

**EINFLUSS VON NEUROTROPHINEN
AUF PHAGOZYTOSE UND CHEMOKIN
REZEPTOR EXPRESSION
DENDRITISCHER ZELLEN**

INGRID CHRIST

INAUGURAL-DISSERTATION

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

**édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

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 2007

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 2007

© 2007 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

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

www.doktorverlag.de

Einfluss von Neurotrophinen auf Phagozytose und Chemokin Rezeptor Expression Dendritischer Zellen

Inaugural-Dissertation

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

vorgelegt von

Ingrid Christ, geb. Hamp

aus Hof

Gießen, 2007

Aus dem Medizinischen Zentrum für Innere Medizin

Medizinische Klinik IV,

Abteilung Hämatologie und Onkologie

Leiter: Prof. Dr. Pralle, des Klinikums der Justus-Liebig Universität Gießen

Gutachter: PD Dr. Kabisch

Gutachter: Prof. Dr. Meinhardt

Tag der Disputation: 11.09.2007

Meinem lieben Mann und meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1. <u>Einleitung</u>	S.1
2. <u>Theoretische Grundlagen</u>	S.3
2.1 Dendritische Zellen	S.3
2.1.1 Definition	S.3
2.1.2 Entwicklungsweg	S.3
2.1.3 Wirkung und Aufgaben	S.5
2.1.4 Die morphologische Struktur	S.6
2.1.5 Therapeutische Ansätze	S.7
2.2 Zytokine	S.8
2.2.1 Allgemein	S.8
2.2.2 Granulozyten Makrophagen Kolonie Stimulierender Faktor	S.8
2.2.3 Interleukin-4	S.9
2.2.4 Tumor Nekrose Faktor- α	S.9
2.2.5 Einfluss der Zytokine auf Dendritische Zellen	S.9
2.3 Neurotrophine und ihre Rezeptoren	S.10
2.3.1 Nerve Growth-Factor	S.10
2.3.2 Brain Derived Neurotrophic Factor	S.10
2.3.3 Neurotrophin-3	S.10
2.3.4 Neurotrophin-4	S.11
2.3.5 Die Rezeptoren für Neurotrophine	S.11
2.3.5.1 Allgemein	S.11
2.3.5.2 Die Funktion im neurologischen System	S.11
2.3.5.3 Die Funktion auf hämatopoietische Zellen	S.12
2.3.5.4 Die molekulare Struktur	S.12
2.4 Chemokine	S.13
2.4.1 Allgemein	S.13
2.4.2 CC-Chemