFNa	CD123	CD3	BDCA4
39			Lin1	IFNa	CD2		BDCA4
40	Buffy 3 stim		Lin1	IFNa	CD95		BDCA4
41			Lin1	IFNa	CD209		BDCA4
42		CD19	CD26	IFNa	CD123		BDCA4

	Excitation	(405 nm)	Blue (488 nm)				Red (640 nm)
	Emission Max	452 nm	519 nm	578 nm	785 nm	785 nm	660 nm
		Pacific Blue	FITC	PE	PE-Cy 7	APC-H7	APC
43		CD19	CD22	IFN α	CD123		BDCA4
44		CD19	CD21	IFN α	CD123		BDCA4
45			CD161	IFN α	CD123	CD3	BDCA4
46			Lin1	IFN α	CD2		BDCA4

Alle Messdaten wurden mit Hilfe der BD FACSDiva Software, Verision 6.1.3. ausgewertet.

2.13 CD9 Expression

Nachdem Björck et al. tierexperimentell an Mäusen eine Subpopulation der pDCs als Haupt-Produzenten für IFN- α herausfinden konnten und diese Gruppe CD9-positiv war (Björck 2011), untersuchten wir, ob die Diskriminierung anhand des CD9 auch auf humane pDCs zutreffend ist. Um zu untersuchen, ob die beiden Zellpopulationen IFN- α produzierend und nicht-IFN- α produzierend CD9 exprimieren, wurde die Oberflächenmarkierung der IFN- α -Produktion gemäß unseres Standardprotokolls (siehe 2.5) mit Buffy Coats von drei verschiedenen Spendern durchgeführt. Im Färbeschritt des Experiments wurden an Stelle des Lineage Cocktail 1 (FITC) 20 μ l CD9 (FITC) bzw. als Isotyp-Kontrolle Mouse IgG1, k (FITC) zugefügt. Anschließend wurden die Proben durchflusszytometrisch am FACS Canto II (*BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*) gemessen und mittels der BD FACSDiva Software, Verision 6.1.3. ausgewertet.

2.14 Intrazellulärfärbung mit TLR9

Um die Zellstimulation mit CpG-ODN 2216 zu validieren, wurden pDCs intrazellulär mit einem TLR9-Antikörper angefärbt. CpG-ODN bindet zytoplasmatisch an den TLR9. Das Experiment sollte verifizieren, ob alle pDCs über einen TLR9 verfügen oder ob es sein kann, dass die IFN- α -negative Population keinen TLR9 mehr vorweist und deshalb nicht nach der Stimulation mit der Produktion von IFN- α beginnt.

Dafür wurden Leukozyten aus Buffy Coats von drei Spendern mittels Ficoll-Paque® und Aufbereitung nach Standardprotokoll (siehe 2.5) gewonnen. Jeweils 1 x 10⁶ Zellen wurden in 5 FACS-Röhrchen überführt.

Für die Oberflächenfärbung mit den Antikörpern, um die pDC-Population abgrenzen zu können, wurden je 5 µl BDCA-4 (PE) und 4 µl Lineage Cocktail 1 (FITC) verwendet und zu vier Proben hinzugefügt. Nach Zugabe wurden die Proben durch Vortexen gemischt und die Zellen für 30 Minuten im Dunklen auf Eis inkubiert. Es folgte ein Waschschritt mit 2 ml Staining Puffer und anschließender Zentrifugation bei 500 g für 5 Minuten.

Für die Intrazellulärfärbung wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Dazu wurden 500 µl BD Cytofix/Cytoperm™ (*BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*) zu den Proben gegeben, anschließend durch Vortexen gemischt und für 20 Minuten im Dunklen inkubiert. Um die Fixations- und Permeabilisationslösung wieder zu entfernen, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt bei 500 g für 5 Minuten. Um die Zellen zu waschen und in einem permeabilisierten Zustand für die anschließende Färbung zu halten, wurden 2 ml BD Perm/Wash™ (*BD Cytofix/Cytoperm™ Fixation/Permeabilization Kit, BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*) zu den Proben gegeben. Dann wurden sie für 10 Minuten im Dunklen inkubiert und bei 500 g für 5 Minuten zentrifugiert, um die Waschlösung wieder zu entfernen. Die Zellpellets wurden aufgelockert und dann wurde der Antikörper zur Anfärbung des TLR9-Rezeptors (APC) (*BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*) zu den drei Spenderproben bzw. 10 µl der Isotyp-Kontrolle IgG2a, k (APC) (*BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*) zu einer weiteren Probe eines Spenders hinzugefügt. Als Negativkontrolle diente die ungefärbte Probe desselben Spenders. Die Proben wurden durch Vortexen gemischt und für 30 Minuten im Dunklen auf Eis inkubiert. Abschließend erfolgte ein weiterer Waschschritt nach Zugabe von 2 ml BD Perm/Wash™ und Zentrifugation bei 500 g für 5 Minuten. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet aufgelockert. Um restliche Permeabilisationslösungen zu entfernen, wurden die Proben mit 1 ml Staining Puffer gewaschen und für 5 Minuten bei 500 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Schluss wurden die 5 Proben durchflusszytometrisch am FACS Canto II (*BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland*) gemessen und mittels der BD FACSDiva Software, Version 6.1.3. ausgewertet.

3. Ergebnisse

3.1 Leitfaden/ Kurzübersicht der Ergebnisse

Sind die Zellen der IFN- α -negativen Zellpopulationen tote Zellen? → ja

↓ **nein !**

Handelt es sich bei den IFN- α -negativen Zellen gar nicht um pDCs, sondern andere, unspezifisch angefärbte Zellen? → ja

↓ **nein !**

Weisen die beiden pDC-Populationen bestimmte Gene auf, die hinsichtlich der Zytokinproduktion auf Subpopulationen mit spezifischer immunologischer Rolle innerhalb der pDCs hindeuten? → nein

↓ **ja !**

Gibt es auch Oberflächenmarker, um IFN- α -negative und IFN- α -positive Zellen unterscheiden zu können? → ja ?

↓ *nein ?*

Abbildung 10: Schema zum Leitfaden des Projektes/ Kurzübersicht der Ergebnisse

3.2 Stimulation mit CpG-ODN 2216, Dotap und IL-3

Durch die Anfertigung eines Gemischs, bestehend aus CpG-ODN 2216 sowie Dotap und IL-3, war es möglich, die Ausbeute an IFN- α produzierenden pDCs zu erhöhen. Dotap erleichtert die Übertragung des CpG-ODN 2216 in die Zellen, während IL-3 die Eigenschaft besitzt, stabilisierend auf die Zellen zu wirken. IL-3 fördert das Überleben der Zellen und kann an CD 123 binden.

So zeigte es sich, dass eine Stimulation mit ausschließlich CpG-ODN 2216 eine überwiegende Menge an IFN- α -negativen Zellen hervorbringen konnte. Beispielhaft ist unten abgebildet, dass von insgesamt 2873 pDCs 2547 (88,7 %) Zellen negativ für

IFN- α waren und 185 (6,4 %) positiv. Hingegen änderte sich die Verteilung zugunsten der IFN- α -positiven Zellpopulation durch Anfertigung des Stimulationsgemisches mit CpG-ODN 2216, Dotap und IL-3. Hier fanden sich, wie im Folgenden beispielhaft dargestellt, von insgesamt 1837 pDCs 871 (47,4 %) negative und 555 (30,2 %) positive Zellen. Das bedeutet eine signifikante Zunahme der Ausbeute an IFN- α produzierenden pDCs. Die Produktion an IFN- α kann somit durch Zugabe von Dotap hochreguliert werden (Abb. 11).

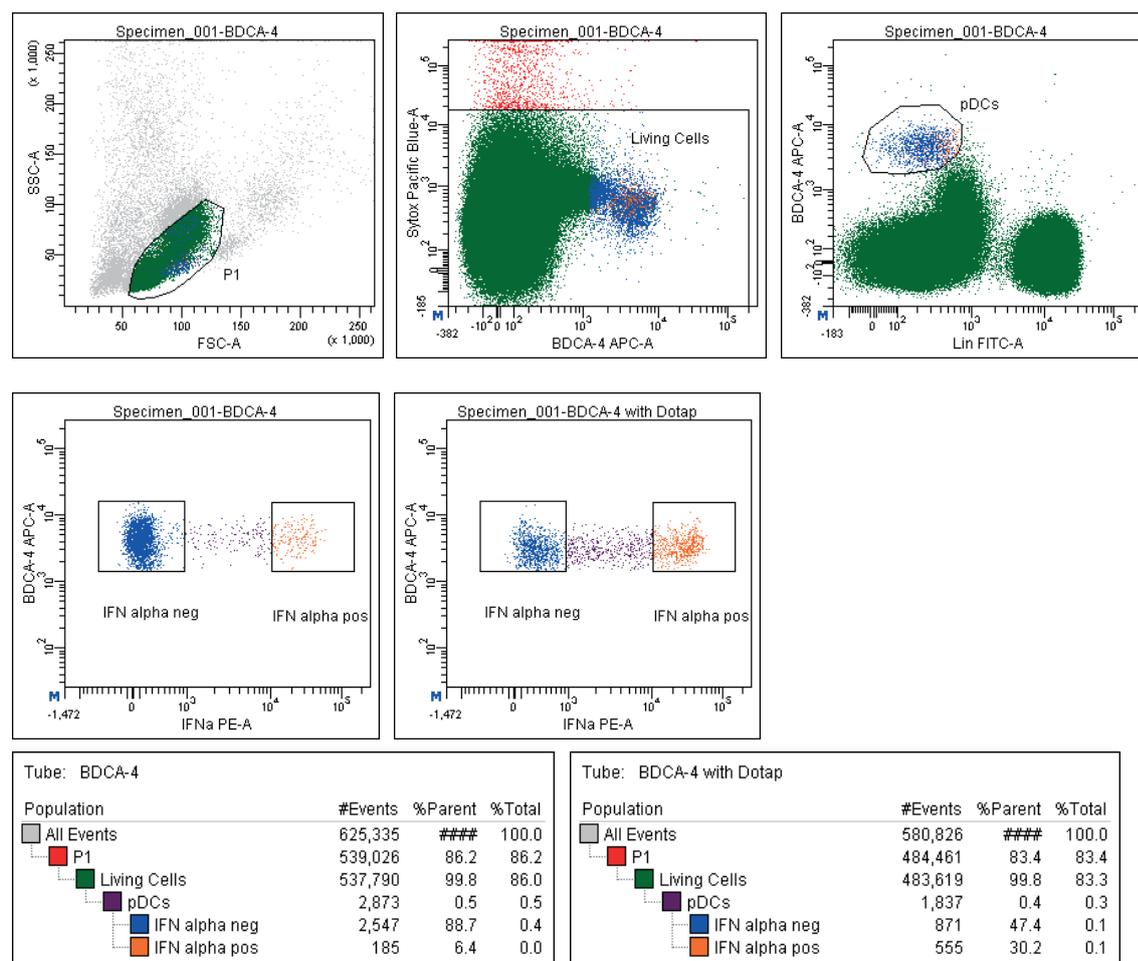


Abbildung 11: Verteilung der pDCs nach Stimulation mit/ ohne Dotap

Dargestellt ist beispielhaft die Gatingstrategie bei der durchflusszytometrischen Identifikation der Zellen eines Spenders, nach Durchlaufen des Protokolls zur Oberflächenmarkierung der IFN- α -Produktion. A. Großzügige Auswahl aller Lymphozyten (P1), B. Eingrenzung der lebenden Zellen (negativ für Sytox® Blue Dead Cell Stain), C. Gating der pDCs (BDCA-4-positiv, Lineage Cocktail 1-negativ), D. pDCs negativ und positiv für IFN- α (in [%] aller pDCs). Sichtbar wird die unterschiedliche Verteilung der pDCs nach Stimulation mit CpG-ODN 2216 (5 μ g/ml) mit/ ohne Zusatz von Dotap (1 μ g/ μ l).

Um diese Resultate zu bestätigen, wurde der Versuch mehrfach wiederholt. So konnte nach n = 4 Versuchen innerhalb der pDC-Population für die Gruppe der IFN- α produzierenden Subpopulation die IFN- α -Produktion im Mittel von 11,5 % unter CpG-ODN

2216 auf 51,1 % unter CpG-ODN 2216 plus Dotap und IL-3 gesteigert werden. Bei der pDC-Population, die kein IFN- α produzierte, verhielten sich die berechneten Mittelwerte invers. Unter CpG-ODN 2216 ergab sich ein Anteil an der pDC-Population von 88,5 %, unter CpG-ODN 2216 plus Dotap und IL-3 ein Anteil von 42,2 % (Abb. 12).

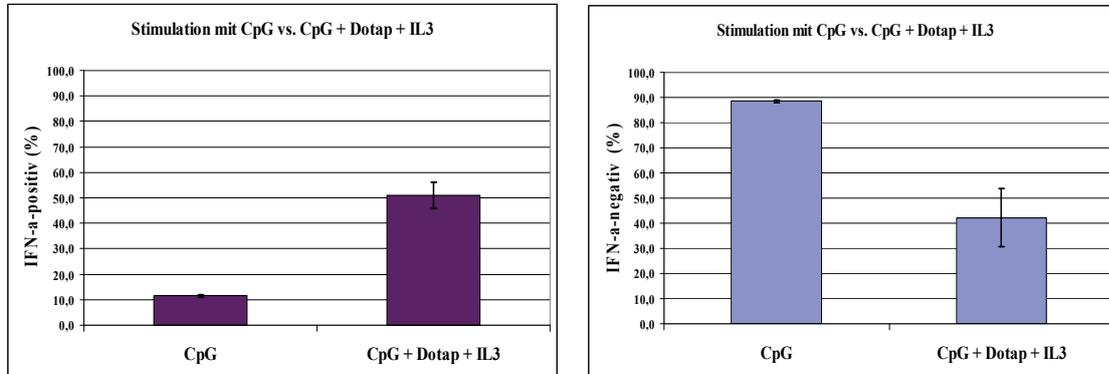


Abbildung 12: Validierung der pDC-Umverteilung nach Stimulation mit/ ohne Dotap

Größere Frequenz an IFN- α -positiven pDCs (in [%] aller pDCs) bei gleichzeitiger Reduktion der IFN- α -negativen pDCs (in [%] aller pDCs) nach Behandlung mit CpG-ODN 2216 (5 μ g/ml), Dotap (1 μ g/ μ l) und IL-3 (20 ng/ml). Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung der Zellverteilung (in [%] aller pDCs) von n = 4 Spendern.

Zum Vergleich und zur Kontrolle dienten unstimulierte, exakt gleich behandelte Proben mit und ohne Zusatz von Dotap und IL-3 zum Stimulans CpG-ODN 2216. Hier bestätigt sich, dass die positive pDC-Subpopulation erst nach durchgeführter Stimulation IFN- α produziert. Im Vergleich der unstimulierten Probe und der unstimulierten Probe plus Dotap und IL-3 wurde kein Unterschied sichtbar, allenfalls fiel eine leichte Signalverstärkung in den Dotplots insgesamt auf, wie beispielhaft dargestellt (Abb. 13).

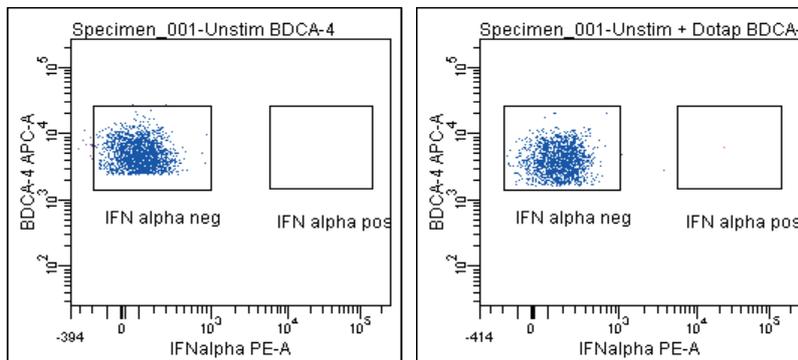


Abbildung 13: Dotap-Effekt auf unstimulierte Zellen

Beispielhaft dargestellt ist die unstimulierte Vergleichsprobe eines Spenders (in [%] aller pDCs), welche weder mit noch ohne Dotap IFN- α in der Durchflusszytometrie hervorbringt. Identische Resultate bei n = 4 Spendern.

Um eine etwaige unspezifische IFN- α -Produktion ausschließen zu können, wurden zur Kontrolle 1×10^6 Zellen nach der Stimulation von einigen Proben in Vorversuchen abgenommen und nur dem Färbeschritt unterzogen. In der Durchflusszytometrie konnte gezeigt werden, dass keine unspezifische Produktion von IFN- α stattgefunden hatte.

Da pDCs sowohl Rezeptoren für TLR7-Liganden, wie das Stimulans R848 besitzen als auch über Rezeptoren für TLR9-Liganden, wie CpG-ODN verfügen, wurden identische Versuchsreihen mit beiden Stimulantien durchgeführt. Hier zeigte sich beispielhaft, unter CpG-ODN 2216 eine deutlich stärkere Expressierung von IFN- α produzierenden Zellen von 10,8 % unter CpG-ODN 2216 im Vergleich zu nur 0,7 % unter R848. Auch durch Zugabe von Dotap und IL-3 konnte die Ausbeute unter R848 lediglich von 0,7 % auf 1,2 % gesteigert werden (Abb. 14).

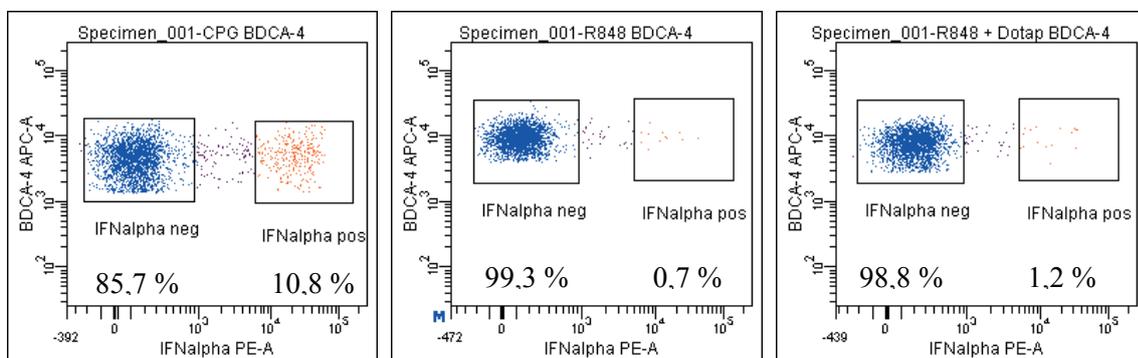


Abbildung 14: Stimulation mit CpG-ODN 2216 vs. R848 mit/ ohne Dotap

Durchflusszytometrische beispielhafte Darstellung des unterschiedlichen Ansprechens der pDCs (Anteil in [%] aller pDCs) auf Stimulation mit CpG-ODN 2216 ($1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) vs. R848 ($1 \mu\text{g}/\text{ml}$). Auch die Zugabe von Dotap erhöht den pDC-Anteil nach Stimulation mit R848 kaum. Validiert an $n = 3$ Spendern.

Um die optimale Konzentration an CpG-ODN 2216 für eine ausreichende Stimulation aller pDCs zu finden, wurde eine Versuchsreihe zur Titration von CpG-ODN 2216 mit Zellmaterial von drei Spendern ($n = 3$) durchgeführt. Hierbei wurden drei verschiedene Konzentrationen $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ und $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ verwendet. Unter Verwendung von $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ zeigten sich 37,5 % IFN- α -positive und 60,4 % IFN- α -negative pDCs, bei $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ waren es 63,0 % IFN- α -positive und 30,8 IFN- α -negative sowie bei $10 \mu\text{g}/\text{ml}$ 67,9 % IFN- α -positive und 26,7 % IFN- α -negative Zellen (Abb. 15).

Ergebnisse

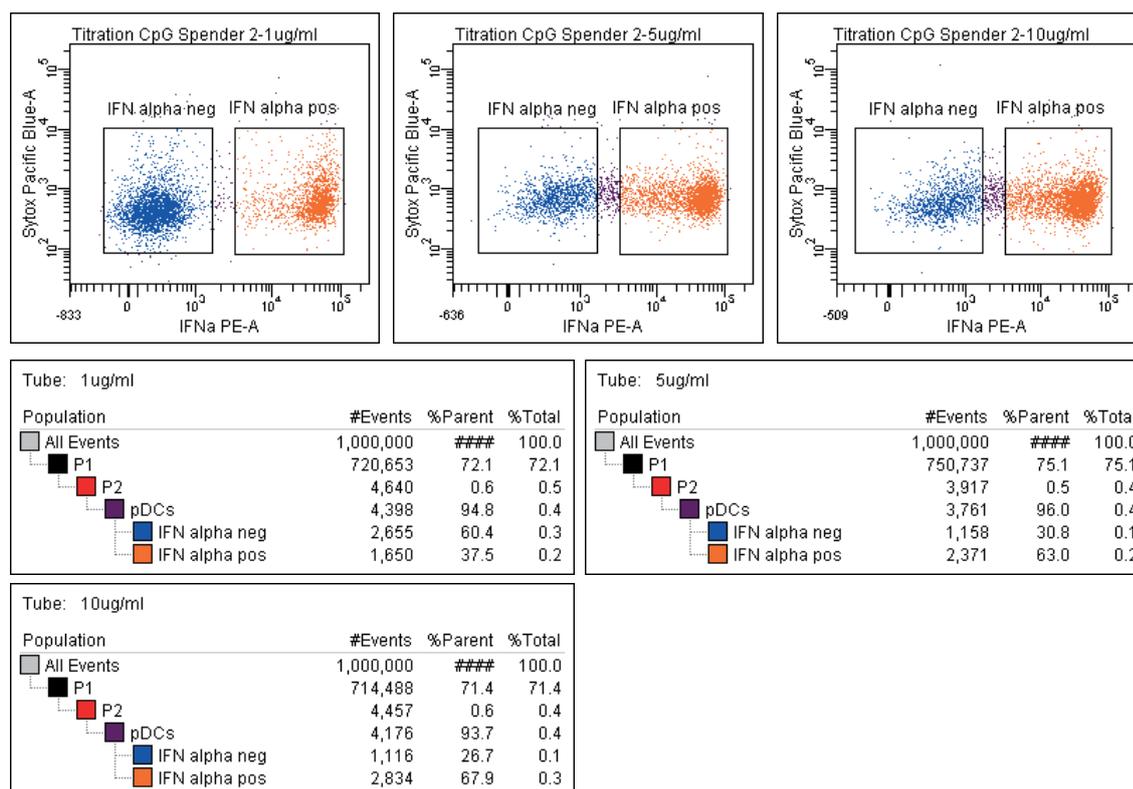


Abbildung 15: Titration von CpG-ODN 2216 in der Konzentration 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml

Dargestellt ist beispielhaft der Anteil der IFN- α -negativen und der IFN- α -positiven pDCs in [%] nach Stimulation mit CpG ODN 2216 in verschiedenen Konzentrationen (1 µg/ml), (5 µg/ml) und (10 µg/ml) in der durchflusszytometrischen Messung. Validiert an n = 3 Spendern.

Für drei Spender (n = 3) ergaben sich bei einer Konzentration von 1 µg/ml im Mittel 35,1 % IFN- α -positive pDCs und 62,5 % IFN- α -negative pDCs. Bei einer Konzentration von 5 µg/ml ergaben sich Mittelwerte für die IFN- α -positiven von 66,6 % und die IFN- α -negativen pDCs von 31,5 %. Mittelwerte von 65,4 % IFN- α -positiver und 29,0 % IFN- α -negativer Zellen zeigten sich bei einer Konzentration von 10 µg/ml (Abb. 16).

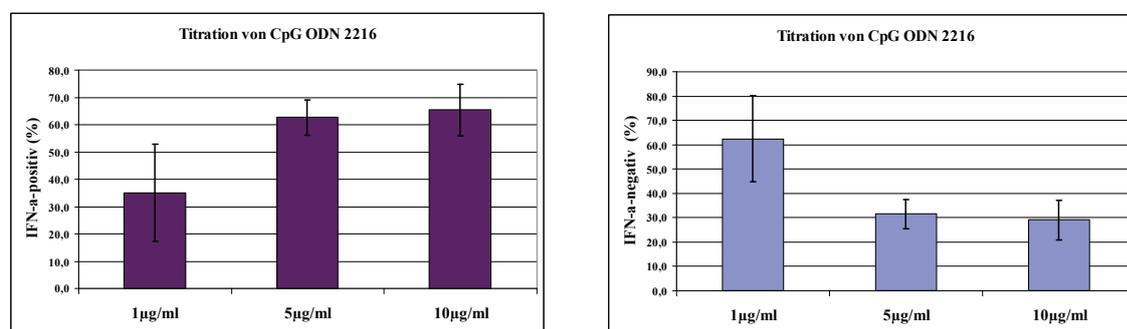


Abbildung 16: Validierung der Titration von CpG-ODN 2216 in der Konzentration 1 µg/ml, 5 µg/ml und 10 µg/ml

Geringste Ausbeute IFN- α -positiver pDCs (in [%] aller pDCs) unter Verwendung von CpG-ODN 2216 in einer Konzentration von 1 µg/ml bei gleichzeitiger Zunahme der IFN- α -negativen pDCs (in [%] aller pDCs). Dagegen vergleichbares reziprokes Zellmengen-Verhältnis unter Verwendung von CPG-ODN 2216 in der Konzentration von 5 µg/ml und 10 µg/ml. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung der Zellanteile (in [%] aller pDCs) von n = 3 Spendern.

Es wird deutlich, dass die Menge an pDCs unter Verwendung einer Konzentration von 1 µg/ml am geringsten ausfällt und unter Verwendung von 5 µg/ml zunimmt. Bei einer Konzentration von 10 µg/ml ergibt sich eine ähnlich optimale Stimulation der pDCs, wobei das Signal für BDCA-4 in der Durchflusszytometrie herunterreguliert wird.

Folglich werden bei einer Konzentration von 5 µg/ml beide pDC-Subpopulationen ausreichend erfasst. Es findet keine Unterstimulation statt. Ferner zeigt sich bei allen Konzentrationsstufen ein Intermediärbereich zwischen der IFN-α-positiven und der IFN-α-negativen Fraktion.

3.3 Untersuchung der pDCs auf TLR9

Um aufzuzeigen, dass alle pDCs über TLR9 verfügen, wurde ein weiteres Experiment durchgeführt. Im Folgenden zeigt sich beispielhaft, dass nachgewiesen werden konnte, dass alle pDCs, bezogen auf die Kontrolle mittels eines Isotyps, positiv mit einem TLR9-Antikörper intrazellulär angefärbt werden konnten. Wie unten dargestellt, waren 99,1 % aller Zellen TLR9-positiv (Abb. 17).

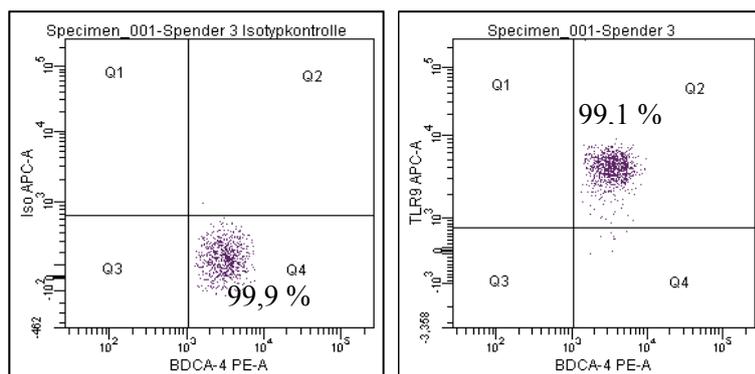


Abbildung 17: Homogene Expression von TLR9 in pDCs

Dargestellt sind beispielhaft die, wie zuvor beschrieben, gegateten pDCs eines Spenders in [%] nach Intrazellulärfärbung mit TLR9 sowie Anfärbung mittels Isotyp als Negativ-Kontrolle. Validiert an n = 3 Spendern.

Dieses Resultat konnte anhand von drei Spendern (n = 3) mit einem Mittelwert von 94,2 % bestätigt werden. Damit besitzen alle pDCs, sowohl die IFN-α-negativen Zellen als auch die IFN-α-positiven Zellen, Rezeptoren für TLR9 und damit sind sie sensibel für den TLR9-Liganden, das in diesem Projekt verwendete CpG-ODN 2216. Somit konnte die Methode der Stimulation validiert werden (Abb. 18).

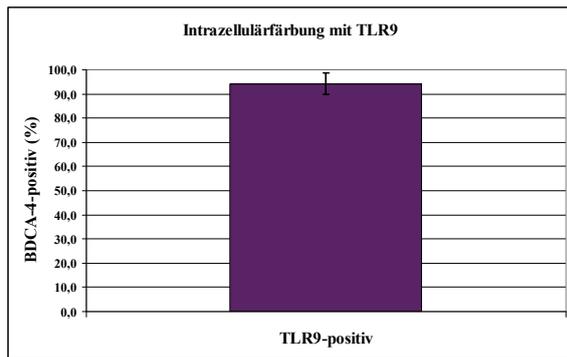


Abbildung 18: Validierung der Expression von TLR9

Nahezu alle pDCs exprimieren TLR9. Gezeigt sind Mittelwert und Standardabweichung der pDC-Population in [%] nach Intrazellulärfärbung des Probenmaterials von n = 3 Spendern.

3.4 Zellpopulationen und Reinheit IFN- α -positiver und IFN- α -negativer Zellen

Da pDCs sowohl positiv für BDCA-2 als auch BDCA-4 sind, wurden Vorversuche mit beiden Antikörpern durchgeführt. Beide Testreihen lieferten in etwa gleiche Eventzahlen an IFN- α -positiven Zellen (BDCA-2: 51,2 %, BDCA-4: 46,6 %), nur konnte gezeigt werden, dass unter Verwendung von BDCA-4 die IFN- α produzierende Population zum Einen deutlicher abgrenzbar als auch homogener erscheint, wie beispielhaft abgebildet (Abb. 19). Da BDCA-4 in geringem Maß auch andere Zellen markiert, wurde zur validen Eingrenzung der pDC-Population in allen weiteren Versuchen zur Anfärbung CD123 und Lineage Cocktail 1 verwendet.

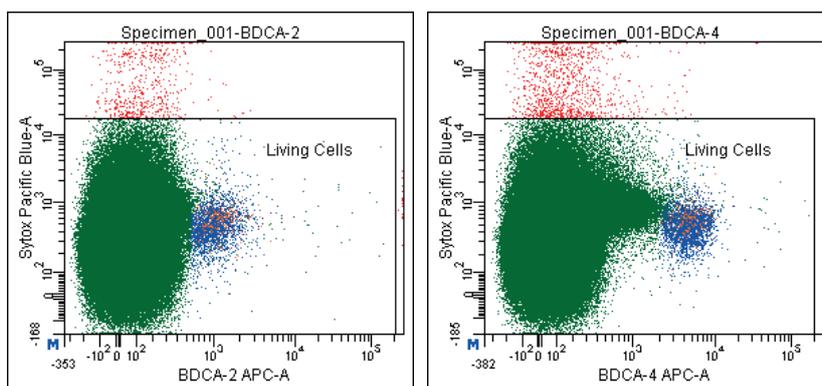


Abbildung 19: Homogenität der pDC-Population nach Anfärbung mit BDCA-2 vs. BDCA-4

Bessere Abgrenzbarkeit und Homogenität der pDC-Population in der durchflusszytometrischen Darstellung nach Anfärbung mit BDCA-4 vs. BDCA-2. Wiederholung mit n = 3 Spendern liefert vergleichbares Resultat.

Im Folgenden soll gezeigt werden, welche Zellpopulationen abgegrenzt wurden und welche Zellmengen unter weiterentwickelten optimierten Bedingungen erreicht werden konnten. Auch die Reinheit der IFN- α -negativen und IFN- α -positiven Zellpopulation konnte beleuchtet werden.

Die erste Grafik (Abb. 20, oben links) zeigt die Eingrenzung der Zellen – hier v.a. die Lymphozyten sowie einen Anschnitt der Monozyten und neutrophilen Granulozyten. Es folgen zwei Grafiken zum Ausschluss von Doubletten durch Festlegung der Analysefenster im Vorwärts- und Seitwärtsscatter.

Im weiteren Verlauf wurden die potentiell IFN- α produzierenden Zellen zunächst über BDCA-4 und dann über CD123 eingegrenzt. Es wurde darauf geachtet, dass diese Zellen negativ für den Lineage Cocktail 1 waren, welcher Lymphozyten, Monozyten, eosinophile und neutrophile Granulozyten anfärbt. Abschließend wurde anhand des IFN- α -Antikörpers dargestellt, welche pDCs IFN- α produzieren und welche diese Leistung nicht erbringen können. Unter optimierten Bedingungen erhielt man, wie unten dargestellt, einen Anteil der pDCs von 0,6 % an den Gesamtzellen. Davon waren 60,9 % der pDCs positiv für IFN- α und 22,0 % negativ für IFN- α , wie beispielhaft abgebildet (Abb. 20).

Ergebnisse

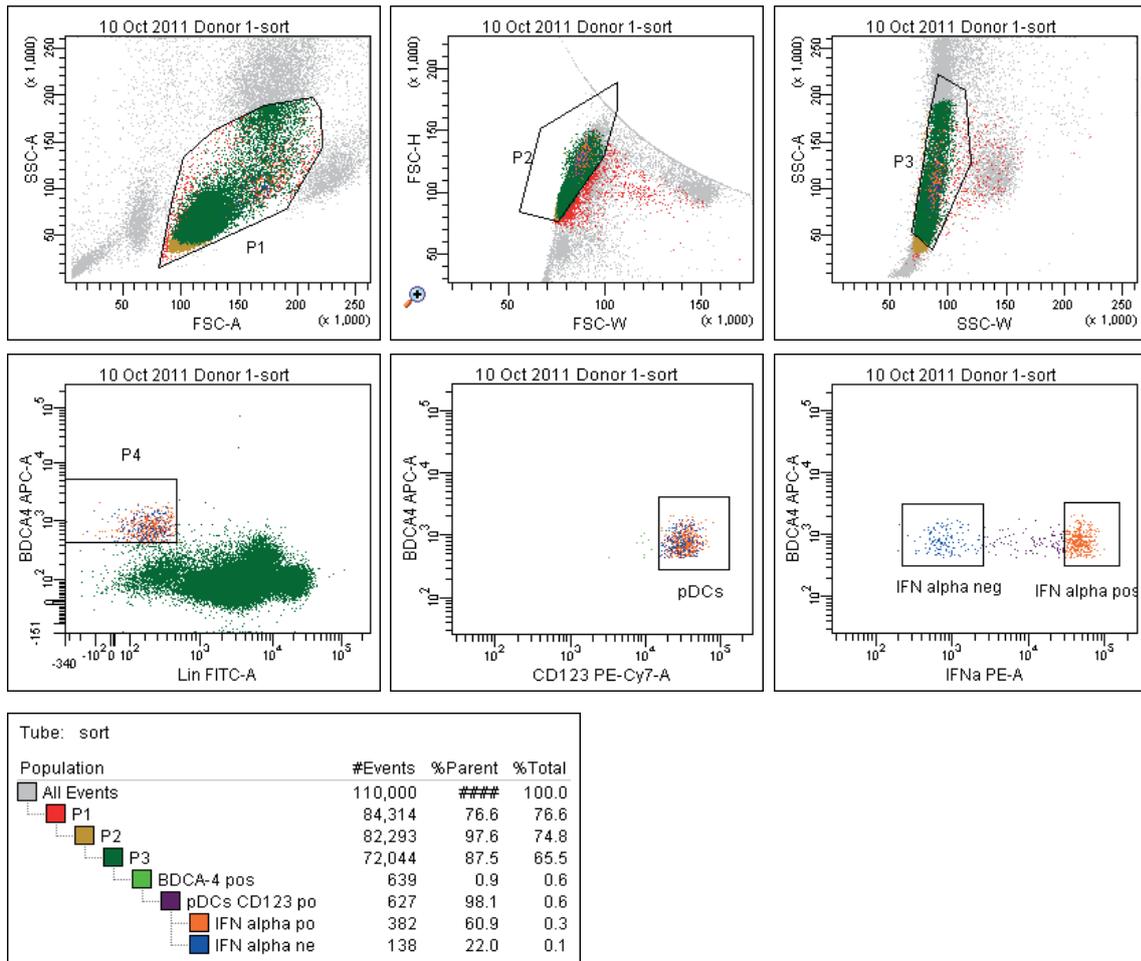


Abbildung 20: Darstellung der Zellpopulationen während des durchflusszytometrischen Sortierungsverganges – pDCs sind BDCA-4-positiv, CD123-positiv, Lineage-Cocktail 1-negativ

Dargestellt ist beispielhaft die Vorgehensweise des Eingrenzens der pDC-Subpopulationen während des durchflusszytometrischen Sortierungsverganges der zuvor gemäß Protokoll (siehe 2.5) behandelten und gefärbten Zellen eines Spenders. P1: Erweiterte Festlegung auf die Lymphozyten, P2: Doublette im Vorwärts-Scatter, P3: Doublette im Seitwärts-Scatter. Die pDCs sind BDCA-4-positiv, Lineage Cocktail 1-negativ und werden in den beiden folgenden Dotplots weiter über CD123 sowie IFN- α spezifiziert. Es ergeben sich zwei pDC-Subpopulationen – eine positiv und eine negativ für IFN- α .

Bei $n = 14$ Versuchswiederholungen ergaben sich Mittelwerte von 51,3 % IFN- α -positiver bzw. 22,3 % IFN- α -negativer pDCs (Abb. 21).

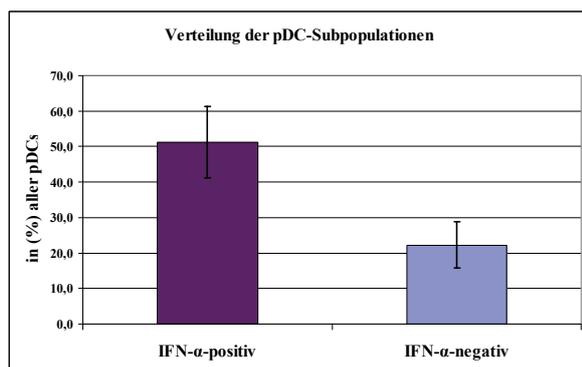


Abbildung 21: Mengenmäßige Verteilung der pDC-Subpopulationen

Der Anteil der IFN- α -positiven pDCs (in [%] aller pDCs) dominiert gegenüber den IFN- α -negativen pDCs (in [%] aller pDCs) nach Durchführung der durchflusszytometrischen Sortierung der gemäß Protokoll (siehe 2.5) behandelten und gefärbten Zellen von 14 Spendern. Gezeigt sind Mittelwerte und Standardabweichung (in [%] aller pDCs).

Bei den IFN- α -positiven Zellen ergab sich im Durchschnitt eine errechnete Reinheit von 99 % nach den 14 durchgeführten Sortierungsdurchläufen. Dazu wurde die Zellzahl der interessierenden Zell-Gruppe prozentual auf die Menge an lebenden Zellen bezogen (Abb. 22).

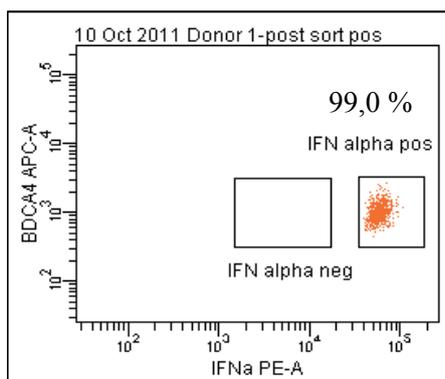


Abbildung 22: Repräsentative Darstellung der post-Sort-Kontrolle zur Errechnung der Reinheit der IFN- α -positiven Zellpopulation

Errechnung der Reinheit der IFN- α -positiven Zellpopulation in [%] durch prozentualen Bezug ihrer Zellzahl auf die Zahl aller lebenden Zellen. Zellen wie oben beschrieben gegatet, bei n = 14 Spendern wiederholt.

Bei den IFN- α -negativen Zellen ergab sich in der Regel eine errechnete Reinheit von 99,0 % nach den 14 Sortierungsdurchläufen (Abb. 23). Aufgrund der roten Farbe des verwendeten X-Vivo 15 Mediums, in welchem die aufgereinigten Zellen aufgefangen wurden, verschob sich die IFN- α -negative Population optisch nach rechts, was aber keine weitere Bedeutung hatte. Das X-Vivo 15 Medium wurde verwendet, um den Verdau der RNA durch RNasen zu vermindern.

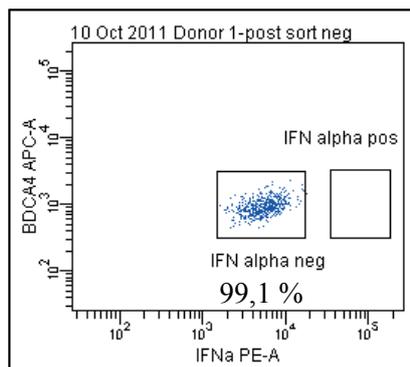


Abbildung 23: Repräsentative Darstellung der post-Sort-Kontrolle zur Errechnung der Reinheit der IFN- α -negativen Zellpopulation

Errechnung der Reinheit der IFN- α -negativen Zellpopulation in [%] durch prozentualen Bezug ihrer Zellzahl auf die Zahl aller lebenden Zellen. Zellen wie oben beschrieben gated, bei n = 14 Spendern wiederholt.

Damit konnte gezeigt werden, dass innerhalb der pDCs zwei Populationen, eine IFN- α -positive und eine IFN- α -negative Population mit optimaler Reinheit unterschieden werden kann. Dabei konnte die Ausbeute der IFN- α -positiven Zellen durch Zugabe von Dotap und IL-3 zum Stimulans CpG-ODN 2216 signifikant erhöht werden. Durch Markierung der Zellen als BDC4-positiv, CD123-positiv sowie Lineage Cocktail 1-negativ erreichte die Reinheit der hier interessierenden IFN- α -positiven und -negativen Zellpopulation in Prozent der lebenden Zellen betrachtet nahezu 100 %. Es kann folglich davon ausgegangen werden, dass es sich bei den Zellen um pDCs und nicht um unspezifisch angefärbte Zellen handelt.

3.5 Vitalität IFN- α -positiver und IFN- α -negativer Zellen

Um die Vitalität der Zellen zu überprüfen und damit der Fragestellung nachzugehen, ob es sich bei den IFN- α -negativen Zellen um tote Zellen handeln könnte, wurde in Vorversuchen zu jeder der zu analysierenden Probe 0,2 μ l Sytox® Blue *Dead Cell Stain* 5 Minuten vor der durchflusszytometrischen Messung hinzugefügt. Insgesamt zeigte sich beispielhaft, dass 99,9 % aller Zellen lebten (Abb. 24).

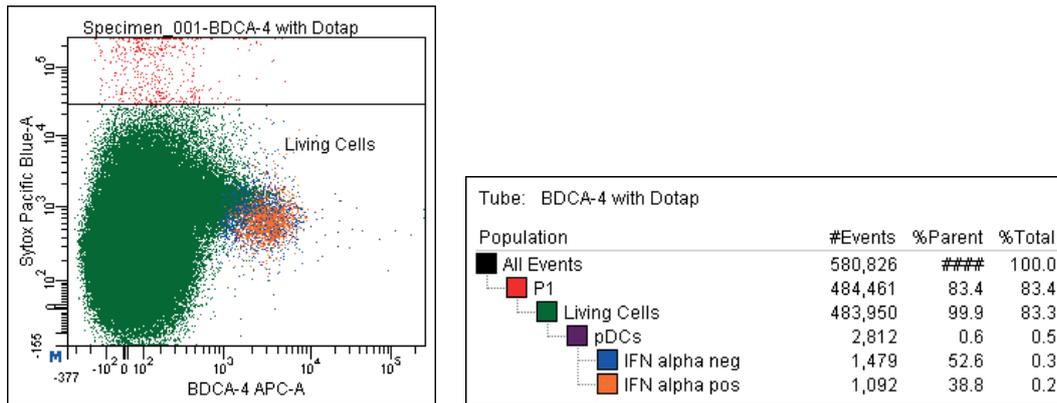


Abbildung 24: Vitalität der pDCs

Repräsentative durchflusszytometrische Darstellung der Vitalität der pDCs. Sowohl die IFN- α -positive als auch die IFN- α -negative Subpopulation reichert den Farbstoff Sytox® Blue *Dead Cell Stain* nicht an. Sie zählen damit zu den lebenden Zellen. Validiert anhand n = 4 Proben.

In n = 4 Versuchswiederholungen ergab sich ein Mittelwert von 92,0 %. Die gesamte pDC-Fraktion konnte als lebend identifiziert werden. Somit handelte es sich sowohl bei den IFN- α -positiven als auch den IFN- α -negativen pDCs um lebende Zellen (Abb. 25).

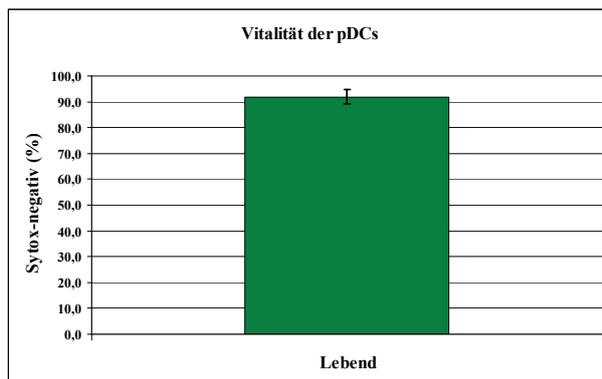


Abbildung 25: Validierung der Vitalität aller pDCs

Vitalität aller pDCs nach Durchlaufen des Protokolls (siehe 2.5). Beide pDC-Subpopulationen sind negativ für den Lebend-/Tod-Farbstoff Sytox® Blue und zählen damit zu den insgesamt 92,0 % aller lebenden Zellen. Gezeigt wird Mittelwert und Standardabweichung des Anteils lebender Zellen in [%], welche sich bei n = 4 Spendern ergeben.

Im weiteren Verlauf des Projekts wurde das Sytox® Blue *Dead Cell Stain* nicht mehr zu den Proben direkt gegeben, um auszuschließen, dass der Farbstoff über die Dauer des Aufreinigung in die Zellen diffundiert und somit falsch positive Ergebnisse vortäuscht. Stattdessen wurden 2 μ l des Markers für tote Zellen direkt zum Post-Sort gegeben, nachdem die Zellen durchflusszytometrisch bereits in eine IFN- α -positive und eine IFN- α -negativ Population aufgeteilt worden waren. Die Lebendzellrate veränderte sich dadurch nicht.

3.6 RNA-Menge und Reinheit der RNA beider Zellfraktionen

Nachdem die Proben von jeweils zwei bzw. drei Spendern, sowohl die IFN- α -positive als auch die IFN- α -negative Population, auf gleiche Zellzahlen anhand der jeweiligen geringeren Zellzahl (*fett markiert*) jeden Spenders eingestellt wurden, wurden die entsprechenden Mengen vereinigt.

Im Folgenden soll dargestellt werden, welche Zellzahlen sich aus den durchgeführten Sortierungen ergeben haben, welche Proben nach Einstellung der Zellzahl vereinigt wurden und welche RNA-Konzentrationen sich daraus ergaben (Tab. 5):

Tabelle 5: Zellzahlen und RNA-Mengen der Zellfraktionen

Auf- gereinigte Probe	Zellzahl		RNA gepoolt (ng) in 16 μ l		RNA/ Zelle (pg)		Probe für DNA- Microarray
	IFN- α - negativ	IFN- α - positiv	IFN- α - negativ	IFN- α - positiv	IFN- α - negativ	IFN- α - positiv	
1	34383	57982	171	205	3,14	3,76	I
2	27268	107036					
3	35875	99948	106	131	1,67	2,06	II
4	31790	76590					
5	14155	28838	109	157	1,05	1,51	III
6	42299	46846					
7	47343	93357					
8	98703	141295	198	205	1,20	1,24	IV
9	66516	164863					

Die Reinheit der einzelnen RNA-Proben lag zwischen 1,9 und 2 und damit im optimalen Bereich.

3.7 RT-PCR – Humane Zytokine

Anhand der durchgeführten RT-PCR zum Thema humane Zytokine, konnten erste Einblicke darüber gewonnen werden, welche genetische Ausstattung die pDCs zur Zytokinproduktion neben dem bereits bekannten IFN- α hervorbringen. Die folgende Abbildung zeigt, welche Gene in der Gruppe der IFN- α -positiven Zellen im Gegensatz zur Gruppe der IFN- α -negativen Zellen höher exprimiert sind sowie Gene, die in der

IFN- α -positiven Gruppe im Vergleich zu der IFN- α -negativen Gruppe niedriger exprimiert sind (Abb. 26). Annotation und Werte der *Fold Regulation* befinden sich im Anhang (Tab. 8 und 9). Interessant ist, dass die IFN- α -positiven Zellen mehr BMP4, IL-12p35 und PDGF produzieren. Weiterhin fällt auf, dass die Gruppe der IFN- α -negativen Zellen mehr Inhibin- β_A produziert und BAFF exprimiert. Die Testresultate stellen eine sehr gute Validierung der Methodik des Protokolls zur Oberflächenmarkierung der IFN- α -Produktion sowie der durchflusszytometrischen Aufreinigung dar. So kann eindeutig durch das Vorkommen mehrerer Gene für IFN- α gezeigt werden, dass es im vorliegenden Projekt gelungen ist, die pDCs in eine IFN- α -positive und eine IFN- α -negative Population zu trennen und diese auch als solche zu identifizieren.

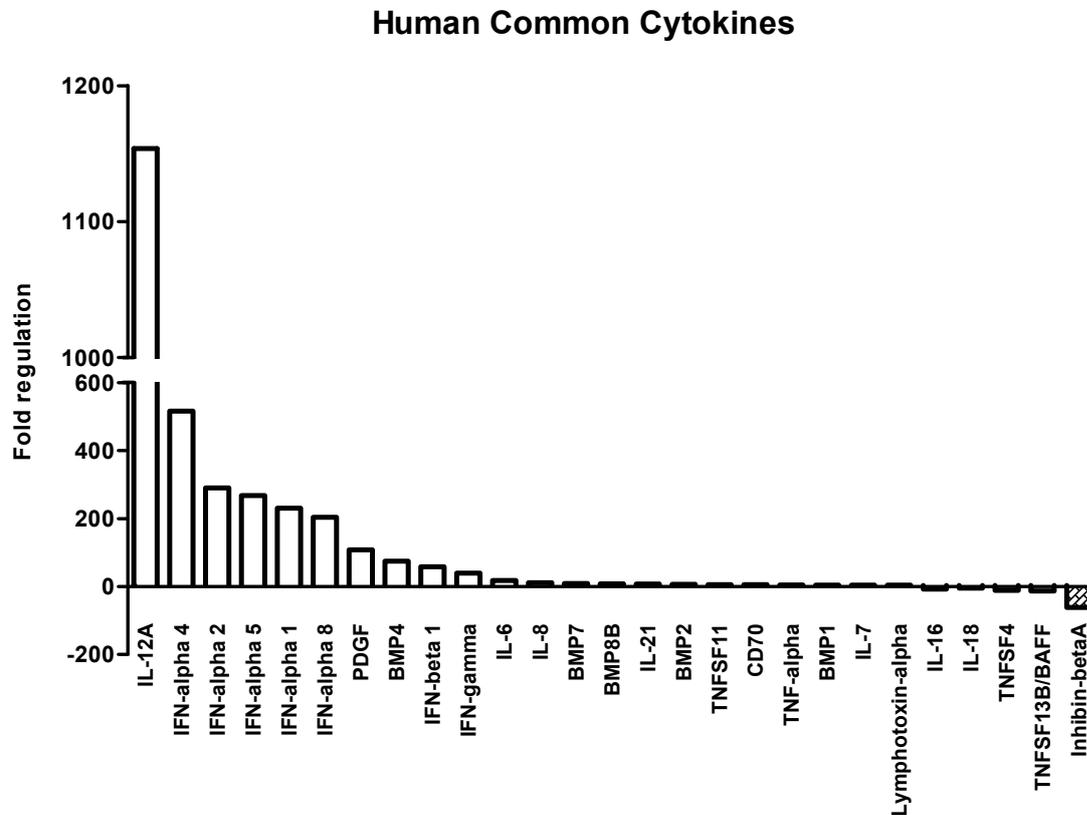


Abbildung 26: Humane Zytokine – Übersicht der quantitativen Beurteilung der differentiellen Genexpressionen

Abgebildet sind die Zytokine, die im Experiment der RT-PCR zur Untersuchung auf „Humane Zytokine“ in der Test-Gruppe (IFN- α -positive Subpopulation) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (IFN- α -negative Subpopulation) hoch- oder herunterreguliert waren. Die *Fold Regulation* spiegelt die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression wieder. Positive Werte entstehen bei vermehrter Transkription eines Gens in der Test-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe. Negative Werte gründen auf einer geringeren Transkription. Somit können die Zytokine mit positiven Werten in der *Fold Regulation* der Gruppe der IFN- α -positiven Subpopulation zugeordnet werden, während die Zytokine mit negativen Werten vermehrt in der Gruppe der IFN- α -negativen Subpopulation vertreten sind. Zellmaterial von n = 3 Spendern. Annotation und Werte der *Fold Regulation* befinden sich im Anhang (Tab. 8 und 9).

Somit konnte gezeigt werden, dass die IFN- α -positiven Zellen neben Genen für IFN- α selbst noch weitere Gene für Zytokine exprimieren. Weiterhin konnte ein erster Eindruck gewonnen werden, welche Zytokin-Genexpression seitens der IFN- α -negativen Zellen bereitgestellt wird. Damit kann die Frage beantwortet werden, ob diese Zellen, wenn sie kein IFN- α produzieren auch keine anderen Zytokine produzieren können. Hier wird deutlich, dass sie sehr wohl andere Zytokine herstellen können. Diese Erkenntnisse sind bedeutend, um herauszufinden, welche Subpopulation innerhalb der pDCs für bekannte immunologischen Funktionen verantwortlich gemacht werden kann und ob ihnen noch zusätzliche Funktionen im Immunsystem zugeschrieben werden können.

3.8 RT-PCR – Humane Zelloberflächenmarker

Zur Klärung, ob es Oberflächenmarker gibt anhand derer sich die beiden untersuchten Zellpopulationen, positiv oder negativ für IFN- α , unterscheiden lassen, wurde zunächst auch auf molekulargenetischer Ebene nach Genen für verschiedene Oberflächenmarker gesucht. In der folgenden Tabelle sind die Gene mit den größten Unterschieden zwischen den beiden Gruppen sowie die Gene, die im Hinblick auf eine nachfolgende Oberflächenfärbung unter Hinzuziehung der Literatur relevant erscheinen, hervorgehoben. So zeigte sich, dass die Gruppe der IFN- α -positiven Zellen mehr CD2, CD3, CD19, CD21, CD22 und CD161 als die IFN- α -negativen Zellen exprimierten. Die Gruppe der IFN- α -negativen Zellen exprimierte im Vergleich zu den positiven Zellen mehr CD26, CD95 und CD209 (Abb. 27). Annotation und Werte der *Fold Regulation* befinden sich im Anhang (Tab. 10 und 11). Damit konnte gezeigt werden, dass beide Gruppen auf molekulargenetischer Ebene für unterschiedliche Oberflächenmarker mehr oder weniger stark kodieren.

Human Cell Surface Markers

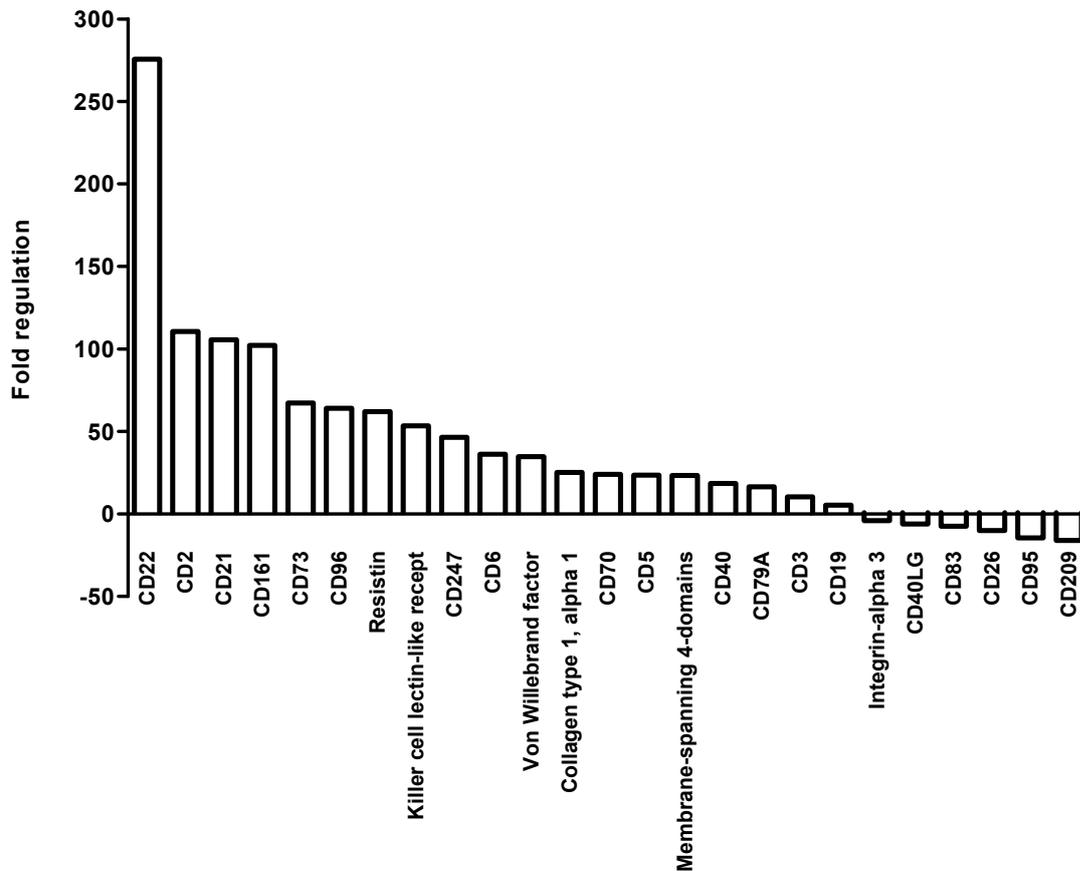


Abbildung 27: Humane Zelloberflächenmarker – Übersicht der quantitativen Beurteilung der differentiellen Genexpressionen

Abgebildet sind die Zytokine, die im Experiment der RT-PCR zur Untersuchung auf „Humane Zelloberflächenmarker“ in der Test-Gruppe (IFN- α -positive Subpopulation) im Vergleich zur Kontroll-Gruppe (IFN- α -negative Subpopulation) hoch- oder herunterreguliert waren. Die *Fold Regulation* spiegelt die quantitative Beurteilung der differentiellen Genexpression wieder. Positive Werte entstehen bei vermehrter Transkription eines Gens in der Test-Gruppe gegenüber der Kontroll-Gruppe. Negative Werte gründen auf einer geringeren Transkription. Somit können die Zytokine mit positiven Werten in der *Fold Regulation* der Gruppe der IFN- α -positiven Subpopulation zugeordnet werden, während die Zytokine mit negativen Werten vermehrt in der Gruppe der IFN- α -negativen Subpopulation vertreten sind. Zellmaterial von $n = 3$ Spendern. Annotation und Werte der *Fold Regulation* befinden sich im Anhang (Tab. 10 und 11).

3.9 Oberflächenfärbung von pDCs

3.9.1 Markierung der Zellen mit ausgewählten Antikörpern – aus dem Experiment: RT-PCR zu humanen Zelloberflächenmarkern

Um herauszufinden, ob sich die auf molekulargenetischer Ebene gefundenen Resultate auch anhand der Oberflächenmarker der Zellen selbst widerspiegeln lassen können, wurden IFN- α -positive und IFN- α -negative Zellen mit den entsprechenden Antikörpern gegen die interessierenden Oberflächenmarker angefärbt. Von Interesse war es auch, ob

sich diese Oberflächenmarker bereits auf unstimulierten Zellen nachweisen lassen, um pDCs bzw. ihre Subpopulationen schon vor einer Stimulationen sichtbar und auswählbar machen zu können.

Es zeigte sich kein eindeutiger Unterschied in der Oberflächenmarker-Expressierung zwischen den unstimulierten vs. stimulierten Zellen.

In der Gruppe IFN- α -positiv vs. IFN- α -negativ zeigten sich teilweise Unterschiede in der Expressierung der ausgewählten Marker, bei Betrachtung der MFI-Werte. So konnte den IFN- α -positiven Zellen ein geringfügig deutlicheres Signal in der Durchflusszytometrie für CD26, CD22, CD21, CD161, CD95, CD209 und CD2 zugeschrieben werden. Zur endgültigen Klärung der Frage, ob bei diesen Markern Unterschiede auf Proteinebene vorliegen, sind weitere Untersuchungen notwendig.

3.9.2 Untersuchung der pDCs auf CD9

Nach Durchführung einer Oberflächenmarkierung der IFN- α -Produktion und Anfärbung der Zellen mittels IFN- α , BDCA-4 sowie CD9 bzw. einer Isotyp-Kontrolle, konnte gezeigt werden, dass sowohl die Population der IFN- α -negativen Zellen als auch die Population der IFN- α -positiven Zellen, im Vergleich zur Isotyp-Kontrolle, CD9 exprimieren. Wie im Folgenden beispielhaft dargestellt, sind 71,0 % der IFN- α -negativen pDCs positiv für CD9 und 73,0 % der IFN- α -positiven pDCs positiv für CD9. Geringe Zellmengen beider Gruppen erscheinen im Dotplot negativ für CD9 (Abb. 28).

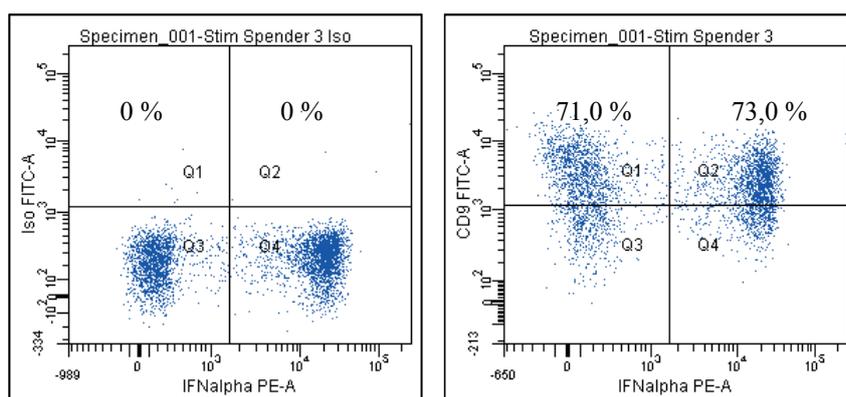


Abbildung 28: CD9-Expression bei allen pDCs

Repräsentative Darstellung der durchflusszytometrischen Messung aller pDCs eines Spenders. Nach Durchlaufen des Protokolls (siehe 2.5) zur Oberflächenmarkierung der IFN- α -Produktion und zusätzlicher Anfärbung der IFN- α -positiven und IFN- α -negativen pDCs mit CD9 wird sichtbar, dass beide Subpopulationen CD9 (in [%] aller pDCs) exprimieren. Zum Vergleich dient eine Isotyp-Kontrolle. Versuchswiederholung mit $n = 3$ Spendern.

Dieses Ergebnis konnte anhand von drei Spendern ($n = 3$) verifiziert werden. Hier ergab sich bei Feststellung des Mittelwertes, dass 70,7% der IFN- α -negativen Zellen und 74,0% der IFN- α -positiven Zellen positiv für CD9 waren. Damit ist eine Diskriminierung humaner pDCs in Subpopulationen anhand von CD9 nicht möglich (Abb. 29).

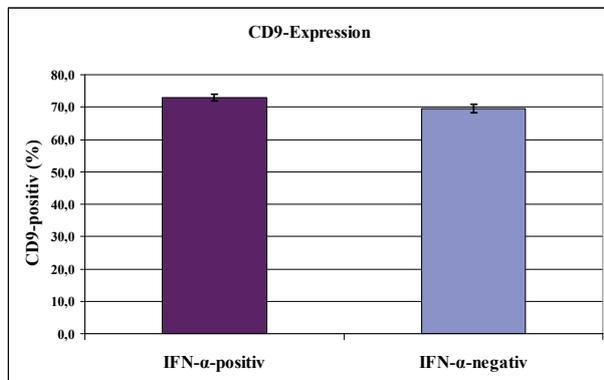


Abbildung 29: Validierung der CD9-Expression aller pDCs

Sowohl die IFN- α -positive als auch die IFN- α -negative Subpopulation der pDCs zeigt prozentual betrachtet eine annähernd identische CD9-Expression (in [%] aller pDCs). Dargestellt sind Mittelwerte und Standardfehler (in [%] aller pDCs) beider Zellgruppen nach Untersuchung von $n = 3$ Spendern.

3.10 Whole-Genome-DNA-Oligonukleotid-Microarray

Um der Haupt-Fragestellung der Arbeit nachzugehen, ob die beiden pDC-Populationen bestimmte Gene aufweisen, die hinsichtlich der Zytokinproduktion auf Subpopulationen innerhalb der pDCs hindeuten lassen und welche immunologische Rolle ihnen damit zuzuschreiben sein kann, wurde ein *DNA-Oligonukleotid-Microarray* mit Sonden gegen alle ca. 21000 bekannten Gene gespottet, durchgeführt. Mit diesen wurden die Transkriptionsprofile der Subpopulationen gemessen.

Es wurden die Profile von acht biologischen Proben in vier Zweifarb-Hybridisierungen, also auf vier Arrays gemessen. Die M-Werte sollten bei allen vier Arrays korrelieren, da sie alle das Differentialprofil von IFN- α -positiven und IFN- α -negativen Zellen darstellen. Tatsächlich zeigten aber nur die M-Werte der Arrays I und II eine starke Korrelation, während die Arrays III und IV untereinander nur schwach korrelierten und zu den Arrays I und II praktisch nicht korrelierten bzw. deutliche systematische Unterschiede zeigten (Abb 30).

Ergebnisse

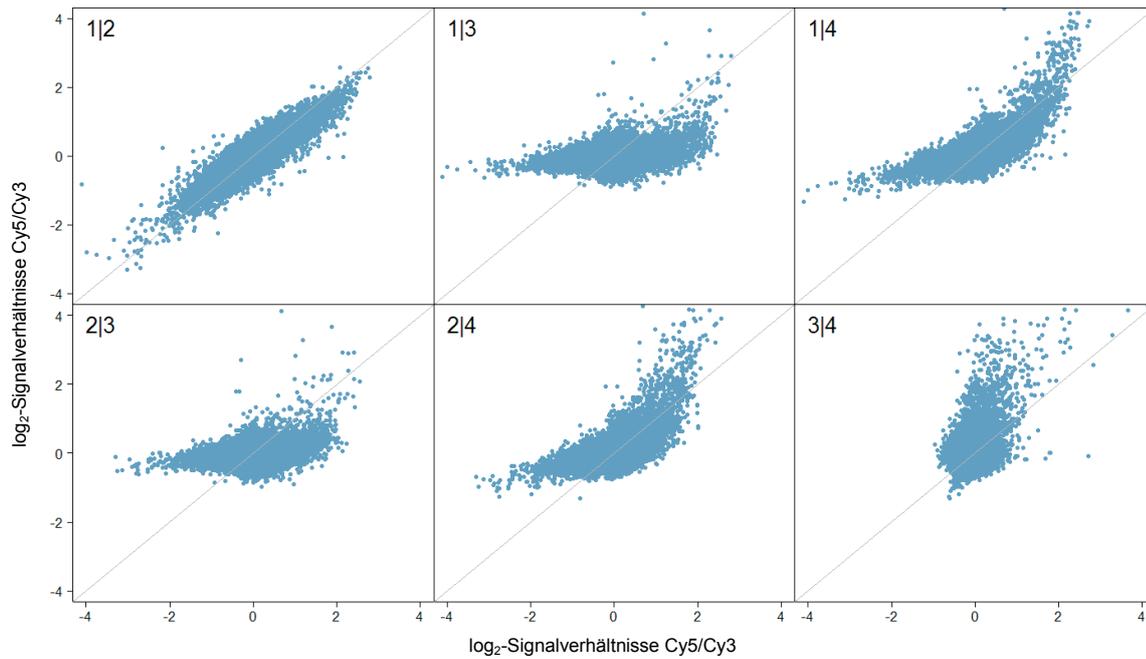


Abbildung 30: Korrelationen der M-Werte der vier Arrays.

Die Zahlen in den Diagrammen zeigen, welche beiden der vier Arrays jeweils miteinander verglichen wurden. Bei idealer Korrelation sollten die M-Werte entlang der grauen Linie liegen.

Es lagen keine Informationen vor, die einen Hinweis darauf hätten geben können, dass die Proben der Arrays III und IV problematisch waren oder die Messung (Amplifikation, Markierung, Hybridisierung, Waschen, Scan und Bildauswertung) bei diesen Arrays nicht funktioniert hat. Daher wurde versucht, die Gesamtinformation zu nutzen, gleichzeitig aber zu berücksichtigen, dass die Ergebnisse bei Verwendung einer Untergruppe der vier Arrays für einzelne Gene deutlich anders aussehen konnten. Schließlich wurden drei verschiedene Analysen durchgeführt, um differentiell exprimierte Gene zu identifizieren:

A = Analyse der Arrays I und II

B = Analyse der Arrays III und IV

C = Analyse aller vier Arrays gemeinsam

Die Ergebnisse der drei Analysen sind in Abb. 31 zusammengefasst.

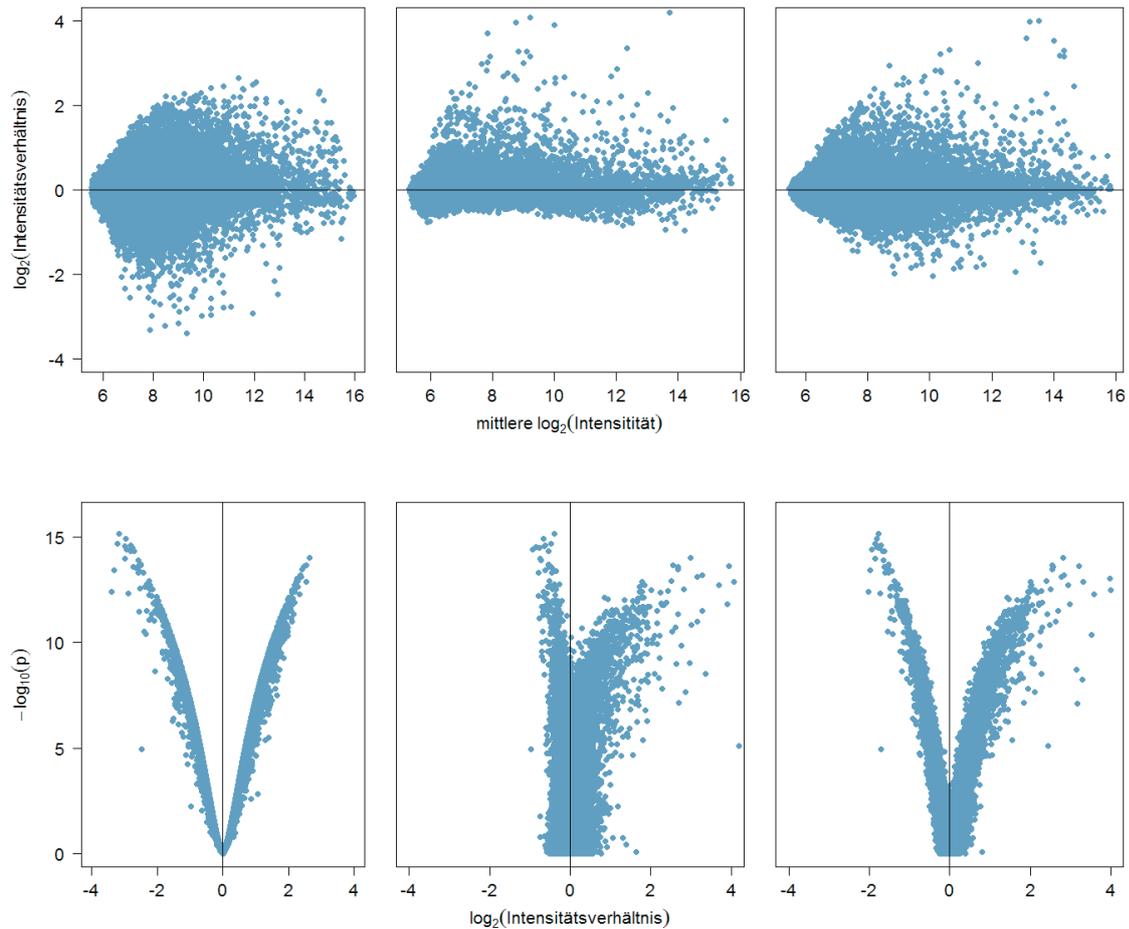


Abbildung 31: Ergebnisse der Analysen A, B und C der Microarraydaten (von links nach rechts).

Obere Reihe: MA-Diagramme. Mittlere differenzielle Expressionen (M) in Abhängigkeit der mittleren Expression (A). Beide Achsen sind logarithmisch zur Basis 2. Jeder Punkt repräsentiert eine Sonde. Positive bzw. negative Werte von M zeigen eine stärkere Expression in IFN- α -positiven bzw. IFN- α -negativen Zellen. Je weiter rechts ein Punkt liegt (größere A-Werte), desto größer ist die Spotintensität, gemittelt über IFN- α -positive und IFN- α -negative Zellen, die so als ein ungefähres Maß für die mittlere Transkriptabundanz dient.

Untere Reihe: Vulkan-Diagramme. Empirische Signifikanz der differentiellen Expression in Abhängigkeit vom Mittelwert. Beide Achsen sind logarithmisch. Jeder Punkt repräsentiert das Ergebnis für eine Sonde. Je höher ein Punkt liegt, desto kleiner ist der p-Wert des moderierten t-Tests ("empirische Signifikanz"). Auf der horizontalen Achse ist der Logarithmus der mittleren differentiellen Expression aufgetragen: positive bzw. negative Werte zeigen eine stärkere mittlere Expression in IFN- α -positiven bzw. IFN- α -negativen Zellen.

Die Diagramme in der mittleren Spalte von Abb. 31 weisen auf Probleme mit den Arrays III und IV hin.

In Abb. 32 erkennt man, dass die Berücksichtigung der möglicherweise problematischen Arrays III und IV in der gemeinsamen Analyse (C) die Ergebnisse nicht wesentlich beeinflussten. Die differentiellen Expressionswerte (LFC: \log_2 *fold-changes*, IFN- α -positiv bzw. IFN- α -negativ) korrelierten stark, auch die Signifikanzen ($-\log_{10}(p)$) korrelierten noch, allerdings waren die p-Werte aufgrund der starken Streuung der

Werte der Arrays III und IV im Vergleich zu den Werten der Arrays I und II deutlich kleiner.

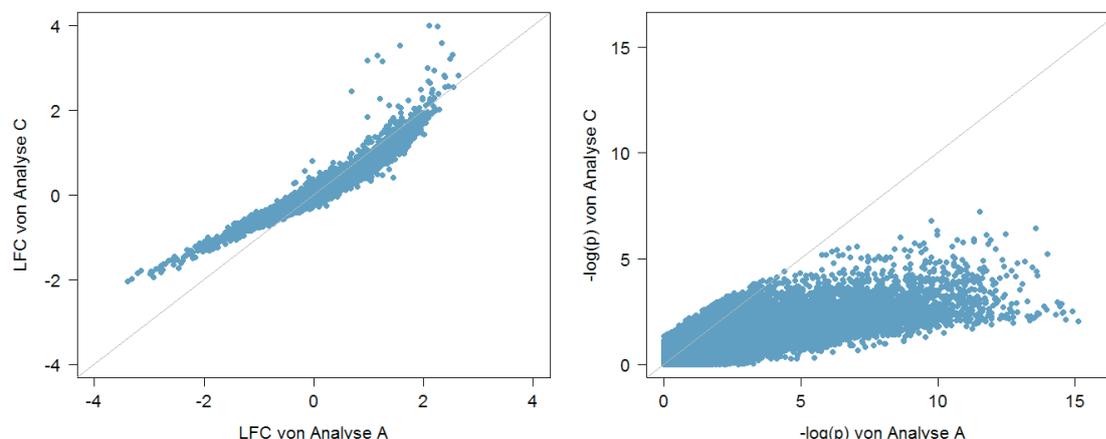


Abbildung 32: Korrelation der Ergebnisse der Analysen A und C der Microarraydaten.

Jeder Punkt repräsentiert den Mittelwert für eine Sonde. Bei idealer Korrelation sollten die Punkte in der Nähe der grauen Linie liegen. **Links:** Korrelation der LFC-Werte. $LFC = \log_2$ differentielle Expression von INF- α -positiven zu INF- α -negativen Zellen. **Rechts:** Korrelation der Signifikanzen. Gezeigt sind die negativen dekadischen Logarithmen der p-Werte. Größere Werte zeigen eine größere empirische Signifikanz der differentiellen Expression.

Eine Auswahl von Kandidatengenens anhand der p-Werte, z.B. unter Kontrolle der Falsch-Positiven-Rate (FDR, *false discovery rate*) hätte bei Analyse A zu einer unbrauchbar großen Liste geführt. Bei Analyse C wären keine Kandidaten übriggeblieben. Daher wurde beschlossen, zunächst solche Gene weiter zu betrachten, die in beiden Analysen (A und C) eine mindestens zweifache differentielle Expression zeigten ($|LFC| > 1$), ohne dabei die p-Werte zu berücksichtigen (siehe Anhang, Tab. 12 und 13). Unter diesen Kandidaten wurde weiteres Augenmerk auf diejenigen Gene gelegt, deren Produkte im Zusammenhang mit Immunzellantworten stehen (Tab. 6 und 7).

Tabelle 6: Interessierende Kandidaten mit differentieller Expression in der IFN- α -positiven Subpopulation

Angegeben sind der Name des Gens, das offizielle Gensymbol sowie zugehörige statistische Werte. Auswahl basierend auf den Schnittmengen der Ergebnisse der Gruppen A, B und C. Listen dieser Gene mit ausführlicher Annotation befinden sich im Anhang.

IFN- α -positive Subpopulation			
Name	Gene	LFC \pm KI	Adj. p-value
Pattern Recognition			
C-Type Lectin Domain Family 2, Member B	<i>CLEC2B</i>	1,71 \pm 0,23	< 0,001
C-Type Lectin Domain Family 2, Member D	<i>CLEC2D</i>	1,69 \pm 0,27	< 0,001

IFN-α-positive Subpopulation			
Name	Gene	LFC \pm KI	Adj. p-value
Inflammatory Cytokines & Receptors			
Interferon- α	<i>IFNA2</i>	2,49 \pm 0,22	< 0,001
	<i>IFNA4</i>	1,16 \pm 0,22	< 0,001
	<i>IFNA5</i>	1,58 \pm 0,22	< 0,001
	<i>IFNA6</i>	2,33 \pm 0,25	< 0,001
	<i>IFNA8</i>	0,99 \pm 0,22	< 0,001
	<i>IFNA10</i>	2,11 \pm 0,22	< 0,001
	<i>IFNA14</i>	2,27 \pm 0,22	< 0,001
	<i>IFNA21</i>	1,26 \pm 0,22	< 0,001
BMP4	<i>BMP4</i>	1,94 \pm 0,24	< 0,001
Interleukin 6	<i>IL6</i>	2,19 \pm 0,23	< 0,001
Interleukin 8	<i>IL8</i>	1,88 \pm 0,23	< 0,001
Interleukin 10 Receptor-alpha	<i>IL10RA</i>	0,94 \pm 0,22	< 0,001
Interleukin 12A, p35	<i>IL12A</i>	2,20 \pm 0,22	< 0,001
Interleukin 18 Rezeptor assoziiertes Protein	<i>IL18RAP</i>	1,49 \pm 0,26	< 0,001
Interleukin 28A	<i>IL28A</i>	1,20 \pm 0,22	< 0,001
Prostaglandin E Receptor	<i>PTGER4</i>	1,22 \pm 0,23	< 0,001
Prostaglandin-Synthase und Prostaglandin-Cyclooxygenase	<i>PTGS2</i>	2,56 \pm 0,22	< 0,001
T-cell & B-cell Antigen Activation			
CD48	<i>CD48</i>	1,77 \pm 0,23	< 0,001
Chemokine Ligand 2	<i>CXCL2</i>	0,84 \pm 0,23	< 0,001
Chemokine Ligand 3	<i>CCL3</i>	1,01 \pm 0,23	< 0,001
Chemokine Ligand 3-like 3	<i>CCL3L3</i>	1,46 \pm 0,22	< 0,001
Chemokine Ligand 11	<i>CXCL11</i>	1,56 \pm 0,27	< 0,001
Integrin-beta 5	<i>ITGB5</i>	1,48 \pm 0,22	< 0,001
Other Genes Related to Immune Cell Response			
Indoleamine-2,3-dioxygenase	<i>INDO</i>	1,52 \pm 0,28	< 0,001
Tissue Factor Pathway Inhibitor 2	<i>TFPI2</i>	1,72 \pm 0,26	< 0,001
Adapters, Effectors & Signal Transducers			
Adenosin A2b-Receptor	<i>ADORA2B</i>	1,93 \pm 0,22	< 0,001
Aquaporin 9	<i>AQP9</i>	1,41 \pm 0,22	< 0,001
Nexilin	<i>NEXN</i>	1,98 \pm 0,27	< 0,001

Tabelle 7: Interessierende Kandidaten mit differentieller Expression in der IFN- α -negativen Subpopulation

Angegeben sind der Name des Gens, das offizielle Gensymbol sowie zugehörige statistische Werte. Auswahl basierend auf den Schnittmengen der Ergebnisse der Gruppen A, B und C. Listen dieser Gene mit ausführlicher Annotation befinden sich im Anhang.

IFN-α-negative Subpopulation			
Name	Gene	LFC \pm KI	Adj. p-value
Pattern Recognition			
C-Type Lectin Domain Family 4, Member A	<i>CLEC4A</i>	-2,31 \pm 0,23	< 0,001
TLR7	<i>TLR7</i>	-0,81 \pm 0,22	< 0,001
Inflammatory Cytokines & Receptors			
Prostacyclin-Receptor/ Prostaglandin I ₂ -Receptor	<i>PTGIR</i>	-1,17 \pm 0,22	< 0,001
T-cell & B-cell Antigen Activation			
CD2	<i>CD2</i>	-1,61 \pm 0,22	< 0,001
CD97	<i>CD97</i>	-2,79 \pm 0,22	< 0,001
Colony Stimulating Factor 1 Receptor/ CD115	<i>CSF1R</i>	-2,52 \pm 0,26	< 0,001
Inhibin-beta A	<i>INHBA</i>	-0,79 \pm 0,24	< 0,001
TGF-beta-induced	<i>TGFBI</i>	-1,53 \pm 0,22	< 0,001
TGF-beta Receptor 2	<i>TGFBR2</i>	-2,71 \pm 0,22	< 0,001
Other Genes Related to Immune Cell Response			
CXXC finger 5	<i>CXXC5</i>	-2,16 \pm 0,26	< 0,001
Purinergic Receptor P 2Y, 14	<i>P2RY14</i>	-1,94 \pm 0,23	< 0,001
Retinoic Acid Receptor-alpha	<i>RARA</i>	-2,38 \pm 0,24	< 0,001
Secernin 1	<i>SCRNI</i>	-2,04 \pm 0,23	< 0,001
Sodium-dependent Phosphate Transporter	<i>SLC20A1</i>	-0,39 \pm 0,25	< 0,01
Adapters, Effectors & Signal Transducers			
Thrombomodelin	<i>THBD</i>	-2,97 \pm 0,23	< 0,001

Die Ergebnisse des *DNA-Oligonukleotid-Microarray*-Experiments spiegeln einige der Ergebnisse der RT-PCR zu humanen Zytokinen wider. Diese Resultate konnten damit validiert und erweitert werden.

Abb. 30 zeigt die Stärken der differentiellen Expression der interessanten Kandidaten.

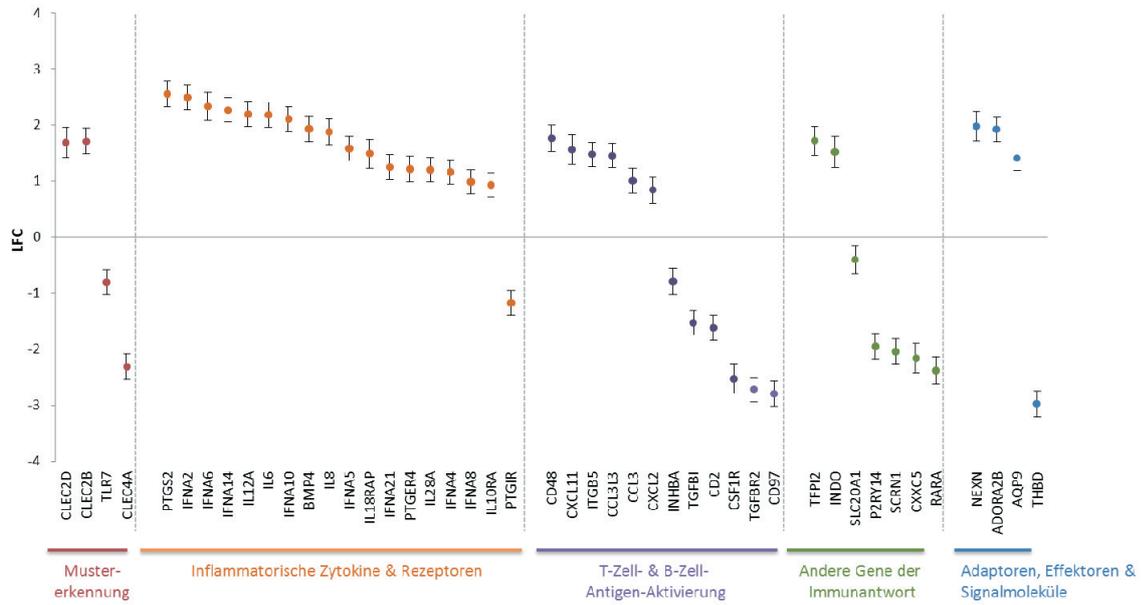


Abbildung 33: Differenziell exprimierte Gene zwischen der IFN- α -positiven und der IFN- α -negativen Subpopulation

Die Grafik zeigt die differentielle Expression als mittleren binären Logarithmus des Signalverhältnisses von IFN- α -positiven zu IFN- α -negativen Zellen (LFC). Die Fehlerbalken zeigen die 95%-Konfidenzintervalle. Die Grafik bildet zum einen die hochregulierten Gene der IFN- α -positiven Subpopulation im Vergleich zu der IFN- α -negativen Subpopulation im *DNA-Oligonukleotid-Microarray*-Experiment basierend auf den Schnittmengen der Ergebnisse der Gruppen A, B und C ab.

4. Diskussion

4.1 Optimierung der Ausbeute IFN- α produzierender pDCs durch Stimulation mit CpG-ODN 2216, Dotap und IL-3

Da Krug et al. demonstrieren konnten, dass die höchste Produktion von IFN- α durch pDCs unter Verwendung von CpG-ODN 2216 hervorgebracht werden konnte (Krug2001a), wurde in dieser Arbeit der TLR9-Ligand CpG-ODN 2216 nach vorheriger Titration verwendet. Dotap kann als Transfektionsreagenz die Übertragung von Oligonukleotiden, wie dem CpG, in Zellen erleichtern. Als monokationisches Lipid umlagert und transfiziert es die Nukleotide (Hansmann 2008). Weiterhin besitzt humanes IL-3 die Eigenschaft, dendritische Zellen zu stabilisieren und in ihrer Produktivität zu unterstützen (Björck 2001, Jaehn 2008). Dieser überlebensfördernde Effekt des IL-3 auf pDCs (Ito 2001) lässt sich auf ihre hohe Expression der α -Kette des IL-3-Rezeptor, dem CD123, zurückführen (Grouard 1997, Colonna 2004).

Aufgrund dieser Erkenntnisse wurde ein Gemisch, bestehend aus CpG-ODN 2216, Dotap und IL3 in geeigneten Konzentrationen angefertigt und zur optimierten Stimulation der pDCs verwendet. Durch die Zugabe von Dotap konnte die Menge an IFN- α -positiven pDCs hochreguliert werden, wodurch ausreichend Zellen für weiterführende Untersuchungen bereitgestellt wurden. Gleichzeitig konnte eine weitere Fehlerquelle bei der Festlegung der IFN- α -negativen Zellen ausgeschlossen werden. Durch die Optimierung der gleichmäßigen Aufnahme des Stimulans in die Zellen, konnte die Reinheit der IFN- α -negativen Gruppe erhöht werden. So wurden Zellen, die nur nicht ausreichend stimuliert wurden, nicht fälschlicherweise zu der IFN- α -negativen Zellmenge gerechnet. Dennoch muss beachtet werden, dass nicht alle Zellen, die in der Lage sind, ein Zytokin-Gen zu transkribieren, dieses auch nach Stimulation tatsächlich tun (Hu-Li 2001). Es besteht die Möglichkeit, dass die Zellen aufgrund einer unterschiedlichen Kinetik ungleiche Mengen herstellen. Durch die Zugabe von IL-3 wurde die Vitalität der pDCs unterstützt, so dass sie für den anschließenden Sortierungsvorgang sowie die Isolation ihrer RNA schonender erhalten bleiben konnten. Damit konnte die Ausbeute an RNA gesteigert werden und in weitere molekulargenetische Experimente einfließen.

Eine unspezifische IFN- α -Produktion durch unstimulierte Zellen konnte ausgeschlossen werden. Auch Dotap allein hatte keinen Effekt auf unstimulierte pDCs, eine IFN- α -Produktion vorzutäuschen.

Da pDCs sowohl mit TLR7 als auch TLR9 ausgestattet sind, ist eine Stimulation mit einem TLR7-Liganden, dem R848, und dem TLR9-Liganden, dem CpG-ODN 2216 prinzipiell möglich. Eine klare Überlegenheit des CpG-ODN 2216 gegenüber dem R848, hinsichtlich der maximalen Induktion von IFN- α , konnte belegt werden.

4.2 Validierung der Stimulation mit CpG-ODN 2216

Da in diesem Projekt die Unterscheidung von Subpopulationen innerhalb der pDCs anhand ihrer Fähigkeit IFN- α zu produzieren von besonderem Interesse war, sollte das Vorgehen die Zellen mit CpG-ODN 2216 zu stimulieren validiert werden.

Der zytoplasmatisch gelegene TLR9 hat sich auf die Erkennung von unmethylierten CpG-Sequenzen bakterieller und viraler DNA spezialisiert (Bauer 2001, Heil 2004, Mogensen 2005, Akira 2006). Bemerkenswerterweise wird humaner TLR9 vornehmlich von pDCs exprimiert, sie weisen mRNA für TLR9 auf (Kadowaki 2001, Hornung 2002, Kawai 2010). Somit lassen sich pDCs mit TLR9-Liganden, wie dem CpG-ODN 2216, stimulieren. Da Berghöfer et al. beschrieben haben, dass sich unter der Verwendung eines TLR7-Liganden eine unterschiedliche IFN- α -Produktion in Abhängigkeit vom Geschlecht einstellt, wurde die Verwendung eines TLR9-Liganden als vorteilhafter angesehen (Berghöfer 2006). Auch die Erkenntnis, dass insbesondere die TLR7-Funktion mit steigendem Alter der Individuen und damit auch die IFN- α -Produktion signifikant abnimmt (Panda 2010), führte zu der Entscheidung, sich auf TLR9 zu konzentrieren. Um zu demonstrieren, dass es sich sowohl bei den IFN- α produzierenden als auch den nicht-produzierenden Zellen um pDCs handelt und die Möglichkeit auszuschließen, dass die IFN- α -negativen Zellen gar keine TLR9 besitzen und daher nicht mit CpG-ODN 2216 stimulierbar sind, wurde eine Intrazellulärfärbung beide Zellfraktionen mit einem TLR9-Antikörper durchgeführt. Hier konnte gezeigt werden, dass beide Subpopulationen TLR9 exprimieren und somit gleiche Voraussetzungen für die Stimulation und den weiteren Versuchsdurchlauf mit Auftrennung der pDCs bieten.

Darüber hinaus sollte ausgeschlossen werden, dass die Konzentration des CpG-ODN 2216 zu gering ist, um alle Zellen gleichermaßen zu stimulieren und sich dadurch unterschiedliche Subpopulationen ergeben. Anhand der Stimulation mit unterschiedlich hohen CpG-ODN 2216-Konzentrationen konnte gezeigt werden, dass alle pDCs mit der in diesem Versuchsablauf verwendeten CpG-ODN 2216-Konzentration ausreichend stimuliert wurden. Mit Konzentrationen über 5 $\mu\text{g/ml}$ konnte keine nennenswerte

Verbesserung der pDC-Ausbeute erreicht werden. Das Signal für BDCA-4 wurde bei einer Konzentration von 10 µg/ml herunterreguliert. Dieses Phänomen wurde bereits von Dzionek et al. beschrieben (Dzionek 2000).

Somit konnten zwei wichtige Fehlerquellen bei der Beurteilung von Subpopulationen innerhalb der pDCs ausgeschlossen werden.

4.3 Homogenität der Zellpopulationen, Reinheit sowie Vitalität IFN- α -positiver und IFN- α -negativer Zellen

Für ein Hauptziel des Projekts, die Durchführung eines *DNA-Oligonukleotid-Microarray*-Experiments, war es von besonderem Interesse, die zu untersuchenden Zellpopulationen möglichst homogen darstellen und abgrenzen zu können. Nur so konnte es möglich sein, eine optimale Reinheit für signifikante Ergebnisse zu erhalten.

Zu diesem Zweck wurde demonstriert, dass eine Anfärbung mit BDCA-4-Antikörpern eine distinktere pDC-Population hervorbringt, gegenüber einer Anfärbung mit BDCA-2. Darüber hinaus konnten Dzionek et al. darstellen, dass BDCA-2 die IFN- α -Produktion von pDCs herunterreguliert (Dzionek 2001). Da BDCA-4 neben pDCs aber auch andere Zellen zu markieren vermag, wurde die Gruppe der pDCs daneben noch mit CD123 angefärbt (Schwab 2011, Adams 2012). Zum Ausschluss anderer Zellen wurde zusätzlich Lineage Cocktail 1 verwendet. Durch die vorgestellte Oberflächenmarkierung der IFN- α -Produktion der pDCs und die darauffolgende Anfärbung mit einem IFN- α -Antikörper, ermöglichte die Zuordnung der Zellen zu zwei Subpopulationen. Beide wiesen eine Reinheit von annähernd 100% auf.

Durch diese Vorgehensweise konnte eine unspezifische Färbung und Auswahl anderer Zellen ausgeschlossen werden. So konnte ein Nachweis erbracht werden, dass innerhalb der pDCs zwei Subpopulationen – eine Population, die nach Stimulation IFN- α produziert und eine Population, die nach gleicher Behandlung kein messbares IFN- α herstellt – existieren. Diese beiden Zellfraktionen können damit durch die vorbeschriebene Oberflächenmarkierung der IFN- α -Produktion und anschließende Anfärbung mit den ausgewählten Antikörpern markiert werden und im nachfolgenden Sortierungsvorgang separiert und für weitere Untersuchungen gewonnen werden.

Darüber hinaus konnte ein weiterer wichtiger Punkt der anfänglichen Fragestellung sicher beantwortet werden. Bei den pDCs, die nicht in der Lage sind IFN- α hervorzu-
bringen, handelt es sich nicht um tote Zellen. Anhand der Verwendung des Lebend-Tot-

Farbstoffs Sytox® Blue *Dead Cell Stain* konnten tote Zellen exkludiert werden und gingen nicht mit in weiterführende Untersuchungen ein.

Durch die hier beschriebenen Maßnahmen wurde auch eine optimale Reinheit der RNA nach Isolierung aus den Zellen erreicht und damit mögliche Fehlerquellen durch Verunreinigungen ausgeschlossen.

4.4 IFN- α -positive und IFN- α -negative Zellen weisen unterschiedliche Gene für humane Zytokine und Zelloberflächenmarker auf

Die molekulargenetische Untersuchung der IFN- α -positiven und IFN- α -negativen Zellen auf humane Zytokine sowie humane Zelloberflächenmarker liefert erste Hinweise auf mögliche weitere Syntheseprodukte der pDCs neben IFN- α sowie ihre Ausstattung an Oberflächenmarkern.

Es fällt auf, dass die Gruppe der IFN- α -positiven Zellen neben den bereits bekannten Produkten IFN- α , IFN- β und IFN- γ noch zusätzlich große Mengen an IL-12p35 produzieren. Sowohl die IFN- α -positiven als auch die IFN- α -negativen pDCs können IL12p40 hervorbringen. Daneben besitzen sie die Ausstattung weiterhin BMP4, PDGF- α , IL-6, IL-8, IL-21 sowie zwei Mitglieder aus der TNF-Superfamilie TNF- α und TNFSF11 herzustellen.

IL-12 wird hauptsächlich von phagozytotischen Zellen, B-Zellen und anderen APCs, hergestellt. Es hat einen bedeutenden Einfluss auf die Generierung von T_H1-Zellen und moduliert somit das adaptive Immunsystem. Die biologisch aktive Form ist das IL-12p70, bestehend aus den beiden biologisch inaktiven Untereinheiten mit 35 kDa (p35) sowie 40 kDa (p40). Dabei ist erstere der limitierende Faktor für die Bildung der aktiven Form. Die Induktion von p35 und p40 wird durch NF- κ B in Anwesenheit von IFN- γ , welches IRF-1 induziert, reguliert. Das p40-Monomer fungiert als Antagonist des IL12p70, da es an den IL-12 Rezeptor binden kann. Bei dem p35 handelt es sich um ein Mitglied der IL-6-Superfamilie. Seine Sekretion wird durch IFN- γ sowie TLR3-, TLR4- und TLR7-Agonisten gefördert und durch T_H2-Zytokine gehemmt. Der IL-12-Rezeptor wird vorwiegend auf NK-Zellen und aktivierten T-Zellen exprimiert (Jong 2005, Peng 2006).

IL-12 hat einen Einfluss auf die Entwicklung von naiven T-Zellen, die Co-Stimulation von CTL und Aktivierung von NK-Zellen, die dann ihrerseits Zytokine produzieren. Darüber hinaus induziert es in naiven CD4⁺-Zellen die Bereitstellung von IFN- γ in einer

positiven Feedback-Schleife sowie die Produktion von IL-10 und übernimmt damit eine wichtige Rolle bei inflammatorischen und autoimmunen Prozessen, indem die APC-Funktion unterdrückt wird (Wolf 1994, Germann 1995, Kadowaki 2000, Cella 2000). Durch die direkte Funktion in der Entwicklung von T_H1 -Immunreaktionen übernimmt es eine entscheidende Aufgabe in der Regulation von Immunprozessen und verfügt damit auch antitumoröse Effekte. Darüber hinaus ist es in der Lage, die Angiogenese, beispielsweise in kanzerogenen Neubildungen zu hemmen (Belardelli 2002a).

Die IFN- α -positiven Zellen bringen neben der Untereinheit p40 auch große Mengen p35 hervor. Daher könnten sie im Gegensatz zur Negativ-Fraktion in der Lage sein, die aktive Form IL12p70 auszuschütten. Ob diese Fähigkeit tatsächlich den pDCs obliegt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. So beschreiben Krug et al., dass pDCs neben IL-8 und IFN- α simultan das bioaktive IL12p70 in den ersten 12 Stunden nach Stimulation mit CpG-ODN produzieren. Damit sind sie befähigt T_H1 -Reaktionen anzustoßen. Die hervorgebrachte Menge an IFN- α und IL-12 korreliert dabei mit dem Differenzierungsgrad der pDCs. Da nur pDCs über TLR9 verfügen und mDCs nicht und somit nur die pDCs mit Hilfe von CpG-ODN stimuliert werden, stammt das IL-12 von den pDCs und nicht von den mDCs (Krug 2001b). Auch Cella et al. berichten über die Synthese von IL-12 durch pDCs (Cella 1999). Sowohl Krug et al. als auch Cella et al. postulieren weiterhin, dass pDCs somit eher antivirale und proinflammatorische Funktion haben, denn eine T_H2 -Polarisation und Toleranzfunktion (Krug 2001b, Cella 1999). Aufgrund der von uns aufgeführten Unterscheidung in zwei pDC-Subpopulationen könnte man auf dieser Basis der Überlegungen der IFN- α -positiven Subgruppe der pDCs eine antivirale und proinflammatorische Funktion zuschreiben und der IFN- α -negativen Subgruppe der pDCs die T_H2 -Funktion sowie Rolle im Hinblick auf Toleranz zusprechen.

Im Kontrast zu den Ergebnissen von Krug und Cella et al. vertreten Fitzgerald-Bocarsly et al. sowie Liu die These, dass pDCs neben IFN- α nur IL-6, IL-8 und TNF- α herstellen können, nicht aber IL-12. Sie geben an, dass eine etwaige IL-12-Synthese nur von mDCs sowie murinen pDCs geleistet werden kann (Liu 2005, Fitzgerald-Bocarsly 2008). Darüber hinaus beschreiben Fitzgerald-Bocarsly et al., dass pDCs neben den Typ I Interferonen auch Typ III Interferone, wie das IL-28A herstellen können, welches seine Signale über den IL-10-Rezeptor verbreitet (Fitzgerald-Bocarsly 2008). Auch Biron und Wong et al. beschreiben hohe Spiegel an IL12p70 in der Maus. Weiterhin

berichten sie über die Eigenschaft von IFN- α und IFN- β die IL-12-Produktion negativ zu regulieren (Biron 1999, Wong 2009).

Gene der Tumor Nekrose Faktor-Superfamilie (TNFSF) kodieren für Proteine, denen unterschiedliche Funktionen zugeschrieben werden. Zu diesen gehören zum einen die Fähigkeit Tumorzellen zu nekrotisieren, aber auch regulatorische Eigenschaften bei der Inflammation, der Apoptose sowie der Organogenese. Das TNFSF11 syn. RANKL übernimmt eine Funktion bei der Differenzierung von Osteoklasten und ihrer Aktivierung. Darüber hinaus spielt es eine Rolle im Immunsystem, wobei es von T-Helferzellen exprimiert wird und eine Rolle bei der Reifung von dendritischen Zellen einnimmt. Es gilt als wichtiger Faktor zur Förderung ihres Überlebens (Anderson 1997). Im Rahmen dieser Arbeit konnte TNFSF11 auf mRNA-Ebene von den IFN- α -positiven vorgewiesen werden.

Interessanterweise ist die Gruppe der Zellen, die negativ für IFN- α ist, in der Lage andere Zytokingene zu exprimieren. Sie schütten Inhibin- β_A , TNFSF13B syn. BAFF sowie TNFSF4 syn. OX40L aus.

Das TNFSF4 wird auf aktivierten APCs, wie den pDCs, sowie auf vaskulären Endothelzellen exprimiert. Es vermittelt die Adhäsion von aktivierten T-Zellen, T-Zell-Proliferation und Zytokinproduktion, indem es co-stimulatorische Signale für aktivierte CD4⁺-T-Zellen generiert. OX40L leistet darüber hinaus einen Beitrag bei der Entwicklung von TH2-Zellen. Damit hat es eine wichtige Aufgabe im Prozess der adaptiven Immunität. Sein Rezeptor, das TNFRSF4, syn. OX40 oder CD134, wird auf aktivierten CD4⁺-T-Zellen exprimiert. Das TNFSF4 scheint eine Rolle bei der Entstehung verschiedener Erkrankungen zu haben. So prädisponiert eine erhöhte Expression für die Entstehung eines Systemischen Lupus erythematoses (SLE). Darüber hinaus scheint TNFSF4 einen Schutz bei der Entstehung von Krebserkrankungen darzustellen (de Jong 2005, Zaini 2007, Cunningham Graham 2008).

Bei dem TNFSF13B syn. BAFF handelt es sich um einen B-Zell-Aktivierungsfaktor, welcher von Zellen der myeloiden Zellreihe in gelöster oder oberflächenassoziierter Form gebildet wird (Craxton 2003). Craxton et al. und Huard et al. konnten mRNA und Protein des Faktors bei Makrophagen und DCs nachweisen. BAFF gilt als bedeutender Faktor für die humorale Immunantwort, welche die B-Zell-Proliferation und B-Zell-Differenzierung in Plasmazellen voraussetzt. Er bindet an drei verschiedene TNF-

Rezeptoren und fördert direkt das Überleben und die Reifung von B-Zellen. Über seine Rolle der B-Zell-Aktivierung hinaus, scheint BAFF auch T-Zell-abhängige Immunantworten zu modulieren (Craxton 2003, Huard 2004). Jego et al. konnten demonstrieren, dass auch pDCs eine spezifische Rolle bei der Generierung von B-Zellen einnehmen. Durch IL-6, IL-12, IFN- α und IFN- β entwickelten sich B-Zellen zu Antikörpersezernierenden Plasmazellen, welche insbesondere IgG und IgM hervorbrachten und damit die Rolle von B-Gedächtniszellen einnahmen. Die Ausstattung von pDCs mit BAFF wurde in diesem Zusammenhang ebenfalls beschrieben (Jego 2003). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass in pDCs mRNA für BAFF detektierbar ist und pDCs damit die zuvor beschriebene Funktion der B-Zell-Aktivierung und B-Zell-Entwicklung übernehmen können.

Die Gruppe der IFN- α -positiven und die Gruppe der IFN- α -negativen pDCs verfügt gleichermaßen über mRNA für die Entstehung von Inhibin- α . Als Besonderheit konnte im Rahmen dieser Arbeit festgestellt werden, dass die IFN- α -negativen pDCs deutlich mehr mRNA für die Codierung des Proteins Inhibin- β_A haben. Das Inhibin- β_A stellt eine Untereinheit zum einen des Inhibin-A, welches sich aus Inhibin- α und Inhibin- β_A zusammensetzt sowie zum anderen des Activin-A, das ein Homodimer aus zwei Inhibin- β_A darstellt. Bei beiden handelt es sich um Mitglieder der TGF- β -Superfamilie. Somit lassen die auf mRNA-Ebene gefundenen Resultate vermuten, dass nur die IFN- α -negativen pDCs in der Lage sind aktives Activin-A und Inhibin-A zu generieren. Erstmals bekannt wurden sie durch ihre Moderatorfunktion bei der FSH-Sekretion aus der Hypophyse, wobei sie gegensätzliche Funktionen einnehmen. Activin-A gilt als lokaler Regulator von Zell-Differenzierung und Zell-Proliferation. Ihm werden folgende Funktionen zugeschrieben: Förderung der Erythropoese, Förderung der Follikelreifung, Stimulation der Embryogenese, Modulation von Hypophysen- und Pankreas-Hormonen sowie Knochenformation. Das Inhibin-A gilt als lokaler Wachstumsfaktor (Funaba 1996). Verschiedene Autoren haben darüber hinaus darstellen können, dass Activin-A ein Syntheseprodukt der DCs ist und ihm damit eine Funktion im Inflammationsprozess zugeschrieben werden kann (Scutera 2008, Robson 2008, Segerer 2008, Salogni 2009, Robson 2009). So beschreiben Scutera et al., dass Activin-A die Generierung von DCs fördert und ihre Fähigkeit Antigene aufzunehmen beeinflusst (Scutera 2008). Salogni et al. publizierten, dass Activin-A die Migration unreifer myeloider DCs kontrolliert und ihre Rekrutierung für proinflammatorische Prozesse beeinflusst. Es stimuliert die Zyto-

kin-Produktion von DCs. Somit hat es eine entscheidende Rolle in Wundheilungs- und Autoimmunprozessen, der immunogenen Toleranz während der Embryogenese und ist Schlüsselmediator bei der Inflammation (Salogni 2009). Auch Robson et al. verdeutlichen die Funktion von Activin-A als autokriner Regulator der DC-Sekretion von IL12p70 sowie anderen proinflammatorischen Zytokinen wie IL-6, IL-8 und TNF- α . Ihm werden weiterhin pro- und antiproliferative Effekte auf Tumorzellen, bei pankreatischer Fibrose, Rheumatoider Arthritis sowie Diabetes mellitus zugeschrieben. Activin-A zeichnet sich weiterhin als Schutzfaktor vor ischämischen Gehirnschäden aus. Durch die Wirkung auf NK-Zellen werden den DCs immunregulatorische Effekte zugeordnet. So kann die Apoptose von Tumorzellen und anderen Immunzellen nachgewiesen werden. Es hat fördernde Effekte auf die Erneuerung embryonaler Stammzellen und deren Pluripotenz. Als Antagonist zum Activin-A konnte Follistatin identifiziert werden. Interessanterweise wird es während Entzündungsreaktionen im Anschluss an die Activin-A-Sekretion freigesetzt (Robson 2009). Bereits zuvor haben Robson et al. festgehalten, dass Activin-A Einfluss auf die Regulation der T-Zell-Entwicklung nimmt. Es ist in der Lage, CD8⁺-T-Zellen hoch zu regulieren. Sie beschreiben erstmals, dass auch die pDCs in der Lage sind Activin-A hervorzubringen (Robson 2008). Segerer et al. untersuchten neben Activin-A auch Inhibin-A und stellten fest, dass beide die Differenzierung von DCs für die Toleranzfunktion während der Embryogenese einleiten (Segerer 2008).

4.5 Oberflächenfärbung mit ausgewählten Antikörpern

Interessant wäre es, Oberflächenmarker zu identifizieren, anhand derer man IFN- α -positive und IFN- α -negative Zellen, vielleicht auch schon im unstimulierten Zustand unterscheiden könnte. Daher wurden die beiden pDC-Gruppen auf Basis der Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung mit den entsprechenden Antikörpern angefärbt. Und dies einmal im unstimulierten als auch im stimulierten Zustand.

Leider wies das Ergebnis eine zu große Schwankungsbreite und damit keine signifikanten Unterschiede auf. Damit ergab sich die Schwierigkeit, die auf mRNA-Ebene zur Differenzierung identifizierten Oberflächenmarker auch auf Proteinebene nachzuweisen. Biron et al. sahen sich vor einer ähnlichen Problematik (Biron 1999). Somit bleibt es eine Herausforderung auf mRNA-Ebene gemachte Entdeckungen auch auf Proteinebene widerspiegeln zu können.

Nachdem Björck et al. in einer Publikation murine IFN- α -positive und IFN- α -negative pDCs anhand des Oberflächenmarkers CD9 unterschieden hatten und angaben, dass pDCs während ihres Reifungsprozesses ihre Fähigkeit zur CD9-Expression und damit auch IFN- α -Produktion verlieren (Björck 2011), sollte eine Untersuchung der beiden humanen pDC-Subpopulationen auf CD9 durchgeführt werden. Hierbei zeigte sich, dass beide Subpopulationen – IFN- α -positiv und IFN- α -negativ – CD9 exprimieren. Damit ist ihre Fähigkeit IFN- α zu produzieren oder kein IFN- α zu produzieren nicht auf ihren Differenzierungsgrad zurückzuführen – vorausgesetzt CD9 erlaubt tatsächlich eine Aussage zum Reifezustand, was damit eher eine Unterscheidung in zwei Subpopulationen impliziert.

Denkbar wäre darüber hinaus auch, dass die gefundenen Subpopulationen innerhalb der pDCs aufgrund einer unterschiedlichen Kinetik verschiedene Produktionskapazitäten für IFN- α und weitere Zytokine aufweisen. Ein weiterer Untersuchungsansatz könnte dabei die Regulation der Zytokinproduktion von pDCs sein.

4.6 Whole-Genome-DNA-Oligonukleotid-Microarray – differentielle Genexpression in den beiden Subpopulationen IFN- α -positiver und IFN- α -negativer Zellen

In dem durchgeführten *DNA-Oligonukleotid-Microarray*-Experiment konnten die Resultate der RT-PCR zur Untersuchung der Ausstattung der pDCs für Zytokine auf mRNA-Ebene widergespiegelt und damit validiert werden. Darüber hinaus ergaben sich weitere interessante Unterschiede hinsichtlich der Fähigkeiten verschiedene Zytokine zu synthetisieren in den beiden Gruppen IFN- α -positiver und IFN- α -negativer pDCs. Somit liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um Subpopulationen der pDCs handelt, die potentiell unterschiedliche Zytokine hervorbringen können und damit auch verschiedene immunologische Funktionen einnehmen können.

So zeigte die Gruppe der IFN- α -positiven pDCs auf mRNA-Ebene Gene für die Prostaglandin-Synthase/ Prostaglandin-Cyclooxygenase (PTGS2), die Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) sowie den IL-10-Rezeptor- α .

Bei der Indolamin-2,3-Dioxygenase (IDO) handelt es sich um ein Enzym, das Tryptophan zu N-Formylkynurenin katabolisiert. Chen et al. konnte zeigen, dass die Expression von IDO bei pDCs – sowohl auf mRNA- als auch auf Protein-Ebene – nach Kontakt zu TLR9-Liganden signifikant zunimmt. Es ist bekannt, dass pDCs naive

T-Zellen zu Foxp3⁺ regulatorischen T-Zellen generieren. Diese übernehmen immunsuppressive Funktionen und regulieren allogene und autologe Immunantworten herunter. Es scheint nahe liegend, dass das Enzym IDO bei dieser Generierung eine entscheidende Rolle spielt (Chen 2008). Xu et al. konnten darlegen, dass IDO eine immunsuppressive Funktion für T_H1-vermittelte Immunantworten hat und darüber hinaus auch eine Auswirkung auf die Zell-Differenzierung von T_H2-Zellen zu haben scheint. IDO kommt ubiquitär in verschiedenen Geweben vor, darüber hinaus noch in Tumorzellen, DCs, Makrophagen, Mikroglia, Eosinophilen, Fibroblasten und Endothelzellen. Seine Expression wird durch IFN- γ , IFN- α , IFN- β und IL-10 sowie CpG-ODN und bakterielle Antigene induziert. Die immunsuppressive Beschaffenheit wirkt protektiv gegen Tumorpersistenzen, chronische Infektion und wirkt präventiv gegen die Entstehung von autoimmunen Erkrankungen (Xu 2008). In der Plazenta übernimmt es während der Schwangerschaft die bedeutende Aufgabe, den Fötus vor Abstoßung durch das Immunsystem der Mutter zu schützen (Munn 2008). Mellor und Curti et al. konnten beschreiben, dass IDO die Zell-Proliferation und Zell-Differenzierung von aktivierten T-Zellen inhibiert. Es hat somit Einfluss auf die Immuntoleranz während Infektionen, Schwangerschaft, Transplantation, Autoimmunität und Neoplasien (Mellor 2005, Curti 2009). Hier konnte auch eine Expression von IDO auf mRNA-Ebene festgestellt werden und spezifisch der IFN- α -positiven Zellpopulation zugeordnet werden.

Der IL-10-Rezeptor- α ist eine Untereinheit des IL-10-Rezeptors. Dieser besteht aus der dominanten α -Kette für die Ligand-Bindung bzw. Signalübertragung und übernimmt damit die Hauptfunktion des Rezeptors sowie der β -Kette, welche nur eine akzessorische Rolle der der Signalübertragung einnimmt. Es besteht eine strukturelle Verwandtschaft zu den Rezeptoren von IFN- α und IFN- β (Moore 2001, Qi 2005). Der IL-10-Rezeptor- α vermittelt das immunsuppressive Signal von IL-10 und inhibiert die Synthese von proinflammatorischen T_H1-Zytokinen, wie TNF- α und IL-12, und hemmt damit die Aktivierung von T-Lymphozyten durch DCs. Darüber hinaus hemmt es die Aktivierung der Cyclooxygenase 2 (COX 2) (Riley 1999). IL-10 wird von T-Zellen, B-Zellen und Makrophagen sezerniert. Es ist antiinflammatorisch und übernimmt damit eine wichtige Rolle in der Immuntoleranz und Immunregulation. Ihm wird eine Rolle in autoimmunen Prozessen zugesprochen, da es die Proliferation und Differenzierung von B-Zellen zu Antikörper-sezernierenden Plasmazellen fördert (Qi 2005). Somit kann die Schlussfolgerung gezogen werden, dass die Gruppe der IFN- α -positiven pDCs große

Mengen proinflammatorischer Zytokine sezerniert. Auf der anderen Seite wird aber auch in gewisser Weise die Wirkung von IL-10 moduliert. Dieser Gruppe könnte daher eine Funktion in Immuntoleranz zugetragen werden.

Die Prostaglandin-Synthase (PTGS2)/ Prostaglandin-Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist das Schlüssel-Enzym des Prostaglandin-Stoffwechsels. Die COX-2 wird im Rahmen von Entzündungsreaktionen durch Zytokine, wie TNF- α oder IL-1 und Mitogene induziert. Glucocorticoide und antiinflammatorische Zytokine hingegen reprimieren die Expression. Die COX-2 kommt in Makrophagen, Endothelzellen und Tumorzellen vor. Sie wird im Rahmen von Entzündungsprozessen vermehrt gebildet. Da die IFN- α -positiven pDCs Gene für die Entstehung der COX aufweisen, könnte ihre proinflammatorische Hauptfunktion untermauert werden.

Die Gruppe der IFN- α -negativen pDCs war vermehrt mit Genen für den Vitamin-A-Rezeptor- α (RAR-A), den TGF- β -Rezeptor 2 sowie den Prostacyclin-Rezeptor/ Prostaglandin (PGI₂) ausgestattet.

Interessanterweise sind die IFN- α -negativen Zellen mit Genen für den Prostacyclin-Rezeptor und das Prostacyclin, syn. PGI₂, selbst ausgestattet. Das PGI₂ und das PGE₂ sind die Haupt-Entzündungsmediatoren im Entzündungsprozess. Sie wirken als Immunmodulatoren von B-Zellen, T-Zellen und NK-Zellen, indem sie auch die Zytokine TNF- α , IFN- γ und bioaktives IL-12 hemmen. Fabricius et al. konnten, v.a. das PGE₂, in humanen pDCs nachweisen (Fabricius 2010). Das PGI₂ unterstützt dabei alle bekannten Entzündungsreaktionen Schmerz, Erwärmung und Rötung durch Vasodilatation und die Gewebsschwellung durch die erhöhte Gefäßpermeabilität. Beim Prostacyclin-Rezeptor handelt es sich um einen G-Protein gekoppelten Rezeptor, der nach Bindung von Prostacyclin das Signal transduziert (Smith 2000).

Der Vitamin-A-Rezeptor- α (RAR- α) ist ein intranukleärer Liganden-aktivierter Rezeptor, der die Transkription von Proteinen steuert. Bei dem RAR werden drei Isoformen α , β und γ unterschieden. Aktiviert werden diese zum einen durch die All-trans-Retinsäure und zum anderen durch die 9-cis-Retinsäure. Retinoide haben eine Bedeutung bei der Entwicklung, Zell-Differenzierung und Homöostase (Chambon 1996). Tao et al. gingen der Fragestellung nach, wie die All-trans-Retinsäure die Immunfunktionen beeinflusst. Sie fanden heraus, dass mit All-trans-Retinsäure behandelte DCs eine reduzierte Kapazität zeigten, alloreaktive T-Zellen zu aktivieren. Darüber hinaus konnte bei von DCs aktivierten T_H2-Zellen eine reduzierte Sekretion von IL-12 und IFN- γ sowie eine Zu-

nahme der IL-10- und IL-4-Produktion beobachtet werden. Die mRNA für die All-trans-Retinsäure wurde in DCs nachgewiesen. Zielstrukturen für All-trans-Retinsäure sind neben B- und T-Zellen auch die DCs. Sie ist in der Lage die Reifung und Differenzierung von DCs zu hemmen. Somit kommt es nicht zu einer Aktivierung von naiven T-Zellen durch reife DCs. Eine Antigenprozessierung bleibt ebenfalls aus. Stattdessen führen die unreifen DCs zu einer Suppression von T-Zell-Aktivitäten und bewirken damit periphere Toleranz. Tao et al. konnten weiterhin aufführen, dass der RAR- α die Effekte der All-trans-Retinsäure auf die DCs reguliert (Tao 2006). Hall et al. interessierten sich ebenfalls für die durch All-trans-Retinsäure bewirkte Immun-Homöostase und fanden heraus, dass es zu einer Induktion von regulatorischen T-Zellen kommt. Die All-trans-Retinsäure vermag es in Synergie mit TGF- β Foxp3⁺ CD4⁺ T-Zellen zu induzieren. Im Unterschied dazu hemmt sie jedoch die Produktion von T_H17-Zellen, die durch IL-6 und TGF- β induziert werden. Es konnte verdeutlicht werden, dass der RAR- α kritischer Regulator dieser Effekte ist. Er vermittelt die Regulation CD4⁺ T-Zellen sowie dendritischer Zellen (Hall 2011a). In einer weiteren Publikation verifizierten Hall et al. die These, dass All-trans-Retinsäure die T-Zell-Regulation und damit immunogene Toleranz und adaptive Immunantwort über den RAR- α beeinflusst (Hall 2011b).

Bei dem TGF- β -Rezeptor 2 handelt es sich um einen an die Zelloberfläche gebundenen Transmembranrezeptor mit einer Serin/Threonin-Kinase Typ I oder Typ II. Es werden sieben Typ I- und fünf Typ II-Rezeptoren unterschieden (Santibanez 2011). Die TGF- β -Rezeptoren finden sich in verschiedenen Geweben und können mehrere unterschiedliche Liganden binden. Eine Überexpression des Rezeptors wird mit verschiedenen Erkrankungen u.a. Fibrosierung von Geweben wie der Niere in Verbindung gebracht. In diesem Zusammenhang werden TGF- β -Antagonisten als Therapeutika entwickelt (Zloza 2011). Eine Supprimierung der Rezeptorfunktion wird bei der Entstehung von Krebserkrankungen und kongenitalen Erkrankungen diskutiert. Er übernimmt die Aufgabe von Zellmigration, Zellinvasion, Zellwachstum und Angiogenese (Gatza 2010). Beim TGF- β werden drei Isoformen TGF- β ₁, TGF- β ₂ und TGF- β ₃ als Mitglieder der TGF- β -Superfamilie unterschieden. Sie beeinflussen die Proliferation von T-Zellen, B-Zellen und NK-Zellen, Zell-Differenzierung, Apoptose, Adhäsion, Migration, Zytokinproduktion und embryonale Entwicklung. TGF- β ist in der Lage T_H1-Antworten zu inhibieren und wirkt damit antiinflammatorisch. Es blockiert die Aktivierung von Lymphozyten und Makrophagen (Filippi 2008, Santibanez 2011). TGF- β wird von diversen Zellen, u.a. auch Makrophagen sezerniert. Neben der antiproliferativen Wirkung und

der Regulation des Zell-Zyklus hat es auch eine wichtige Funktion bei der Immunregulation durch Foxp3⁺ regulatorische T-Zellen und Einfluss auf die Differenzierung von Foxp3⁺ T-Zellen und T_H17-Zellen. Die Bindung von TGF- β kann scheinbar einen supprimierenden Effekt auf die T_H1-Zytokinproduktion der IFN- α -negativen Zellen ausüben (Schmidt-Weber 2004).

Betrachtet man die hier hervorgehobenen Genanalysen beider Zellpopulationen so fällt auf, dass die Gruppe der IFN- α -positiven pDCs bestimmte Gene vorweist. Diese lassen erahnen, dass bei diesen Zellen neben ihrer Hauptfunktion, der Bereitstellung von proinflammatorischen T_H1-Zytokinen auch die Immunsuppression, im Sinne der Protektion gegen z.B. kanzerogene und autoimmune Erkrankungen, eine Rolle einnimmt. Hingegen scheinen die bei der Gruppe der IFN- α -negativen Zellen gefundenen Gene, v.a. für die Immunregulation über Foxp3⁺, CD4⁺-T-Zellen vorrangig zu sein. Sie könnten eine Subpopulation darstellen, welche die Hauptfunktion der Immuntoleranz vertritt.

4.7 Methodendiskussion

Da die IFN- α Produktion mit steigendem Lebensalter abnimmt und die TLR9-Funktion reduziert wird (Panda 2010), wurde darauf geachtet, Restblutmaterial junger, gesunder Spender, unabhängig vom Geschlecht, zu erhalten.

Die Unterscheidung der pDCs in Subpopulationen, die IFN- α produzieren oder nicht, ist in erster Linie von einem optimalen und reibungslosen Verlauf der Oberflächenmarkierung der IFN- α -Produktion abhängig. Nur wenn dieser Versuchsteil erfolgreich funktioniert, ist bei der späteren Aufreinigung der Zellen eine optimale Reinheit beider Zellfraktionen gewährleistet. Erst dann ist es möglich, aus den gewonnenen Zellen RNA zu isolieren, um eine saubere und signifikante molekulargenetische Analyse auf Gene, die für eine unterschiedliche Zytokin-Produktion codieren, durchzuführen. Daher war die Optimierung dieses Versuchsschrittes von zentraler Bedeutung.

Eine Hauptfehlerquelle stellt das Auffangen sezernierter Zytokine durch nicht-sezernierende Zellen dar. Um diese unspezifische Bindung zu verhindern, muss eine Zelldichte während der Sekretionsphase $\leq 5 \times 10^6$ Zellen eingehalten werden. Die Kenntnis über den Anteil der interessierenden Zellen ist für die Festlegung des verwendeten Volumens entscheidend. Nur dann ist gewährleistet, dass sezernierende und nicht-sezernierende Zellen einen ausreichenden Abstand zueinander aufweisen. Darüber hinaus muss während der Sekretionsphase eine ausreichende Rotation eingehalten

werden, um die Sedimentation der Zellen zu verhindern. Um eine Zytokinproduktion der Zellen in Schritten des Versuchsablaufs zu verhindern, in denen die Zellen in zu hoher Dichte vorliegen – wie etwa während Waschschritten und Inkubationsphasen – müssen die Zellen aus Eis gehalten werden (Assenmacher 2001).

Im vorliegenden Projekt wurde diese kritische Phase durch Variationen in einzelnen Abläufen optimiert. Aus der Literatur war die zu erwartende Konzentration an sezernierenden pDCs bekannt (Cella 1999). Unter Verwendung verschiedener Verdünnungsstufen 5×10^6 Zellen/ml bzw. 1×10^6 Zellen/ml wurde festgestellt, dass mittels ersterer Verdünnung die geeignetere Dichte an Zellen für ein optimales Ergebnis erzielt werden konnte. Auch die Inkubationszeit nach Zugabe des Antikörpers zur Markierung der sezernierenden Zellen wurde variiert (20 Min, 40 Min und 60 Min). Es zeigte sich eine Abnahme der gezählten Events nach 60 Minuten. Aufgrund des Wissens, dass die Produktion von IFN- α schnell und kurz verläuft und nach einem Peak wieder abnimmt, führte zu der Entscheidung eine Inkubationszeit von 20 Minuten einzuhalten, in der nahezu alles Zytokin einer Zelle abgefangen werden kann und keine unspezifischen Bindungen eingegangen werden (Assenmacher 2001). Die Menge des Antikörpers zur Markierung der sezernierenden Zellen sollte gewährleisten, dass alle Zellen gleichwertig mit dem Antikörper-Komplex markiert werden. Daher wurden auch hierzu Versuche mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt.

Um eine etwaige unspezifische IFN- α -Produktion durch T-Zellen ausschließen zu können, wurden zur Kontrolle 1×10^6 Zellen nach der Stimulation von einigen Proben in Vorversuchen abgenommen und nur dem Färbeschritt unterzogen. In der Durchflusszytometrie konnte dann gezeigt werden, dass keine unspezifische Produktion von IFN- α stattgefunden hatte. Auch die abschließende Anfärbung mit CD123 und Lineage Cocktail 1 stellte sich als geeignet heraus, um eine unspezifische Bindung und IFN- α Produktion durch andere Zellen auszuschließen. Bei Variation der Inkubationszeit der Antikörper von 10 Minuten auf 30 Minuten, zeigte sich nur eine sehr geringe Zunahme detektierbarer Zell-Events.

Bei dem anschließenden Schritt zur Aufreinigung der Zellen wurde auf Kühlung bzw. Lagerung der Zellen im Dunkeln geachtet. Es wurde versucht, die Sortierzeit so kurz wie möglich zu halten, um eine etwaige Schädigung der RNA maximal zu reduzieren. Es stellte sich heraus, dass diese Fehlerquelle aufgrund der hohen Zellzahlen und daraus resultierende Dauer des Sortierungsvorgangs nur wenig Verbesserungspotential hatte.

Die RNA-Isolation wurde durchgeführt, die Zellen bei $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und für die Analyse auf gleiche Zellzahlen eingestellt und weiter verwendet. Die Dauer des eingefrorenen Zustandes der Zellen stellt eine weitere Fehlerquelle dar.

4.8 Ausblick

Auf molekulargenetischer Ebene konnte der Hinweis auf zwei Subpopulationen innerhalb der Gruppe der pDCs mit einer Ausstattung an verschiedenen Genen, die für bestimmte Zytokine und Oberflächenmoleküle codieren, erbracht werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte nicht abschließend geklärt werden, ob es auch auf membranärer Ebene unterschiedliche Oberflächenmoleküle gibt, die ebenfalls eine Diskriminierung in Subpopulationen erlauben. Von Interesse könnte es auch sein, Moleküle zu finden, anhand derer schon unstimulierte pDCs diskriminiert werden können. Diese Resultate müssen nun auf Protein-Ebene verifiziert werden. In diesem Zusammenhang wäre es auch denkbar, andere Stimulationsbedingungen für die Zellen auszutesten. Es wäre möglich, dass die gefundenen Subpopulationen innerhalb der pDCs aufgrund einer unterschiedlichen Kinetik und verschiedener Regulationsmechanismen, unterschiedliche Mengen an IFN- α hervorbringen.

Als Ausblick wäre es anzustreben, die gefundenen unterschiedlich exprimierten Membranmoleküle weiter zu untersuchen. Auch die von beiden Zellfraktionen unterschiedlich synthetisierten Zytokine könnten noch weiter untersucht und hinsichtlich ihrer Rolle im Immunprozess erforscht werden. Noch nicht hinreichend geklärte Immunfunktionen, die den pDCs zugeschrieben werden, könnten dann auf ihre Fähigkeit unterschiedliche Zytokine zu produzieren zurückgeführt werden. Konträre Funktionen könnten somit den Zellpopulationen anhand ihrer Kapazität IFN- α zu produzieren, zugeschrieben werden. Von besonderem Interesse bleibt nach wie vor die Funktion der IFN- α -negativen Zellen. So könnten sie eine entscheidende Rolle in der Immunregulation und bei der Aufrechterhaltung von Toleranz haben, während die IFN- α -positiven Zellen mittels ihrer Produktion von IFN- α die antivirale Abwehr übernehmen.

Björck et al. postulieren in ihrer Publikation zu IFN- α produzierenden Zellen, dass pDCs ihre Fähigkeit IFN- α zu produzieren mit ihrem Reifungsprozess verlieren (Björck 2011). Es wäre interessant der Fragestellung nachzugehen, ob aus myeloiden Stammzellen von Beginn an zwei unterschiedliche Zellpopulationen an pDCs hervorgehen oder ob sich diese eine Population im Verlauf ihres Reifungsprozesses verändert.

Zusammenfassung

Humane plasmacytoide dendritische Zellen (pDCs) übernehmen verschiedene Funktionen im Immunsystem, wie die Abwehr von Viren und die Aufrechterhaltung von peripherer und zentraler Toleranz. Sie sind in der Lage, das adaptive und erworbene Immunsystem zu verbinden. Die pDCs zeichnen sich durch ihr Haupt-Produkt – das IFN- α aus. Dadurch erlangen sie die Möglichkeit, T_H1-Immunantworten zu bewirken. Da ihre teilweise konträren Aufgaben im Immunsystem hierdurch alleine nicht erklärt werden können, stellt sich die Frage, ob die pDCs noch weitere Zytokine produzieren können und ob sie anhand dieser Fähigkeit in Subpopulationen unterteilt werden könnten.

Um dieser Fragestellung nachzugehen, wurden PBMCs aus Rest-Buffy Coats von gesunden jungen Spendern isoliert, mit einem Gemisch aus CpG-ODN 2216 (5 μ g/ml), IL-3 (20 ng/ml) und Dotap (1 μ g/ μ l) stimuliert und anschließend für fünf Stunden unter geeigneten Bedingungen inkubiert. Im weiteren Verlauf wurden die pDCs mit einem Oberflächenmarker für IFN- α markiert und mit verschiedenen Antikörpern angefärbt, um die Population einzugrenzen. Hierfür wurden neben IFN- α , Lineage Cocktail 1, BDCA-4 und CD123 verwendet, wodurch sie im Anschluss in eine Subfraktion IFN- α -positiver pDCs und IFN- α -negativer pDCs separiert werden konnten. In Vorbereitung auf die Durchführung einer RT-PCR und eines *DNA-Oligonukleotid-Microarray*-Experiments wurde die RNA aus den Zellen isoliert und in cDNA umgeschrieben.

Sowohl in der RT-PCR als auch im *DNA-Oligonukleotid-Microarray*-Experiment zeigten sich unterschiedliche Genexpressionen in beiden Subfraktionen. Die Gruppe der IFN- α -positiven Zellen zeichnete sich u.a. durch Gene für IFN- α , IL12p35, TNSF11, COX-2, Indolamin-2,3-dioxygenase und den IL-10-Rezeptor- α aus. Die Gruppe der IFN- α -negativen Zellen konnte hingegen Gene für u.a. TNSF13B, Inhibin- β_A , TNSF4, Vitamin-A-Rezeptor- α , PGI₂ und den TGF- β -Rezeptor2 vorweisen. Es bleibt ein weiteres Ziel diese Ergebnisse auch auf Protein-Ebene zu verifizieren.

Innerhalb dieses Projektes war es möglich, die Gruppe der pDCs in zwei Untergruppen zu separieren – eine positiv für IFN- α und eine negativ für IFN- α . Es zeigte sich eine unterschiedliche Expression von funktionell wichtigen Molekülen innerhalb der beiden Gruppen.

Summary

OBJECTIVES – Human plasmacytoid dendritic cells (pDCs) serve various functions in the immune system such as defense against viral infection and tolerance maintenance. They are enabled to initiate T_H1 responses via production of enormous amounts of their main cytokine IFN- α . Little is known about their ability to produce further cytokines which could explain their contrary functions in the immune system. This project attempts to identify pDC-Subsets based on the analysis of their gene expression.

RESEARCH DESIGN AND METHODS – Remnants of buffy coats from young and healthy donors were processed in order to gain PBMCs. For stimulation a mixture of CpG-ODN 2216 (5 μ g/ml), IL-3 (20 ng/ml) and Dotap (1 μ g/ μ l) was added and cells were incubated for five hours under appropriate conditions. Subsequently, pDCs were labelled with an IFN- α Catch Reagent Antibody. After passing through an IFN- α Catch Assay, cells were tagged with antibodies (BDCA-4, CD123, IFN- α , Lineage Cocktail 1) specific to localize pDCs. Ongoing, pDCs were separated in two different cell populations – one positive for production of IFN- α and one negative for synthesis of IFN- α . For further investigation in terms of RT-PCR and DNA-Microarray, RNA were isolated from cells and converted into cDNA.

RESULTS – On the basis of sorting the pDCs it was possible to separate the cells in two distinct subsets – positive and negative for IFN- α . By means of these subsets, it was possible to gain information about their genetic equipping for preparation of cell surface markers and cytokines on basis of mRNA and DNA passing through RT-PCR and DNA-Microarray. It could be verified that the group of IFN- α -positive cells expressed genes for e.g. IFN- α , IL12p35, TNSF11, COX-2, Indoleamine-2,3-dioxygenase as well as IL-10-Receptor- α . The group of IFN- α -negative cells was highlighted by genes for e.g. TNSF13B, Inhibin- β_A , TNSF4, Retinoic-Acid-Receptor- α , TGF- β -Receptor2 and PGI₂.

CONCLUSION – The outcome of this project allows dividing pDCs in two different subsets – positive or negative for IFN- α . Analysis of both groups revealed the expression of functionally important molecules in each separate subset.

Abkürzungsverzeichnis

APC	Allophycocyanin
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APC-H7	Allophycocyanin konjugiert mit H7, einem Cyanin-Analogen, namens High 7
BAFF	B-cell activating factor
BDCA	Blood dendritic cell antigen
β-ME	β-Mercaptoethanol
BMP	Bone Morphogenic Protein
BSA	Bovine serum albumin
CD	Cluster of differentiation
cDNA	Complementary DNA
CLR	C-Typ Lecitin-Rezeptoren
COX	Cyclooxygenase
CpG	Nicht-methyliertes Cytosin-Guanin Dinukleotid
CTL	Cytotoxische T-Zellen
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dsRNA	Doppelsträngige (double-stranded) RNA
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
Foxp3	Forkhead box P3
FITC	Fluorescein-5-isothiocyanat
FACS	Fluorescence activated cell sorting
FSH	Follikel-stimulierendes Hormon
HBSS	Hank's Buffered Salt Solution
HCV	Hepatitis-C-Virus
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)-ethansulfonsäure
HIV	Humane Immundefizienz-Virus

Abkürzungsverzeichnis

IDO	Indolamin-2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IMO	Immune stimulatory Motifs
LFC	Log ₂ fold-change
MHC	Major Histocompatibility Complex
mRNA	Messenger RNA
NK	Natural Killer Cell
NF- κ B	Nukleärer Faktor κ B
PALS	Periarterielle lymphatische Scheide
PAMP	Pathogen-associated molecular patterns
PBS	Phosphate-buffered saline
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell
PCR	Polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pDCs	Plasmacytoide dendritische Zellen
PDGF	Platelet-derived growth factor
PE	Phycoerythrin
PE-Cy7	Phycoerythrin konjugiert mit Cyanin-Farbstoff Cy7
PG	Prostaglandin
PRR	Pattern-recognition receptor
PTGS2	Prostaglandin-Synthase/ Prostaglandin-Cyclooxygenase
RA	Rheumatoide Arthritis
RAR-A	Vitamin-A-Rezeptor-alpha
RLT	RNeasy Lyse-Puffer
RNA	Ribonukleinsäure

Abkürzungsverzeichnis

RT-PCR	Real-Time-PCR
SLE	Systemischer Lupus erythematodes
ssRNA	Einzelsträngige (single-stranded) RNA
TIR	Toll-IL-1 R-Domäne
TGF	Transforming growth factor
T _H -Zellen	T-Helferzellen
TLR	Toll-like receptor
T _{mem}	T-Gedächtniszelle
TNF	Tumor necrosis factor
TNSF	Tumor necrosis (ligand) superfamily
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
Treg	Regulatorische T-Zelle
UKGM	Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH
UpM	Umdrehungen pro Minute
VEGF	Vascular endothelial growth factor

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: DCs verbinden angeborenes und adaptives Immunsystem.....	4
Abbildung 2: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer plasmacytoiden dendritischen Zelle	5
Abbildung 3: Rolle der pDCs im Immunsystem.....	7
Abbildung 4: Signalkaskade der IFN- α Produktion durch pDCs.....	12
Abbildung 5: Unterschiedliche Spiegel an IFN- α – Einfluss auf das Immunsystem.....	16
Abbildung 6: Übersicht zur Fragestellung	20
Abbildung 7: Markierung IFN- α produzierender Zellen	29
Abbildung 8: Schematische Darstellung des Sorters – Prinzip der Durchflusszytometrie.	33
Abbildung 9: Schematische Darstellung des Prinzips der RT-PCR	37
Abbildung 11: Verteilung der pDCs nach Stimulation mit/ ohne Dotap	46
Abbildung 12: Validierung der pDC-Umverteilung nach Stimulation mit/ ohne Dotap	47
Abbildung 13: Dotap-Effekt auf unstimulierte Zellen	47
Abbildung 14: Stimulation mit CpG-ODN 2216 vs. R848 mit/ ohne Dotap.....	48
Abbildung 15: Titration von CpG-ODN 2216 in der Konzentration 1 μ g/ml, 5 μ g/ml und 10 μ g/ml	49
Abbildung 16: Validierung der Titration von CpG-ODN 2216 in der Konzentration 1 μ g/ml, 5 μ g/ml und 10 μ g/ml	49
Abbildung 17: Homogene Expression von TLR9 in pDCs.....	50
Abbildung 18: Validierung der Expression von TLR9	51
Abbildung 19: Homogenität der pDC-Population nach Anfärbung mit BDCA-2 vs. BDCA-4	51
Abbildung 20: Darstellung der Zellpopulationen während des durchflusszyto- metrischen Sortierungsvorgangs – pDCs sind BDCA-4-positiv, CD123-positiv, Lineage-Cocktail 1-negativ	53
Abbildung 21: Mengenmäßige Verteilung der pDC-Subpopulationen.....	54
Abbildung 22: Repräsentative Darstellung der post-Sort-Kontrolle zur Errechnung der Reinheit der IFN- α -positiven Zellpopulation.....	54
Abbildung 23: Repräsentative Darstellung der post-Sort-Kontrolle zur Errechnung der Reinheit der IFN- α -negativen Zellpopulation.....	55
Abbildung 24: Vitalität der pDCs	56

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 25: Validierung der Vitalität aller pDCs	56
Abbildung 26: Humane Zytokine – Übersicht der quantitativen Beurteilung der differenziellen Genexpressionen.....	58
Abbildung 27: Humane Zelloberflächenmarker – Übersicht der quantitativen Beurteilung der differentiellen Genexpressionen.....	60
Abbildung 28: CD9-Expression bei allen pDCs	61
Abbildung 29: Validierung der CD9-Expression aller pDCs.....	62
Abbildung 30: Korellationen der M-Werte der vier Arrays.....	63
Abbildung 31: Ergebnisse der Analysen A, B und C der Microarraydaten.....	64
Abbildung 32: Korrelation der Ergebnisse der Analysen A und C der Microarray- daten	65
Abbildung 33: Differentiell exprimierte Gene zwischen der IFN- α -positiven und der IFN- α -negativen Subpopulation.....	68

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Toll-like Rezeptoren der TLR9-Subfamilie.....	10
Tabelle 2: Zytokinproduktion der pDCs und deren Wirkung.	13
Tabelle 3: Von aktivierten pDCs produzierte Chemokine und exprimierte Chemokinrezeptoren.	15
Tabelle 4: Versuchs-Layout zur Oberflächenfärbung – Untersuchung auf „Humane Zelloberflächenmarker“	42
Tabelle 5: Zellzahlen und RNA-Mengen der Zellfraktionen.....	57
Tabelle 6: Interessierende Kandidaten mit differentieller Expression in der IFN- α -positiven Subpopulation.....	65
Tabelle 7: Interessierende Kandidaten mit differentieller Expression in der IFN- α -negativen Subpopulation.....	67
Tabelle 8: RT-PCR – Humane Zytokine. Höhere Genexpression in der IFN- α -positiven Gruppe im Vergleich zur IFN- α -negativen Gruppe	xxv
Tabelle 9: RT-PCR – Humane Zytokine. Niedrigere Genexpression in der IFN- α -positiven Gruppe im Vergleich zur IFN- α -negativen Gruppe	xxvi
Tabelle 10: RT-PCR – Cell Surface Markers. Höhere Genexpression in der IFN- α -positiven Gruppe im Vergleich zur IFN- α -negativen Gruppe	xxvii
Tabelle 11: RT-PCR – Cell Surface Markers. Niedrigere Genexpression in der IFN- α -positiven Gruppe im Vergleich zur IFN- α -negativen Gruppe	xxviii
Tabelle 12: Hochregulierte Gene der IFN- α -positiven Subpopulation im DNA-Oligonukleotid-Microarray.	xxviii
Tabelle 13: Herunterregulierte Gene der IFN- α -negativen Subpopulation im DNA-Oligonukleotid-Microarray.	xxxix

Literaturverzeichnis

Adams WC, Loré K, (2012) In vitro Stimulation and detection of IFN α production in human plasmacytoid dendritic cells. *Methods in Molecular Biology*, 820, S. 215-230

Allen SJ, Crown SE, Handel TM, (2007) Chemokine: Receptor Structure, Interactions, and Antagonism. *Annual Review of Immunology*, 25, S. 787-820

Applied Biosystems (2010) StepOne™ and StepOnePlus™ Real-Time-PCR Systems Reagent Guide

Agrawal S, Kandimalla ER, (2007) Synthetic agonists of Toll-like receptors 7, 8 and 9. *Biochemical Society Transactions*, 35, S. 1461-1467

Akira S, Takeda K, Kaisho T, (2001) Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nature Immunology*, 2(8), S. 675-680

Akira S, Takeda K, (2004) Toll-like receptor signalling. *Nature Reviews. Immunology*, 4(7), S. 499 - 511

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O, (2006) Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, 124, S. 783-801

Anderson DM, Maraskovsky E, Billingsley WL, (1997) A homologue of the TNF receptor and its ligand enhance T-cell growth and dendritic-cell function. *Nature*, 390(6656), S. 175-179

Ardavin C, Amigorena S, Reis e Sousa C, (2004) Dendritic cells: Immunobiology and Cancer Immunotherapy. *Immunity*, 20, S. 17-23

Assenmacher M, Löhning M, Radbruch A, (2002) Detection and Isolation of Cytokine Secreting Cells using the Cytometric Cytokine Secretion Assay. *Current Protocols in Immunology*, Chapter 6: Unit 6.27

Banchereau J, Steiman RM, (1998) Dendritic cells and the control of immunity. *Nature*, 392, S. 245-252

Banchereau J, Briere F, Caux C, (2000) Immunobiology of dendritic cells. *Annual Review of Immunology*, 18, S. 767-811

Barchet W, Cella M, Colonna M, (2005) Plasmacytoid dendritic cells: virus experts of innate immunity. *Seminars in Immunol*, 17(4), S. 253-261

- Bauer S, Kirschning CJ, Häcker H, (2001)** Human TLR9 confers responsiveness to bacterial DNA via species-specific CpG motif recognition. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(16):9237-9242
- Belardelli F, Ferrantini M, (2002a)** Cytokines as a link between innate and adaptive antitumor immunity. *TRENDS in immunology*, 23(4), S. 201-208
- Belardelli F, Ferrantini M, Proietti E, (2002b)** Interferon- α in tumor immunity and immunotherapy. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 13, S. 119-134
- Benjamini Y, Hochberg Y, (1995)** Controlling the false discovery rate: a practical and powerful approach to multiple testing. *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 57, S. 289–300.
- Berghöfer B, Frommer T, Haley G, (2006)** TLR 7 Ligands induce higher IFN- α Production in females. *The Journal of Immunology*, 177, S. 2088-2096
- Biron CA, (1999)** Initial and innate response to viral infections – pattern setting in immunity or disease. *Current Opinion in Microbiology*, 2, S. 374-381
- Blanco P, Palucka AK, Pascual V, (2007)** Dendritic cells and cytokines in human inflammatory and autoimmune diseases. *Cytokine & Growth Factor Reviews*, 19, S. 41-52
- Björck P, (2001)** Isolation and characterization of plasmacytoid dendritic cells from Flt3 ligand and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor-treated mice. *Blood*, 98, S. 3520-3526
- Björck P, Leong X, Engelmann E, (2011)** Plasmacytoid Dendritic Cell Dichotomy: Identification of IFN- α Producing Cells as a Phenotypically and Functionally Distinct Subset. *The Journal of Immunology*, 186: 1477-1485
- Boor, PPC, Metselaar HJ, de Jonge S, (2011)** Human plasmacytoid dendritic cells induce CD8⁺ LAG-3⁺ Foxp3⁺ CTLA-4⁺ regulatory T cells that suppress allo-reactive memory T-cells. *The European Journal of Immunology*, 41, S. 1663-1674
- Borghans JA, Noest AJ, De Boer RJ, (1999)** How Specific Should Immunological Memory Be? *The Journal of Immunology*, 163, S. 569-575
- Böyum A, (1968)** Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining

centrifugation and sedimentation at 1 g. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation Supplement*. 97, S. 77-89

Bratke K, Klein C, Kuepper M, (2011) Differential development of plasmacytoid dendritic cells in Th1- and Th2-like cytokine milieus. *Allergy*, 66, S. 386-395

Calzada-Nova G, Schnitzlein W, Husmann R, (2009) Characerization of the cytokine and maturation responses of pure populations of porcine plasmacytoid dendritic cells to porcine viruses and toll-like receptor agonists. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 135, S. 20-33

Cella M, Jarrossay D, Facchetti F, (1999) Plasmacytoid monocytes migrate to inflamed lymph nodes and produce large amounts of type I interferon. *Nature Medicine*, 5(8), S. 919-923

Cella M, Facchetti F, Lanzavecchia A, (2000) Plasmacytoid dendritic cells activated by influenza virus and CD40L drive a potent T_H1 polarization. *Nature Immunology*, 1(4), S. 305-310

Cervantes-Barragan L, Lewis KL, Firner S, (2012) Plasmacytoid dendritic cells control T-cell response to chronic viral infection. *PNAS*, 109(8), S. 3012-3017

Chambon P, 1996) A decade of molecular biology of retinoic acid receptors. *The FASEB Journal*, 10, S. 940-954

Chaplin DD, (2006) Overview of the human immune response. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 117(2), S. 430-435

Chaplin DD, (2010) Overview of the human immune response. *Journal of Allergy & Clinical Immunology*, 125, S. 3-23

Charo IF, Ransohoff RM, (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *The New England Journal of Medicine*, 354, S. 610-621

Chen W, Liang X, Peterson A, (2008) The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation. *The Journal of Immunology*, 181, S. 5396-5404

Colonna M, Krug A, Cella M, (2002) Interferon-producing cells: on the front line in immune response against pathogens. *Current Opinion in Immunology*, 14, S. 373-379

Colonna M, Trinchieri, Liu YJ, (2004) Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology*, 5(12), S. 1219-1226

Cox K, North M, Burke M, (2005) Plasmacytoid dendritic cells (PDC) are the major DC subset innately producing cytokines in human lymph nodes. *Journal of Leukocyte Biology*, 78, S. 1142-1152

Cunninghame Graham DS, Graham RR, Manku H, (2008) Polymorphism at the TNF superfamily gene TNFSF4 confers susceptibility to systemic lupus erythematosus. *Nature Genetics*, 40(1), S. 83-89

Craxton A, Magaletti D, Ryan EJ, (2003) Macrophage- and dendritic cell-dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF ligand BAFF. *Blood*, 101, S. 4464-4474

Curti A, Trabanelli S, Salvestrini V, (2009) The role of indoleamine 2,3-dioxygenase in the induction of immune tolerance: focus on hematology. *Blood*, 113, S. 2394-2401

Deenick EK, Tangye SG, (2007) IL-21: a new player in Th17-cell differentiation. *Immunology and Cell Biology*, 85, S. 503-505

De Heer HJ, Hammad H, Soullie T, (2004) Essential role of lung plasmacytoid dendritic cells in preventing asthmatic reactions to harmless inhaled antigen. *Journal of Experimental Medicine*, 200, S. 89-98

De Jong EC, Smits HH, Kapsenberg ML, (2005) Dendritic cell-mediated T cell polarization. *Springer Seminars in Immunopathology*, 26, S. 289-307

Demidem A, Taylor JR, Grammer SF, (1991) T-lymphocyte-activating properties of epidermal antigen-presenting cells from normal and psoriatic skin: evidence that psoriatic epidermal antigen-presenting cells resemble in cultured normal Langerhans cells. *Journal of Investigative Dermatology*, 97, S. 454-460

Denfeld RW, Kind P, Sontheimer RD, (1997) In situ expression of B7 and CD28 receptor families in skin lesions of patients with lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism*, 40(5), S. 814-821

Dieu MC, Vanbervliet A, Vicari JM, (1998) Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *Journal of Experimental Medicine*, 188, S. 373-386

Dieu-Nosjean MC, Vicari A, Lebecque S, (1999) Regulation of dendritic cell trafficking: a process that involves the participation of selective chemokines. *Journal of Leukocyte Biology*, 66(2), S. 252-262

Dockrell DH, Kinghorn GR, (2001) Imiquimod and resiquimod as novel immunomodulators. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 48, S. 751-755

Dubois B, Joubert G, Gomez de Agüero M, (2009) Sequential role of plasmacytoid dendritic cells and regulatory T-cells in oral tolerance. *Gastroenterology*, 137, S. 1019-1028

Dzionek A, Fuchs A, Schmidt P, (2000) BDCA-2, BDCA-3, and BDCA-4: Three markers for distinct subsets of dendritic cells in human peripheral blood. *The Journal of Immunology*, 165, S. 6037-6046

Dzionek A, Sohma J, Nagafune M, (2001) BDCA-2, a novel plasmacytoid dendritic cell-specific type II C-type lectin, mediates antigen capture and is potent inhibitor of interferon alpha/beta induction. *Journal of Experimental Medicine*, 194, S. 1823-1834

Fabricius D, Neubauer M, Mandel B, (2010) Prostaglandin E₂ inhibits IFN- α secretion Th1 costimulation by human plasmacytoid dendritic cells via E-Prostanoid 2 and E-Prostanoid 4 receptor engagement. *The Journal of Immunology*, 184, S. 677-684

Facchetti F, De Wolf-Peeters C, (1991) The plasmacytoid monocyte (the so called plasmacytoid T-cell). An enigmatic cell of the human lymphoid tissue. *Biotest Bulletin*, 4, S. 225-240

Facchetti F, Vermi W, Mason D, (2003) The plasmacytoid monocyte/ interferon producing cells. *Virchows Archiv*, 443, S. 703-717

Farkas L, Kvale EO, Lund-Johansen F, (2006) Plasmacytoid Dendritic Cells induce a distinct cytokine pattern in virus-specific CD4⁺ Memory T-Cells that is modulated by CpG Oligodeoxynucleotides. *Scandinavian Journal of Immunology*, 64, S. 404-411

Filippi CM, Juedes AE, Oldham JE, (2008) Transforming growth factor- β suppresses the activation of CD8⁺ T-cells when naïve but promotes their survival and function once antigen experienced. *Diabetes*, 57, S. 2684-2692

Fitzgerald-Bocarsly P (2002) Natural interferon producing cells: the plasmacytoid dendritic cells. *Biotechniques*, 33, S. 16-29

- Fitzgerald-Bocarsly P, Dai J, Singh S**, (2008) Plasmacytoid dendritic cells and type I IFN: 50 Years of convergent history. *Cytokine & Growth Factor*, 19, S. 3-19
- Fujimoto Y, Tu L, Miller AS**, (2002) CD83 expression influences CD4+ T cell development in the thymus. *Cell*, 108, S. 755-767
- Funaba M, Murata T, Fujimura H**, (1996) Unique recognition of Activin and Inhibin by polyclonal antibodies to Inhibin subunits. *The Journal of Biochemistry*, 119, S. 953-960
- Gatza CE, Oh SY, Blobe GC**, (2010) Roles for the type III TGF- β receptor in human cancer. *Cellular Signalling*, 22, S. 1163-1174
- Gautreau L, Chabannes D, Heslan M**, (2011) Modulation of regulatory T cell-Th17 balance by plasmacytoid dendritic cells. *Journal of Leukocyte Biology*, 90, S. 521-527
- Geissmann F, Dieu-Nosjean MC, Dezutter C**, (2002) Accumulation of immature Langerhans cells in human lymph nodes draining chronically inflamed skin. *Journal of Experimental Medicine*, 196, S. 417-430
- Germain RN**, (2004) An innately interesting decade of research in immunology. *Nature Medicine*, 10(12), S. 1307-1320
- Germann T, Rude E**, (1995) Interleukin-12. *International Archives of Allergy and Immunology*. 108, S. 103-112
- Gilliet M, Cao W, Liu YJ**, (2008) Plasmacytoid dendritic cells: sensing nucleic acids in viral infection and autoimmune diseases. *Nature Reviews. Immunology*, 8(8), S. 594-606
- Giordani L, Sanchez M, Libir I**, (2009) IFN- α amplifies human naïve B cell TLR-9-mediated activation and Ig production. *Journal of Leukocyte Biology*, 86, S. 261-271
- Goubier A, Dubois B, Gheit H**, (2008) Plasmacytoid dendritic cells mediate oral tolerance. *Immunity*, 29, S. 464-475
- Grouard G, Risoan M, Filguiera L**, (1997) The enigmatic plasmacytoid T cells develop into dendritic cells with interleukin-3 and CD40 ligand. *Journal of Experimental Medicine*, 185, S. 1101-1111
- Hackstein H, Morelli AE, Thomson AW**, (2001) Designer dendritic cells for tolerance induction: guided not misguided missiles. *TRENDS in Immunology*, 22, S. 437-442

Hall JA, Cannons JL, Grainger JR, (2011a) Essential role for retinoic acid in the promotion of CD4⁺ T cell effector responses via Retinoic Acid Receptor Alpha. *Immunity*, 34, S. 435-447

Hall JA, Grainger JR, Spencer SP, (2011b) The role of retinoic acid in tolerance and immunity. *Immunity*, 35, S. 13-22

Hammond T, Lee S, Watson MW, (2010) Decreased IFN γ production correlates with diminished production of cytokines by dendritic cells in patients infected with hepatitis C virus and receiving therapy. *Journal of Viral Hepatitis*, 18, S. 482-492

Hansmann L, Groeger S, Wulffen von W, (2008) Human monocytes represent a competitive source of interferon- α in peripheral blood. *Clinical Immunology*, 127, S. 252-264

Hartgers FC, Figdor CG, Adema GJ, (2000) Towards a molecular understanding of dendritic cell immunobiology. *Trends Immunology Today*, 21(11), S. 542-545

Heil F, Ahmad-Nejad P, Hemmi H, (2003) The toll-like receptor 7 (TLR7)-specific stimulus loxoribine uncovers a strong relationship within the TLR7, and 9 subfamily. *European Journal of Immunology*, 33, S. 2987-2997

Heil F, Hemmi H, Hochrein H, (2004) Species-specific recognition of single-stranded RNA via Toll-like receptor 7 and 8. *Science*, 303(5663), S. 1526-1529

Hornung V, Rothenfusser S, Britsch S, (2002) Quantitative expression of Toll-like receptor 1-10 mRNA in cellular subsets of human peripheral blood mononuclear cells and sensitivity to CpG oligodesoxynucleotides. *Journal of Immunology*, 166, S. 5000-5007

Hoshino K, Sugiyama T, Matsumoto M, (2006) IkappaB kinase- α is critical for interferon- α production induced by Toll-like receptors 7 and 9. *Nature*, 440, S. 949-953

Huard B, Arlettaz L, Ambrose C, (2004) BAFF production by antigen-presenting cells provides T cell co-stimulation. *International Immunology*, 16(3), S. 467-475

Hu-Li J, Pannetier C, Guo L, (2001) Regulation of expression of IL-4 alleles: Analysis using a chimeric GFP/IL-4 gene. *Immunity*, 14, S. 1-11

- Irla M, Küpfer N, Suter T**, (2010) MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T-cell-mediated autoimmunity. *Journal of Experimental Medicine*, 207(9), S. 1891-1905
- Ito T, Amakawa R, Inaba M**, (2001) Differential regulation of human blood dendritic cell subsets by IFNs. *The Journal of Immunology*, 166, S. 2961-2969
- Ito T, Wang Y-H, Liu Y-j**, (2005) Plasmacytoid dendritic cell precursors/ type I interferon-producing cells sense viral infection by Toll-like receptor (TLR)7 and TLR9. *Seminars in Immunology*, 26, S. 221-229
- Jacobs B, Wuttke M, Papewalis C**, (2008a) Characterization of Monocyte-derived IFN α -generated Dendritic cells. *Hormone & Metabolic Research*, 40, S. 117-121
- Jacobs B, Wuttke M, Papewalis C**, (2008b) Dendritic Cell Subtypes and In Vitro Generation of Dendritic Cells. *Hormone & Metabolic Research*, 40(2), S. 99-107
- Jaehn PS, Zaencker KS, Schmitz Juergen**, (2008) Functional dichotomy of plasmacytoid dendritic cells: Antigen-specific activation of T cells versus production of type I interferon. *European Journal of Immunology*, 38(7), S. 1822-1832
- Jego G, Palucka AK, Blanck J-P**, (2003) Plasmacytoid dendritic cells induce plasma cell differentiation through Type I Interferon and Interleukin 6. *Immunity*, 19, S. 225-234
- Johnson-Huang LM, McNutt NS, Krueger JG**, (2009) Cytokine-producing dendritic cells in the pathogenesis of inflammatory skin disease. *Journal of Clinical Immunology*, 29(3), S. 247-256
- Kapsenberg ML**, (2003) Dendritic-cell control of pathogen-driven-cell polarization. *Nature reviews. Immunology*, 3(12), S. 984-993
- Kadowaki N, Antonenko S, Lau JY**, (2000) Natural interferon α/β -producing cells link innate and adaptive immunity. *Journal of Experimental Medicine*, 192, S. 219-226
- Kadowaki N, Ho S, Antonenko S**, (2001) Subsets of human dendritic cell precursors express different Toll-like receptors and respond to different microbial antigens. *Journal of Experimental Medicine*, 194, S. 863-869
- Kadowaki N, Liu YJ**, (2002) Natural Type I Interferon-producing cells as a link between innate and adaptive Immunity. *Human Immunology*, 63, S. 1126-1132

- Kaisho T, Akira S**, (2003) Regulation of dendritic cell function through Toll-like receptors. *Current Molecular Medicine*, 3(4), S. 373-385
- Kawai T, Akira S**, (2010) The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nature Immunology*, 11(5), S. 373-384
- Kawamoto H**, (2006) A close development relationship between the lymphoid and myeloid lineages. *Trends in Immunology*, 27, S. 169-175
- Krug A, Rothenfusser S, Hornung V**, (2001a) Identification of CpG oligonucleotide sequences with high induction of IFN- α/β in plasmacytoid dendritic cells. *European Journal of Immunology*, 31, S. 2154-2163
- Krug A, Towarowski A, Britsch S**, (2001b) Toll-like receptor expression reveals CpG DNA as a unique microbial stimulus for plasmacytoid dendritic cells with synergizes with CD40 ligand to induce high amounts of IL-12. *European Journal of Immunology*, 31, S. 3026-3037
- Lande R, Gregorio J, Facchinetti V**, (2007) Plasmacytoid dendritic cells sense self-DNA coupled with antimicrobial peptide. *Nature*, 449, S. 564-569
- Lau DT, Fish PM, Sinha M**, (2008) Interferon regulatory factor-3 activation, hepatic interferon-stimulated gene expression, and immune cell infiltration in hepatitis C virus patients. *Hepatology*, 47(3), S. 799-809
- Lipscomb MF, Masten B**, (2002) Dendritic Cells: Immune Regulators in Health and Disease. *Physiological Reviews*, 82(1), S. 97-130
- Litinskiy MB, Nardelli B, Hilbert DM**, (2002) DCs induce CD40-independent immunoglobulin class switching through BlyS and APRIL. *Nature Immunology*, 3(9), S. 822-829
- Liu Y-J**, (2005) IPC: Professional Type 1 Interferon-Producing Cells and Plasmacytoid Dendritic Cell Precursors. *Annual Review of Immunology*, 23, S. 275-306
- MacLennan I, Vinuesa C**, (2002) Dendritic cells, BAFF, and APRIL: innate players in adaptive antibody responses. *Immunity*. 17(3), S. 235-238
- Marafioti T, Paterson JC, Ballabio E**, (2008) Novel markers of normal and neoplastic human plasmacytoid dendritic cells. *Blood*, 111, S. 3778-3792

- Mellor A**, (2005) Indoleamine 2,3 dioxygenase and regulation of T cell immunity. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 338, S. 20-24
- Mellor AL, Munn DH**, (2008) Creating immune privilege: active local suppression that benefits friends, but protects foes. *Nature Reviews Immunology*, 8, S. 74-80
- Mittelbrunn M, Martinez del Hoyo G, Lopez-Bravo M**, (2008) Imaging of plasmacytoid dendritic cell interactions with T cells. *Blood*, 113(1), S. 75-84
- Mogensen TH, Paludan SR**, (2005) Reading the viral signature by Toll-like receptors and other pattern recognition receptors. *Journal of Molecular Medicine*, 83(3), S. 180-192
- Moore KW, de Waal Malefyt R, Coffman RL**, (2001) Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual Review of Immunology*, 19, S. 683-765
- Mullis K, Faloona F, Scharf S**, (1986) Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 51(Pt 1), S. 263-273
- Murphy K, Travers P, Walport M**, (2009) *Janeway Immunologie*, 7. Aufl., Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg
- Naik SH, Sathe P, Park H-Y**, (2007) Development of plasmacytoid and conventional dendritic cell subtypes from single precursor cells derived in vitro and in vivo. *Nature Immunology*, 8(11), S. 1217-1226
- Ochando JC, Homma C, Yang Y**, (2006) Alloantigen-presenting plasmacytoid dendritic cells mediate tolerance to vascularized grafts. *Nature Immunology*, 7, S. 652-662
- Panda A, Qian F, Mohanty S**, (2010) Age-associated decrease in TLR function in primary human dendritic cells predicts influenza vaccine response. *The Journal of Immunology*, 184, S. 2518-2527
- Patterson S, Rae A, Hockey N**, (2001) Plasmacytoid dendritic cells are highly susceptible to human immunodeficiency virus type I infection and release infectious virus. *Journal of Virology*, 75, S. 6710-6713
- Peng JC, Abu Bakar S, Richardson MM**, (2006) IL10 and IL12B polymorphism each influence IL-12p70 secretion by dendritic cells in response to LPS. *Immunology and Cell Biology*, 84, S. 227-232

Penna G, Vulcano M, Roncari A, (2002) Cutting Edge: Differential chemokine production by myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *The Journal of Immunology*, 169, S. 6673-6676

Pérez-Cabezas B, Naranjo-Gómez M, Bastos-Amador P, (2011) Ligation of Notch Receptors in human conventional and plasmacytoid dendritic cells differentially regulates cytokine and chemokine secretion and modulates Th Cell polarization. *The Journal of Immunology*, 186, S. 7006-7015

Piqueras B, Connolly J, Freitas H, (2006) Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effecotrs. *Blood*, 107(6), S. 2613-2618

Qi Z-M, Wang J, Sun Z-R, (2005) Polymorphism of the mouse gene for the interleukin 10 receptor alpha chain (Il10ra) and its association with the autoimmune phenotype. *Immunogenetics*, 57, S. 697-702

R Core Team, (2012) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, URL <http://www.R-project.org/>

Reid SD, Penna G, Adorini L, (2000) The control of T cell responses by dendritic cell subsets. *Current Opinion in Immunology*, 12, S. 114-121

Reizis B, Bunin A, Ghosh HS, (2011) Plasmacytoid dendritic cells: Recent progress and open questions. *Annual Review of Immunology*, 29, S. 163-183

Riley JK, Takeda K, Akira S, (1999) Interleukin-10 Receptor signaling through the JAK-STAT pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 274(23), S. 16513-16521

Rissoan M-C, Soumelis V, Kadowaki N, (1999) Reciprocal Control of T Helper Cell and Dendritic Cell Differentiation. *Science*, 283, S. 1183-1186

Robson NC, Phillips DJ, McAlpine T, (2008) Activin-A: a novel dendritic cell-derived cytokine that potently attenuates CD40 ligand-specific cytokine and chemokine production. *Blood*, 111, S. 2733-2743

Robson NC, Wei H, McAlpine T, (2009) Activin-A attenuates several human natural killer cell functions. *Blood*, 113, S. 3218-3225

- Rot A, von Andrian UH**, (2004) Chemokines in innate and adaptive host defense: basic chemokines grammar for immune cells. *Annual Review of Immunology*, 22, S. 891-928
- Rothenfusser S, Tuma E, Endres S**, (2002) Plasmacytoid Dendritic Cells: The key to CpG. *Human Immunology*, 63, S. 1111-1119
- Sack U, Tárnok A, Rothe G (Hrsg)**, (2007) *Zelluläre Diagnostik. Grundlagen, Methoden und klinische Anwendungen der Durchflusszytometrie*. Basel, Karger, S. 27–70
- Sallusto F, Cella M, Danieli C**, (1995) Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products. *Journal of Experimental Medicine*, 182, S. 389-400
- Salogni L, Musso T, Bosisio D**, (2009) Activin A induces dendritic cell migration through the polarized release of CXC chemokine ligands 12 and 14. *Blood*, 113, S. 5848-5856
- Santibanez JF, Quintanilla M, Bernabeu C**, (2011) TGF- β TGF- β receptor system and its role in physiological and pathological conditions. *Clinical Science*, 121, S. 233-251
- Santini, SM, Lapenta C, Logozzi M**, (2000) Type I interferon as a powerful adjuvant for monocyte-derived dendritic cell development and activity in vitro and in Hu-PBL-SCID mice. *Journal of Experimental Medicine*, 191, S. 1777-1788
- Sauder DN**, (2003) Imiquimod: modes of action. *British Journal of Dermatology*, 149(66), S. 5-8
- Schmidt-Weber CB, Blaser K**, (2004) Regulation and role of transforming growth factor- β in immune tolerance induction and inflammation. *Current Opinion in Immunology*, 16, S. 709-716.
- Schwab N, Zozulya AL, Kieseier BC**, (2010) An imbalance of two functionally and phenotypically different subsets of plasmacytoid dendritic cells characterizes the dysfunctional immune regulation in Multiple Sclerosis. *The Journal of Immunology*, 184, S. 5368-5374
- Scutera S, Riboldi E, Daniele R**, (2008) Production and function of Activin A in human dendritic cells. *European Cytokine Network*, 19(1), S. 60-68

- Segerer SE, Müller N, van den Brandt J**, (2008) The glycoprotein-hormones Activin A and Inhibin A interfere with dendritic cell maturation. *Reproductive Biology & Endocrinology*, 6:17
- Shannon JT**, (2002) Dendritic cells: inciting and inhibiting autoimmunity. *Current Opinion in Immunology*, 14, S. 765-770
- Shortman K, Liu Y-J**, (2002) Mouse and human dendritic cell subtypes. *Immunology*, 2, S. 151-161
- Shigematsu H, Reizis B, Iwasaki H**, (2004) Plasmacytoid dendritic cells activate lymphoid-specific genetic programs irrespective of their cellular origin. *Immunity*, 21, S. 43-53
- Siegal FP, Kadowaki N, Shodell M**, (1999) The Nature of the Principal Type 1 Interferon-Producing Cells in Human Blood. *Science*, 284, S. 1835-1837
- Smith WL, DeWitt DL, Garavito RM**, (2000) Cyclooxygenases: structural, cellular and molecular biology. *Annual Review of Biochemistry*, 69, S. 145-182
- Smyth GK**, (2005). Limma: linear models for microarray data. In: 'Bioinformatics and Computational Biology Solutions using R and Bioconductor'. R. Gentleman, V. Carey, S. Dudoit, R. Irizarry, W. Huber (eds), Springer, New York, S. 397--420.
- Soumelis V, Scott I, Gheyas F**, (2001) Depletion of circulating natural type I interferon-producing cells in HIV-infected AIDS patients. *Blood*, 98, S. 906-912
- Speck U**, (2011) Grundlagen der Durchflusszytometrie, Arbeiten mit dem BD Fortessa und dem BD FACS ARIA III, www.bdbiociences.com
- Steinman RM, Cohn ZA**, (1973) Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 137, S. 1142-1162
- Steinman RM, Hawiger D, Nussenzweig MV**, (2003) Tolerogenic Dendritic Cells. *Annual Review of Immunology*, 21, S. 685-711
- Struthers M, Bet AJ, Wisniewski T**, (2010) Synthesis and immunological activities of novel agonists of Toll-like receptor 9. *Cellular Immunology*, 263, S. 105-113
- Swiecki M, Colonna M**, (2010a) Accumulation of plasmacytoid DC: Roles in disease pathogenesis and targets for immunotherapy. *European Journal of Immunology*, 40, S. 2085-2130

- Swiecki M, Colonna M**, (2010b) Unraveling the functions of plasmacytoid dendritic cells during viral infections, autoimmunity, and tolerance. *Immunological Reviews*, 234(1), S. 142-162
- Takagi, H, Fukaya T, Eizumi K**, (2011) Plasmacytoid Dendritic Cells are crucial for the initiation on inflammation and T cell Immunity in vivo. *Immunity*, 35, S. 958-971
- Takeuchi O, Akira S**, (2009) Innate immunity to virus infection. *Immunological Reviews*, 227, S. 75-86
- Tang HL, Cyster JG**, (1999) Chemokine Up-regulation and activated T cell attraction by maturing dendritic cells. *Science*, 284, S. 819-822
- Tao Y, Yang Y, Wang W**, (2006) Effect of all-trans retinoic acid on the differentiation, maturation and functions of dendritic cells derived from cord blood monocytes. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 47, S. 444-450
- Thomas R, Davis LS, Lipsky PE**, (1994) Rheumatoid synovium is enriched in mature antigen-presenting dendritic cells. *Journal of Immunology*, 152(5), S. 2613-2623
- Treilleux I, Blay JY, Bendriss-Vermare N**, (2004) Dendritic cell infiltration and prognosis of early stage breast cancer. *Clinical Cancer Research*. 10(22), S. 7466-74
- Ueno H, Klechevsky E, Morita R**, (2007) Dendritic cell subsets in health and disease. *Immunological Reviews*, 219, S. 118-142
- Ueno H, Palucka AK, Banchereau J**, (2010) The expanding family of dendritic cell subsets. *Nature Biotechnology*, 28(8), S. 813- 815
- Vicari AP, Chiodoni C, Vaure C**, (2002) Reversal of tumor-induced dendritic cell paralysis by CpG immunostimulatory oligonucleotide and anti-interleukin 10 receptor antibody. *Journal of Experimental Medicine*, 196, S. 541-549
- Vierira PL, De Jong EC, Wierenga EA**, (2000) Development of Th1-inducing capacity in myeloid dendritic cells requires environmental instruction. *Journal of Immunology*, 164, S. 4507-4512
- Wagner H**, (2004) The immunobiology of the TLR9 subfamily. *TRENDS in Immunology*, 25(7), S. 381-386
- Wolf SF, Sieburth D, Sypek J**, (1994) Interleukin 12: a key modulator of immune function. *Stem Cells*, 12, S. 154-168

Wong KL, Tang LFM, Lew FC, (2009) CD44^{high} memory CD8 T Cells synergize with CpG DNA to activate dendritic cell IL-12p70 production. *Journal of Immunology*, 183, S. 41-50

Xu H, Zhang G-X, Ciric B, (2008) IDO: A double-edged sword for T_H1/T_H2 regulation. *Immunology Letters*, 121, S. 1-6

Yoneyama H, Matsuno K, Toda E, (2005) Plasmacytoid DCs help lymph node DCs to induce anti-HSV CTLs. *Journal of Experimental Medicine*. 202(3), S. 425-35

Zou W, Machelon V, Coulomb-L'Hermin A, (2001) Stromal-derived factor-1 in human tumors recruits and alters the function of plasmacytoid precursor dendritic cells. *Nature Medicine*, 7, S. 1339-1346

Zlotnik A, Yoshie O, (2000) Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12(2), S. 121-127

Zloza A, Jagoda MC, Lyons GE, (2011) CD8 Co-receptor promotes susceptibility of CD8⁺ T cells to transforming growth factor- β (TGF- β)-mediated suppression. *Cancer Immunology, Immunotherapy*, 60, S. 291-297

Anhang

1.) Ergebnisse der RT-PCR:

Tabelle 8: RT-PCR – Humane Zytokine. Höhere Genexpression in der IFN- α -positiven Gruppe im Vergleich zur IFN- α -negativen Gruppe

Arrays included in Test Group: IFN- α -positiv

Arrays included in Control Group: IFN- α -negativ Genes Over-Expressed in Test Group vs. Control Group

Gene Symbol	Description	Fold Regulation
BMP1	Bone morphogenetic protein 1	4,1468
BMP2	Bone morphogenetic protein 2	6,6438
BMP4	Bone morphogenetic protein 4	74,1307
BMP7	Bone morphogenetic protein 7	8,7665
BMP8B	Bone morphogenetic protein 8B	8,0668
IFNA1	Interferon alpha 1	231,0402
IFNA2	Interferon alpha 2	290,4206
IFNA4	Interferon alpha 4	516,2765
IFNA5	Interferon alpha 5	267,2415
IFNA8	Interferon alpha 8	203,9399
IFNB1	Interferon beta 1, fibroblast	57,76
IFNG	Interferon gamma	38,9081
IL-12A	Interleukin 12(p35)	1153,6581
IL-21	Interleukin 21	7,6848
IL-6	Interleukin 6	17,6549
IL-7	Interleukin 7	4,1468
IL-8	Interleukin 8	11,0962
LTA	Lymphotoxin alpha (TNF superfamily)	4,0334

Arrays included in Test Group: IFN- α -positive
Arrays included in Control Group: IFN- α -negative Genes Over-Expressed
in Test Group vs. Control Group

Gene Symbol	Description	Fold Regulation
PDGFA	Platelet-derived growth factor-alpha/-1	107,7841
TNFA	Tumor necrosis factor- α	5,035
TNFSF11	Tumor necrosis factor, CD254	5,7837
CD70	CD70-Molekül, CD27	5,7438

Tabelle 9: RT-PCR – Humane Zytokine. Niedrigere Genexpression in der IFN- α -positiven Gruppe im Vergleich zur IFN- α -negativen Gruppe

Genes Under-Expressed in
Test Group vs. Control Group

Gene Symbol	Description	Fold Regulation
IL-16	Interleukin 16	-7,3005
IL-18	Interleukin 18	-5,2343
INHBA	Inhibin betaA	-61,3079
TNFSF13B	Tumor necrosis factor, BAFF	-12,711
TNFSF4	Tumor necrosis factor, CD134	-11,4557

Tabelle 10: RT-PCR – Cell Surface Markers. Höhere Genexpression in der IFN- α -positiven Gruppe im Vergleich zur IFN- α -negativen Gruppe

Arrays included in Test Group: IFN- α -positiv		
Arrays included in Control Group: IFN- α -negativ		
Genes Over-Expressed in Test Group vs. Control Group		
Gene Symbol	Description	Fold Regulation
CD19	CD19	5,3857
CD2	CD2	110,4893
CD22	CD22	275,5747
CD247	CD247	46,4804
CD3D	CD3	10,2605
CD40	CD40	18,4273
CD5	CD5	23,3962
CD6	CD6	36,0931
CD70	CD70	24,0632
CD79A	CD79A	16,514
CD96	CD96	64,0375
COL1A1	Collagen type 1, alpha 1	25,1656
CR2	CD21	105,5957
KLRB1	CD161	102,2333
KLRD1	Killer cell lectin-like receptor	53,3643
MS4A1	Membrane-spanning 4-domains	23,2218
NT5E	CD73	67,2914
RETN	Resistin	61,9675
VWF	Von Willebrand factor	34,8198

Tabelle 11: RT-PCR – Cell Surface Markers. Niedrigere Genexpression in der IFN- α -positiven Gruppe im Vergleich zur IFN- α -negativen Gruppe

Genes Under-Expressed in Test Group vs. Control Group		
Gene Symbol	Description	Fold Regulation
CD209	CD209	-16,0539
CD40LG	CD40LG	-6,0446
CD83	CD83	-7,5008
DPP4	CD26	-10,0016
FAS	CD95	-14,5344
ITGA3	Integrin alpha 3	-4,0354

2.) Listen der differentiell exprimierten Gene zwischen der IFN- α -positiven und der IFN- α -negativen Subpopulation:

Tabelle 12: Hochregulierte Gene der IFN- α -positiven Subpopulation im DNA-Oligonukleotid-Microarray.

A, B und C stehen für die zur Analyse- und Vergleichszwecken während des Verfahrens gebildeten Array-Gruppen. A = Array I und II, B = Array III und IV, C = Alle Arrays. n = 8 Spender. Die Werte der Gruppen A, B und C entsprechen der „log₂-fold differential expression“ . Die aufgelisteten Gene stellen die Schnittmengen der Ergebnisse der Gruppen A, B und C dar.

up in A, B, C						
Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description	
PTGS2	NM_000963	2,65	3,00	2,82	Human prostaglandin-endoperoxide synthase 2	
PTGS2	NM_000963	2,56	2,56	2,56	Human prostaglandin-endoperoxide synthase 2	
GPR34	NM_001033513	2,53	4,08	3,31	Human G protein-coupled receptor 34	
IFNA2	NM_000605	2,49	3,95	3,22	Human interferon, alpha 2	
C5orf28	NM_022483	2,46	2,69	2,57	Human chromosome 5 open reading frame 28	
A_24_P931175	A_24_P931175	2,41	2,69	2,55	Unknown	

up in A, B, C					
Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description
CR601496	CR601496	2,40	3,16	2,78	full-length cDNA clone CS0DI062YF05 of Placenta Cot 25
FOXA1	NM_004496	2,38	3,28	2,83	Human forkhead box A1
IFNA6	NM_021002	2,33	4,86	3,60	Human interferon, alpha 6
SH2D4A	NM_022071	2,30	1,72	2,01	Human SH2 domain containing 4A
BC035377	BC035377	2,28	2,51	2,40	Human cDNA clone IMAGE:4826240
IFNA14	NM_002172	2,27	5,71	3,99	Human interferon, alpha 14
A_32_P150269	A_32_P150269	2,23	1,78	2,00	Unknown
A_32_P80697	A_32_P80697	2,21	1,85	2,03	Unknown
IL12A	NM_000882	2,20	3,70	2,95	Human interleukin 12A (p35)
MAP3K8	NM_005204	2,20	2,40	2,30	Human mitogen-activated protein 3 kinase 8
IL6	NM_000600	2,19	2,02	2,11	Human interleukin 6 (interferon, beta 2)
ST7OT1	NR_002330	2,18	1,79	1,99	Human ST7 overlapping transcript 1 on chromosome 7
FOXA1	NM_004496	2,17	2,82	2,50	Human forkhead box A1
CTAGE6	BC043153	2,17	1,73	1,95	Human CTAGE family, member 6
NEXN	NM_144573	2,16	2,68	2,42	Human nexilin (F actin binding protein)
IBRDC2	NM_182757	2,15	2,27	2,21	Human IBR domain containing 2
FAM111A	NM_022074	2,15	1,68	1,91	Human family with sequence similarity 111, member A
TAL1	NM_003189	2,13	2,29	2,21	Human T-cell acute lymphocytic leukemia 1
OSR2	NM_053001	2,12	3,15	2,64	Human odd-skipped related 2 (Drosophila)
DBF4	NM_006716	2,12	2,43	2,28	Human DBF4 homolog (S. cerevisiae)
IFNA10	NM_002171	2,11	5,88	3,99	Human interferon, alpha 10
FGFBP3	NM_152429	2,11	2,25	2,18	Human fibroblast growth factor binding protein 3
SRPK2	NM_182691	2,10	1,54	1,82	Human SFRS protein kinase 2, transcript variant 2
ENST00000264899	ENST00000264899	2,09	3,28	2,68	Extracellular matrix protein FRAS1 precursor.
IFNE1	NM_176891	2,08	3,91	2,99	Human interferon epsilon 1
TGIF	NM_170695	2,08	1,83	1,96	Human TGFB-induced factor, transcript variant 1

up in A, B, C						
Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description	
KIAA0286	NM_015257	2,07	1,77	1,92	Human KIAA0286 protein	
IFIT2	NM_001547	2,06	1,84	1,95	Human interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	
CR606271	CR606271	2,06	1,79	1,93	full-length cDNA clone CSDDI024Y11.0 of Placenta Cot 25	
SLC35F5	NM_025181	2,05	1,55	1,80	Human solute carrier family 35, member F5	
TCF7L2	ENST00000369397	2,05	2,17	2,11	Transcription factor 7-like 2 (HMG box transcription factor 4)	
C4orf18	NM_016613	2,05	1,36	1,70	Human chromosome 4 open reading frame 18, transcript variant 2	
PAGE5	NM_130467	2,01	1,67	1,90	Human P antigen family, member 5, transcript variant 1	
LOC254128	BC036624	2,01	1,72	1,86	Human hypothetical protein LOC254128	
BT759100	BT759100	2,00	1,89	1,94	603042504F1 NIH_MGC_116 Human cDNA clone IMAGE:5182897 5'	
HES1	NM_005524	2,00	1,35	1,67	Human hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)	
GBP4	NM_052941	1,99	1,67	1,83	Human guanylate binding protein 4	
HDC	NM_002112	1,99	1,56	1,78	Human histidine decarboxylase	
KIAA1377	NM_020802	1,99	2,61	2,30	Human KIAA1377	
NEXN	NM_144573	1,98	2,53	2,25	Human nexilin (F actin binding protein)	
SAR1A	NM_020150	1,98	1,89	1,93	Human SAR1 gene homolog A (S. cerevisiae)	
PCDH17	NM_001040429	1,96	1,58	1,77	Human protocadherin 17 (PCDH17), mRNA	
ENPP2	NM_006209	1,96	1,46	1,71	Human ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 2, transcript variant 1	
PS1TP4	AK093903	1,96	1,15	1,55	Human cDNA FLJ36584 fs, clone TRACH2013450	
GLYATL1	NM_080661	1,96	3,02	2,49	Human glycine-N-acyltransferase-like 1	
POLR3C	NM_006468	1,94	1,87	1,90	Human polymerase (RNA) III (DNA directed) polypeptide C (62kD)	
BMP4	NM_001202	1,94	1,30	1,62	Human bone morphogenetic protein 4, transcript variant 1	
ADORA2B	NM_000676	1,93	1,94	1,93	Human adenosine A2b receptor	
SYNPO2	AL833294	1,92	2,32	2,05	Human mRNA, cDNA DKFZp451G189	
NCOA7	NM_181782	1,91	1,03	1,47	Human nuclear receptor coactivator 7	
BTG3	BC028229	1,91	1,06	1,48	Human, clone IMAGE:5240818	
SLC1A2	NM_004171	1,91	1,40	1,65	Human solute carrier family 1, member 2	

up in A, B, C					
Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description
TWIST1	NM_000474	1,90	1,81	1,86	Human twist homolog 1 (Drosophila)
SRPK2	NM_182691	1,90	1,15	1,52	Human SFRS protein kinase 2, transcript variant 2
DLX1	NM_178120	1,90	1,98	1,94	Human distal-less homeobox 1, transcript variant 1
SLC1A2	NM_004171	1,90	2,11	2,00	Human solute carrier family 1, member 2
CLEC2D	NM_013269	1,89	1,56	1,72	Human C-type lectin domain family 2, member D, transcript variant 1
IL8	NM_000584	1,88	1,25	1,57	Human interleukin 8
PMCH	NM_002674	1,88	1,65	1,77	Human pro-melanin-concentrating hormone
THC2781239	THC2781239	1,88	1,80	1,84	Unknown
TRIM69	BC031266	1,88	1,51	1,69	Human ring finger protein 36, (cDNA clone IMAGE:5277162)
PRKAA1	NM_206907	1,87	1,74	1,81	Human protein kinase, AMP-activated, alpha 1 catalytic subunit, transcript vari-
FAM111A	NM_022074	1,87	2,06	1,97	Human family with sequence similarity 111, member A, transcript variant 1
OSR2	NM_053001	1,87	1,47	1,67	Human odd-skipped related 2 (Drosophila)
PAGE2	NM_207339	1,86	1,32	1,59	Human P antigen family, member 2 (prostate associated)
A_32_P212141	A_32_P212141	1,86	1,70	1,78	Unknown
FOXC1	NM_001453	1,86	2,21	2,04	Human forkhead box C1
RANBP3L	NM_145000	1,85	1,53	1,69	Human RAN binding protein 3-like
NEU4	NM_080741	1,85	1,92	1,88	Human sialidase 4
MAFK	NM_002360	1,84	1,82	1,83	Human v-naf musculoaponeurotic fibrosarcoma oncogene homolog K (avian)
CLCF1	NM_013246	1,84	1,27	1,56	Human cardiotrophin-like cytokine factor 1
AL359055	AL359055	1,84	1,25	1,55	Human mRNA full length insert cDNA clone EUROIMAGE 2344436.
MGC14376	NM_032895	1,84	1,17	1,51	Human hypothetical protein MGC14376, transcript variant 1
DKK1	NM_012242	1,84	2,23	2,03	Human dickkopf homolog 1 (Xenopus laevis)
TAC3	NM_001006667	1,83	1,70	1,77	Human tachykinin 3 (neuromedin K, neurokinin beta), transcript variant 1
CR601694	CR601694	1,83	1,31	1,57	full-length cDNA clone CS0DM011YL19 of Fetal liver of Human
BC047111	BC047111	1,83	1,64	1,74	Human cDNA clone IMAGE:5314178.
DNAJB4	NM_007034	1,83	1,40	1,61	Human DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4

up in A, B, C					
Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description
CCDC99	NM_017785	1,83	1,00	1,41	Human coiled-coil domain containing 99
BG284526	BG284526	1,83	1,11	1,47	602408672F1 NIH_MGC_91 Human cDNA clone IMAGE:4537960 5'
PAPLN	NM_173462	1,82	1,67	1,74	Human papilin, proteoglycan-like sulfated glycoprotein
PMCHL1	AY008410	1,82	1,36	1,59	Human pro-melanin-concentrating hormone-like 1 protein
NPM1	NM_001037738	1,82	1,44	1,63	Human nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin), transcript
CD48	NM_001778	1,81	1,38	1,60	Human CD48 molecule
THC2655298	THC2655298	1,81	1,67	1,74	Unknown
FLJ32312	NM_144709	1,81	1,85	1,83	Human hypothetical protein FLJ32312
A_32_P235293	A_32_P235293	1,81	1,09	1,45	Unknown
FAM57A	NM_024792	1,81	1,40	1,61	Human family with sequence similarity 57, member A
LIG1	NM_000234	1,80	1,91	1,86	Human ligase I, DNA, ATP-dependent
DLAT	NM_001931	1,80	1,21	1,51	Human dihydroliipoamide S-acetyltransferase
KIAA0286	NM_015257	1,80	1,94	1,85	Human KIAA0286 protein (KIAA0286), mRNA
BU684362	BU684362	1,80	1,00	1,40	BU684362 UI-CF-EN0-aco-n-23-0-UI.s1 UI-CF-EN0, clone UI-CF-EN0-aco-n-
BX095281	BX095281	1,80	1,12	1,46	BX095281 Soares melanocyte 2NbHM Human cDNA clone
APRN	NM_015032	1,80	1,05	1,43	Human androgen-induced proliferation inhibitor
DNAJB4	NM_007034	1,80	1,20	1,50	Human Dnal (Hsp40) homolog, subfamily B, member 4
C21orf42	AY035383	1,80	1,90	1,85	Human C21orf42 protein mRNA
THC2515921	THC2515921	1,78	2,16	1,91	ALU1_HUMAN (P39188) Alu subfamily J sequence contamination warning
MGC14376	NM_032895	1,78	1,37	1,57	Human hypothetical protein MGC14376, transcript variant 1
DNAJG7	NM_003315	1,78	1,74	1,76	Human Dnal (Hsp40) homolog, subfamily C, member 7
AK096498	AK096498	1,78	1,84	1,81	Human cDNA FLJ39179 fs, clone OCBBF2004147
FAM46A	NM_017633	1,77	1,03	1,40	Human family with sequence similarity 46, member A
CD48	NM_001778	1,77	1,37	1,57	Human CD48 molecule
BF213738	BF213738	1,75	1,30	1,53	BF213738 601847628F1 NIH_MGC_55 Human cDNA clone IMAGE:4078519
ZNF710	AK160373	1,75	1,27	1,51	Human mRNA for FLJ00306 protein

up in A, B, C					
Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description
TFPI2	ENST00000222543	1,75	1,40	1,57	Tissue factor pathway inhibitor 2 precursor (Placental protein 5)
IKZF2	NM_001079526	1,75	1,07	1,41	Human IKAROS family zinc finger 2 (Helios), transcript variant 2
LYST	NM_000081	1,75	1,16	1,45	Human lysosomal trafficking regulator, transcript variant 1
NXT2	NM_018698	1,74	1,53	1,63	Human nuclear transport factor 2-like export factor 2
CLEC2D	NM_001004419	1,74	1,24	1,49	Human C-type lectin domain family 2, member D, transcript variant 2,
ZZEF1	NM_015113	1,74	1,25	1,50	Human zinc finger, ZZ-type with EF-hand domain 1
THC2755661	THC2755661	1,74	1,55	1,64	Unknown
MYO1A	NM_005379	1,74	1,72	1,73	Human myosin IA
ZNF364	NM_014455	1,74	1,28	1,51	Human zinc finger protein 364
RGS13	NM_002927	1,73	1,59	1,66	Human regulator of G-protein signalling 13, transcript variant 1
BC022398	BC022398	1,73	1,50	1,62	Human cDNA clone IMAGE:4689481
TFPI2	NM_006528	1,72	2,76	2,24	Human tissue factor pathway inhibitor 2
BCL2L14	NM_030766	1,72	1,14	1,43	Human BCL2-like 14 (apoptosis facilitator), transcript variant 2
EGR2	NM_000399	1,72	1,05	1,38	Human early growth response 2 (Krox-20 homolog, Drosophila)
CLEC2B	NM_005127	1,72	1,26	1,49	Human C-type lectin domain family 2, member B
ZFP91	NM_053023	1,71	1,02	1,37	Human zinc finger protein 91 homolog (mouse), transcript variant 1
BG216229	BG216229	1,71	1,25	1,48	BG216229 RST35803 Athersys RAGE Library Human cDNA
NEU4	NM_080741	1,71	1,75	1,73	Human sialidase 4
SLC25A40	NM_018843	1,70	1,57	1,63	Human solute carrier family 25, member 40
CLEC2D	NM_001004419	1,69	1,71	1,70	Human C-type lectin domain family 2, member D, transcript variant 2
SPRY1	NM_199327	1,69	1,01	1,35	Human sprouty homolog 1, antagonist of FGF signaling (Drosophila), transcript
LOC219731	AK056703	1,68	1,06	1,37	Human cDNA FLJ32141 fs, clone PLACE5000067
LOC728586	XM_001130569	1,67	1,02	1,34	PREDICTED: Human hypothetical protein LOC728586
SRBD1	NM_018079	1,67	1,35	1,51	Human S1 RNA binding domain 1
BQ424374	BQ424374	1,67	1,24	1,45	AGENCOURT_7892842 NIH_MGC_72 Human cDNA clone IMAGE:6157378
HESI	NM_005524	1,66	1,03	1,35	Human hairy and enhancer of split 1, (Drosophila)

up in A, B, C						
Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description	
NOMO1	NM_014287	1,66	1,39	1,53	Human NODAL modulator 1	
AF116678	AF116678	1,65	1,45	1,55	Human PRO1995	
FLJ32312	AL832208	1,64	1,35	1,50	Human mRNA; cDNA DKFZp686K122 (from clone DKFZp686K122)	
DLAT	NM_001931	1,64	1,03	1,33	Human dihydrolipoamide S-acetyltransferase	
RHOH	NM_004310	1,63	1,30	1,47	Human ras homolog gene family, member H	
BC063641	BC063641	1,63	1,03	1,33	Human cDNA clone IMAGE:4745832	
CDK6	NM_001259	1,62	1,43	1,53	Human cyclin-dependent kinase 6	
CYB5R2	NM_016229	1,62	1,91	1,76	Human cytochrome b5 reductase 2	
BG031574	BG031574	1,62	1,47	1,55	60229712F1 NIH_MGC_87 Human cDNA clone IMAGE:4394138 5'	
AK026078	AK026078	1,62	1,15	1,38	Human cDNA: FLJ22425 fis, clone HRC08686	
NMI	NM_004688	1,61	2,03	1,82	Human N-myc (and STAT) interactor	
SIPAL12	NM_020808	1,60	1,20	1,40	Human signal-induced proliferation-associated 1 like 2	
MRPS7	NM_015971	1,60	1,07	1,33	Human mitochondrial ribosomal protein S7	
CSRP2	NM_001321	1,60	2,29	1,94	Human cysteine and glycine-rich protein 2	
ARL5B	NM_178815	1,59	1,04	1,32	Human ADP-ribosylation factor-like 5B	
BCL2A1	NM_004049	1,59	1,76	1,68	Human BCL2-related protein A1	
FOXC1	NM_001453	1,59	2,98	2,05	Human forkhead box C1	
NR5A2	NM_205860	1,59	1,03	1,31	Human nuclear receptor subfamily 5, group A, member 2, transcript variant 1	
NFKB1Z	NM_031419	1,59	1,02	1,30	Human nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibi-	
ZFP36L1	NM_004926	1,58	1,05	1,32	Human zinc finger protein 36, C3H type-like 1	
IFNA5	NM_002169	1,58	5,48	3,53	Human interferon, alpha 5	
GBP4	NM_052941	1,58	1,87	1,72	Human guanylate binding protein 4	
CENPJ	NM_018451	1,57	1,91	1,74	Human centromere protein J	
FLJ40722	NM_173678	1,56	1,39	1,48	Human hypothetical protein FLJ40722	
MYO1E	U14391	1,56	1,66	1,61	Human myosin-1C	
CXCL11	NM_005409	1,56	1,19	1,38	Human chemokine (C-X-C motif) ligand 11	

up in A, B, C						
Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description	
AK123264	AK123264	1,55	1,44	1,49	Human cDNA FLJ141270 fs, clone BRAMY2036387	
LRAP	NM_022350	1,55	1,40	1,47	Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase	
BM819787	BM819787	1,54	1,33	1,43	BM819787 K-EST0087976 S16N667673 Human cDNA clone S16N667673-2-	
THC2657613	THC2657613	1,54	1,28	1,41	Q5NT18_ENTH1, Small GTPase EhRabM3 (Fragment), partial (7%)	
IL28B	NM_172139	1,54	2,64	2,09	Human interleukin 28B (interferon, lambda 3)	
APRN	NM_015032	1,54	1,29	1,41	Human androgen-induced proliferation inhibitor	
LOC440577	XM_496355	1,53	1,09	1,31	PREDICTED: Human similar to nucleophosmin 1 isoform 1	
CGGBP1	NM_001008390	1,53	1,17	1,35	Human CCG triplet repeat binding protein 1, transcript variant 1	
ATF7IP	NM_018179	1,53	1,07	1,30	Human activating transcription factor 7 interacting protein	
CHML	NM_001821	1,53	1,10	1,31	Human choroideremia-like (Rab escort protein 2)	
THC2662125	THC2662125	1,53	1,01	1,27	Unknown	
INDO	NM_002164	1,52	1,94	1,73	Human indoleamine-pyrrrole 2,3 dioxygenase	
PLEKHA4	NM_020904	1,52	1,64	1,58	Human pleckstrin homology domain containing, family A member 4	
ANAPC10	NM_014885	1,52	1,08	1,30	Human anaphase promoting complex subunit 10	
NPM1	NM_001037738	1,51	1,06	1,29	Human nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin), transcript	
EXT1	NM_000127	1,51	1,23	1,37	Human exostoses (multiple) 1	
SELK	NM_021237	1,50	1,22	1,36	Human selenoprotein K	
TNIP3	NM_024873	1,50	1,58	1,54	Human TNFAIP3 interacting protein 3	
IL18RAP	NM_003853	1,49	1,19	1,34	Human interleukin 18 receptor accessory protein	
GNG11	NM_004126	1,49	1,55	1,52	Human guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 11	
ITGB5	NM_002213	1,48	2,16	1,71	Human integrin, beta 5	
TNFAIP8	NM_014350	1,48	1,59	1,53	Human tumor necrosis factor, alpha-induced protein 8, transcript variant 1	
UTX	NM_021140	1,46	1,45	1,46	Human ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat, X chromosome	
PRRG4	NM_024081	1,46	1,01	1,24	Human proline rich Gla (G-carboxyglutamic acid) 4 (transmembrane)	
CCL3L3	NM_001001437	1,46	1,35	1,40	Human chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3	
ZNF364	ENST00000369291	1,45	1,19	1,32	Zinc finger protein 364 (Rabring 7) (RING finger protein 115)	

up in A, B, C						
Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description	
AREG	NM_001657	1,45	1,04	1,25	Human amphiregulin (schwannoma-derived growth factor)	
ZC3HAV1	NM_024625	1,45	1,32	1,38	Human zinc finger CCH-type, antiviral 1, transcript variant 2	
SAR1A	NM_020150	1,45	2,21	1,83	Human SAR1 gene homolog A (S. cerevisiae)	
FGFBP3	NM_152429	1,45	1,66	1,56	Human fibroblast growth factor binding protein 3	
IL10RA	NM_001558	1,43	1,27	1,35	Human interleukin 10 receptor, alpha	
HARS	NM_002109	1,42	1,10	1,26	Human histidyl-tRNA synthetase	
CCL5	NM_002985	1,41	2,10	1,75	Human chemokine (C-C motif) ligand 5	
GTF2B	NM_001514	1,41	1,17	1,29	Human general transcription factor IIB	
AQP9	NM_020980	1,41	1,30	1,35	Human aquaporin 9	
DEPDC7	NM_139160	1,41	1,50	1,45	Human DEP domain containing 7, transcript variant 2	
TOE1	BC009364	1,40	1,22	1,31	Human target of EGFR1, member 1 (nuclear), (cDNA clone MGC:14971	
CLEC2D	NM_001004419	1,39	1,11	1,25	Human C-type lectin domain family 2, member D, transcript variant 2	
TAL1	NM_003189	1,38	1,40	1,39	Human T-cell acute lymphocytic leukemia 1	
BIC	NR_001458	1,38	1,38	1,38	Human BIC transcript on chromosome 21	
ZNF364	NM_014455	1,38	1,75	1,50	Human zinc finger protein 364 (ZNF364), mRNA	
NONO	NM_007363	1,38	1,91	1,64	Human non-POU domain containing, octamer-binding (NONO), mRNA	
ATRN	NM_139322	1,38	1,13	1,26	Human attractin (ATRN), transcript variant 2, mRNA	
CENTAI1	NM_006869	1,37	1,53	1,45	Human centaurin, alpha 1 (CENTA1), mRNA	
TNF	NM_000594	1,37	1,02	1,20	Human tumor necrosis factor (TNF superfamily, member 2) (TNF), mRNA	
PLEKHA4	NM_020904	1,37	2,87	2,12	Human pleckstrin homology domain containing, family A (phosphoinositide	
MAP4K4	NM_145686	1,37	1,02	1,19	Human mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4, transcript variant	
DUSP22	NM_020185	1,36	1,19	1,27	Human dual specificity phosphatase 22, mRNA	
NR4A3	NM_173198	1,36	1,77	1,56	Human nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3, transcript variant 2	
Clorf150	NM_145278	1,35	1,43	1,38	Human chromosome 1 open reading frame 150	
EAF2	NM_018456	1,34	1,29	1,31	Human ELL associated factor 2	
GLA	NM_000169	1,34	1,28	1,31	Human galactosidase, alpha	

up in A, B, C

Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description
BCL2A1	NM_004049	1,33	1,94	1,64	Human BCL2-related protein A1
THC2662116	THC2662116	1,33	1,63	1,48	Q30181_HUMAN (Q30181) MHC class II HLA-SX-alpha gene.
YIPF1	NM_018982	1,32	1,24	1,28	Human Yip1 domain family, member 1
NCF2	NM_000433	1,31	1,11	1,21	Human neutrophil cytosolic factor 2, 65kDa, chronic granulomatous disease,
FST	NM_013409	1,31	1,80	1,56	Human follistatin, transcript variant FST344
IGFBP4	NM_001552	1,30	1,10	1,20	Human insulin-like growth factor binding protein 4
IFIH1	NM_022168	1,30	1,32	1,31	Human interferon induced with helicase C domain 1
PTGER4	NM_000958	1,30	1,20	1,25	Human prostaglandin E receptor 4 (subtype EP4)
EZH1	NM_001991	1,29	1,01	1,15	Human enhancer of zeste homolog 1 (Drosophila)
THC2757602	THC2757602	1,28	1,11	1,23	Unknown
HERC5	NM_016323	1,28	1,15	1,22	Human hect domain and RLD 5
IFIT3	NM_001549	1,27	1,34	1,30	Human interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3
CAB39L	NM_030925	1,26	1,10	1,18	Human calcium binding protein 39-like, transcript variant 1
IFNA21	NM_002175	1,26	5,05	3,15	Human interferon, alpha 21
RAREES3	NM_004585	1,26	1,69	1,48	Human retinoic acid receptor responder (tazarotene induced) 3
AK127768	AK127768	1,24	1,19	1,22	Human cDNA FLJ45869 fs, clone OCBBF3004908
LOC647131	XM_934407	1,24	1,66	1,45	PREDICTED: Human hypothetical LOC647131
MAP4K4	NM_145686	1,23	1,18	1,20	Human mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4, transcript variant
KLF6	NM_001300	1,23	1,03	1,13	Human Kruppel-like factor 6, transcript variant 2
HARS	NM_002109	1,22	1,07	1,14	Human histidyl-tRNA synthetase
CCL3L3	NM_001001437	1,21	1,22	1,21	Human chemokine (C-C motif) ligand 3-like 3
NFKBIA	NM_020529	1,21	1,14	1,17	Human nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibi-
IL28A	NM_172138	1,20	3,36	2,28	Human interleukin 28A (interferon, lambda 2)
PHF19	NM_001009936	1,20	1,36	1,28	Human PHD finger protein 19, transcript variant 2
MYO1E	NM_004998	1,19	1,17	1,18	Human myosin IE
MACF1	NM_033044	1,18	1,39	1,25	Human microtubule-actin crosslinking factor 1, transcript variant 2

up in A, B, C					
Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description
DND1	NM_194249	1,17	1,50	1,34	Human dead end homolog 1 (zebrafish)
PMAIP1	NM_021127	1,17	1,52	1,35	Human phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1
IFNA4	NM_021068	1,16	5,44	3,30	Human interferon, alpha 4
TOE1	NM_025077	1,16	1,13	1,15	Human target of EGFR1, member 1 (nuclear)
GPR171	NM_013308	1,16	1,15	1,16	Human G protein-coupled receptor 171
CXCL2	NM_002089	1,13	1,14	1,14	Human chemokine (C-X-C motif) ligand 2
THC2631248	THC2631248	1,12	1,90	1,38	Q7WVU3_ACTPL Collagen adhesin (Fragment), partial (5%)
TMPRSS13	NM_001077263	1,11	1,05	1,08	Human transmembrane protease, serine 13
AK124806	AK124806	1,10	1,07	1,09	Human cDNA FLJ42816 fs, clone BRCAN2014881.
AK123450	AK123450	1,05	1,66	1,26	Human cDNA FLJ41456 fs, clone BRSTN2012320.
ENST00000308604	ENST00000308604	1,01	1,69	1,35	LOC541471 protein (Hypothetical protein MGC4677)
HNRPC	NM_031314	1,01	1,08	1,05	Human heterogeneous nuclear ribonucleoprotein C (C1/C2), transcript variant 1
CCL3	NM_002983	1,01	1,63	1,32	Human chemokine (C-C motif) ligand 3

Tabelle 13: Herunterregulierte Gene der IFN- α -negativen Subpopulation im DNA-Oligonukleotid-Microarray.

A, B und C stehen für die zur Analyse- und Vergleichszwecken während des Verfahrens gebildeten Array-Gruppen. A = Array I und II, B = Array III und IV, C = Alle Arrays. n = 8 Spender. Die Werte der Gruppen A, B und C entsprechen der „log₂-fold differential expression“. Die aufgelisteten Gene stellen die Schnittmengen der Ergebnisse der Gruppen A und C dar.

down in A, C						
Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description	
SLC20A1	NM_005415	-3,40	-0,66	-2,03	Human solute carrier family 20 (phosphate transporter), member 1	
BCL11A	NM_022893	-3,31	-0,63	-1,97	Human B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein), transcript variant 1	
AK126405	AK126405	-3,21	-0,49	-1,85	Human cDNA FLJ44441 fis, clone UTERU2020242.	
ARL4C	NM_005737	-3,16	-0,39	-1,78	Human ADP-ribosylation factor-like 4C	
MRRPS6	NM_032476	-2,98	-0,74	-1,86	Human mitochondrial ribosomal protein S6, nuclear gene encoding mitochondrial protein	
THBD	NM_000361	-2,97	-0,63	-1,80	Human thrombomodulin	
RAC2	NM_002872	-2,96	-0,67	-1,81	Human ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	
TBC1D13	NM_018201	-2,93	-0,94	-1,94	Human TBC1 domain family, member 13	
THC2623335	THC2623335	-2,88	-0,59	-1,74	Unknown	
REPNI1	NM_014374	-2,81	-0,63	-1,72	Human replication initiator 1, transcript variant 2	
CD97	NM_078481	-2,79	-0,53	-1,66	Human CD97 molecule, transcript variant 1	
SLC15A4	NM_145648	-2,79	-0,84	-1,81	Human solute carrier family 15, member 4	
RAC2	NM_002872	-2,76	-0,77	-1,76	Human ras-related C3 botulinum toxin substrate 2 (rho family, small GTP binding protein Rac2)	
BU540282	BU540282	-2,74	-0,51	-1,63	AGENCOURT_10326456 NIH_MGC_141 Human cDNA clone IMAGE:6571686 5'	
TGFBR2	NM_001024847	-2,71	-0,54	-1,62	Human transforming growth factor, beta receptor II (70/80kDa), transcript variant 1	
SLC35F3	NM_173508	-2,65	-0,45	-1,55	Human solute carrier family 35, member F3	
CHSY1	NM_014918	-2,58	-0,46	-1,52	Human carbohydrate (chondroitin) synthase 1	
TCL1A	NM_021966	-2,56	-0,72	-1,64	Human T-cell leukemia/lymphoma 1A	
THC2563227	THC2563227	-2,56	-0,52	-1,54	CA312433 Human cDNA clone UI-CF-FN0-afk-i-18-0-UI 3'	
C15orf39	BC110367	-2,55	-0,33	-1,44	Human chromosome 15 open reading frame 39, cDNA clone MGC:117209	

down in A, C

Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description
THC2614148	THC2614148	-2,54	-0,35	-1,44	HumanAndrogen-regulated short-chain dehydrogenase/reductase 1 variant, partial (7%)
CSF1R	NM_005211	-2,52	-0,46	-1,49	Human colony stim. factor 1 receptor
RASSF2	NM_014737	-2,50	-0,54	-1,52	Human Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 2, transcript variant 1
BCL11A	NM_138553	-2,49	-0,53	-1,51	Human B-cell CLL/lymphoma 11A (zinc finger protein), transcript variant 5
HERPUDI1	NM_014685	-2,46	-0,97	-1,71	Human homocysteine-inducible, ubiquitin-like domain member 1
MKNK2	NM_017572	-2,42	-0,79	-1,60	Human MAP kinase interacting serine/threonine kinase 2, transcript variant 1
SMPD3	NM_018667	-2,38	-0,69	-1,54	Human sphingomyelin phosphodiesterase 3, neutral membrane (neutral sphingomyelinase II)
RARA	NM_001033603	-2,38	-0,56	-1,47	Human retinoic acid receptor, alpha
KLF13	NM_015995	-2,35	-0,51	-1,43	Human Kruppel-like factor 13
RASSF5	NM_182663	-2,33	-0,54	-1,43	Human Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 5, transcript variant 1
CLEC4A	NM_016184	-2,31	-0,27	-1,29	Human C-type lectin domain family 4, member A, transcript variant 1
MAPKAPK3	NM_004635	-2,28	-0,39	-1,34	Human mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3
TRIB1	NM_025195	-2,27	-0,37	-1,32	Human tribbles homolog 1 (Drosophila)
BC070363	BC070363	-2,25	-0,49	-1,37	Human cDNA clone IMAGE:3960708
CENTA2	NM_018404	-2,25	-0,52	-1,38	Human centaurin, alpha 2
PP1F	NM_005729	-2,24	-0,37	-1,31	Human peptidyl/prolyl isomerase F, nuclear gene encoding mitochondrial protein
SLC12A9	NM_020246	-2,22	-0,44	-1,33	Human solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 9
NFE2L3	NM_004289	-2,21	-0,49	-1,35	Human nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 3
C1orf38	BC031655	-2,20	-0,76	-1,48	Human chromosome 1 open reading frame 38, mRNA (cDNA clone IMAGE:5170350)
ACTG1	NM_001614	-2,16	-0,79	-1,47	Human actin, gamma 1
CXXC5	NM_016463	-2,16	-0,25	-1,20	Human CXXC finger 5
IFI30	NM_006332	-2,13	-0,35	-1,24	Human interferon, gamma-inducible protein 30
NDUFBV2	NM_021074	-2,11	-0,49	-1,30	Human NADH dehydrogenase (ubiquinone) flavoprotein 2, 24kDa
FAM129B	AF151783	-2,09	-0,19	-1,14	Human MEG3
PLAU	NM_002658	-2,07	-0,28	-1,17	Human plasminogen activator, urokinase

down in A, C

Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description
KCNJ5	NM_002234	-2,06	-0,34	-1,20	Human potassium voltage-gated channel, shaker-related subfamily, member 5
TREM2	NM_024807	-2,06	-0,46	-1,26	Human triggering receptor expressed on myeloid cells-like 2
SCRN1	NM_014766	-2,04	-0,28	-1,16	Human secernin 1
C20orf3	NM_020531	-2,04	-0,54	-1,29	Human chromosome 20 open reading frame 3
TMEM9B	NM_020644	-2,03	-0,44	-1,23	Human TMEM9 domain family, member B
PLAC8	NM_016619	-2,02	-0,66	-1,34	Human placenta-specific 8
NSF	NM_006178	-2,01	-0,39	-1,20	Human N-ethylmaleimide-sensitive factor
ACTG1	NM_001614	-2,01	-0,59	-1,30	Human actin, gamma 1
MRPS6	NM_032476	-2,00	-0,23	-1,11	Human mitochondrial ribosomal protein S6, nuclear gene encoding mitochondrial protein
CCND3	NM_001760	-2,00	-0,34	-1,17	Human cyclin D3
PTGIR	NM_000960	-1,99	-0,20	-1,09	Human prostaglandin I2 (prostaacyclin) receptor (IP)
MRPL19	NM_014763	-1,99	-0,38	-1,18	Human mitochondrial ribosomal protein L19, nuclear gene encoding mitochondrial
NADK	NM_023018	-1,97	-0,32	-1,14	Human NAD kinase
P2RY14	NM_014879	-1,94	-0,62	-1,28	Human purinergic receptor P2Y, G-protein coupled, 14
KIAA0247	NM_014734	-1,94	-0,39	-1,16	Human KIAA0247
ACTG1	NM_001614	-1,93	-0,51	-1,22	Human actin, gamma 1
CBX6	NM_014292	-1,93	-0,08	-1,00	Human chromobox homolog 6
RGS2	NM_002923	-1,91	-0,61	-1,26	Human regulator of G-protein signalling 2, 24kDa
C10orf61	NM_015631	-1,91	-0,31	-1,11	Human chromosome 10 open reading frame 61, transcript variant 2
TNFSF12	NM_003809	-1,90	-0,30	-1,10	Human tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 12
PLAC8	NM_016619	-1,90	-0,71	-1,31	Human placenta-specific 8
CSNK1E	NM_152221	-1,89	-0,48	-1,19	Human casein kinase 1, epsilon, transcript variant 1
PSCD1	NM_004762	-1,89	-0,54	-1,22	Human pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains 1, transcript variant 1
HBEGF	NM_001945	-1,89	-0,34	-1,12	Human heparin-binding EGF-like growth factor
PTPRE	NM_006504	-1,89	-0,32	-1,10	Human protein tyrosine phosphatase, receptor type, E (PTPRE)
ARHGAP30	NM_001025598	-1,88	-0,45	-1,17	Human Rho GTPase activating protein 30, transcript variant 1

down in A, C

Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description
SPIB	NM_003121	-1,87	-0,28	-1,08	Human Spi-B transcription factor (Spi-1/PU.1 related)
CENTA2	NM_018404	-1,85	-0,37	-1,11	Human centaurin, alpha 2
PTPRE	NM_006504	-1,85	-0,29	-1,07	Human protein tyrosine phosphatase, receptor type, E, transcript variant 1
NFKBIE	NM_004556	-1,85	-0,53	-1,19	Human nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells inhibitor, epsilon
SNX10	NM_013322	-1,84	-0,41	-1,13	Human sorting nexin 10
INPP5D	NM_001017915	-1,84	-0,28	-1,06	Human inositol polyphosphate-5-phosphatase, 145kDa, transcript variant 1
SYNGR2	BC105992	-1,83	-0,69	-1,26	Human synaptogyrin 2, mRNA (cDNA clone MGC:102914 IMAGE:4746277)
SNAPC4	NM_003086	-1,83	-0,29	-1,06	Human small nuclear RNA activating complex, polypeptide 4, 190kDa
TNFSF13B	NM_006573	-1,82	-0,36	-1,09	Human tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b
UGCG	NM_003358	-1,82	-0,47	-1,15	Human UDP-glucose ceramide glucosyltransferase
COMMD8	NM_017845	-1,82	-0,40	-1,11	Human COMMD domain containing 8
STK40	NM_032017	-1,80	-0,48	-1,14	Human serine/threonine kinase 40
C1orf38	NM_001039477	-1,80	-0,29	-1,04	Human chromosome 1 open reading frame 38, transcript variant 2
TLR7	NM_016562	-1,80	-0,67	-1,23	Human toll-like receptor 7
CAPN2	NM_001748	-1,80	-0,30	-1,05	Human calpain 2, (m/II) large subunit
COMMD3	NM_012071	-1,79	-0,35	-1,07	Human COMMD domain containing 3
DUSP6	NM_001946	-1,79	-0,57	-1,18	Human dual specificity phosphatase 6 (DUSP6), transcript variant 1
DGKD	NM_152879	-1,79	-0,44	-1,11	Human diacylglycerol kinase, delta 130kDa, transcript variant 2
F11R	NM_144503	-1,78	-0,49	-1,13	Human F11 receptor, transcript variant 4
POLR2G	NM_002696	-1,78	-0,24	-1,01	Human polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G
ELAC2	NM_018127	-1,77	-0,40	-1,09	Human elac homolog 2 (E. coli)
STAMBPL1	NM_020799	-1,75	-0,44	-1,10	Human STAM binding protein-like 1
HADH	NM_005327	-1,75	-0,34	-1,04	Human hydroxyacyl-Coenzyme A dehydrogenase, nuclear gene encoding mitochondrial protein
AK026351	AK026351	-1,74	-0,31	-1,03	Human cDNA: FLJ22698 fs, clone HSH12044.
ADAM8	NM_001109	-1,74	-0,71	-1,23	Human ADAM metalloproteinase domain 8

down in A, C					
Gene Symbol	RefSeq-ID	A	B	C	Description
CTSZ	NM_001336	-1,73	-0,49	-1,11	Human cathepsin Z
SNUPN	NM_005701	-1,73	-0,30	-1,02	Human snurportin 1, transcript variant 1
ENDOG	NM_004435	-1,72	-0,45	-1,08	Human endonuclease G, nuclear gene encoding mitochondrial protein
PIGY	NM_001042616	-1,71	-0,32	-1,02	Human phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class Y, transcript variant 2
PAG1	NM_018440	-1,71	-0,40	-1,05	Human phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1
SLC7A5	NM_003486	-1,69	-0,45	-1,07	Human solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y ⁺ system), member
CCDC28A	NM_015439	-1,69	-0,42	-1,06	Human coiled-coil domain containing 28A
PSCDBP	NM_004288	-1,69	-0,36	-1,02	Human pleckstrin homology, Sec7 and coiled-coil domains, binding protein
B3GNT5	NM_032047	-1,67	-0,39	-1,03	Human UDP-GlcNAc:betaGal beta-1,3-N-acetylgalucosaminyltransferase 5
FLJ21438	AK024488	-1,65	-0,48	-1,07	Human mRNA for FLJ00087 protein
GLT1D1	NM_144669	-1,65	-0,38	-1,02	Human glycosyltransferase 1 domain containing 1
PPP1R16B	NM_015568	-1,65	-0,52	-1,08	Human protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 16B
TOR3A	NM_022371	-1,65	-0,40	-1,02	Human torsin family 3, member A
C22orf5	NM_012264	-1,64	-0,38	-1,01	Human chromosome 22 open reading frame 5
GNG10	NM_001017998	-1,62	-0,48	-1,05	Human guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 10
FBXO9	NM_033480	-1,62	-0,43	-1,02	Human F-box protein 9, transcript variant 2
GTF2I	NM_032999	-1,62	-0,42	-1,02	Human general transcription factor II, i, transcript variant 1
CD2	NM_001767	-1,61	-0,44	-1,03	Human CD2 molecule
IRF2BP2	NM_182972	-1,61	-0,70	-1,15	Human interferon regulatory factor 2 binding protein 2, transcript variant 1
CLIC4	NM_013943	-1,60	-0,43	-1,02	Human chloride intracellular channel 4
TGFBI	NM_000358	-1,53	-0,61	-1,07	Human transforming growth factor, beta-induced, 68kDa
SNX2	NM_003100	-1,49	-0,53	-1,01	Human sorting nexin 2
PAG1	NM_018440	-1,42	-0,70	-1,06	Human phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1
MX2	NM_002463	-1,35	-0,66	-1,00	Human myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)

Publikationsverzeichnis

Sapski S, Schneider L, Wilhelm J, Michel G, Bein G, Baal N, Hackstein H, (2013)

Identification of Interferon- α high and low expressing human plasmacytoid dendritic cells subsets exhibiting distinct functional characteristics. Abstract als Vortrag in der Rubrik: Zelltherapie und Gewebe I der 46. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V.

Ehrenwörtliche Erklärung

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Gießen, den 24. Juni 2013

Linda Schneider

Unterschrift

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. med. Holger Hackstein, für die Vergabe dieses interessanten Themas sowie für die Unterstützung während des gesamten Projektes danken.

Besonderer Dank gilt den Medizinisch Technischen Assistenten, v.a. Frau Gabriela Michel sowie Herrn Andreas Wachtendorf und Frau Angelika Nocker, die mir während der gesamten Arbeit stets tatkräftig und unterstützend zur Seite gestanden haben. Ohne deren Mitarbeit und Betreuung wäre die Durchführung und Umsetzung dieses Projektes nicht realisierbar gewesen. Für die Unterstützung bei der Erstellung einzelner Grafiken danke ich Frau Dr. Nelli Baal. Besonderer Dank gilt auch Herrn Dr. Jochen Wilhelm, der die Durchführung und Auswertung des *DNA-Oligonukleotid-Microarray-Experiments* übernommen hat. Ich bedanke mich für die Sachmittelförderung des Projekts mit dem Titel: „Identifikation einer neuen Subpopulation plasmacytoider dendritischer Zellen“ – Förderung Nachwuchswissenschaftlerin durch die Deutsche Gesellschaft für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie e.V. (DGTI).

Darüber hinaus danke ich meinem Mann, Herrn Sebastian Oliver Schneider, für seine Unterstützung bei der Erstellung der Grafiken und Korrekturen.



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6117-3



9 17 8 3 8 3 5 19 6 1 1 7 3 1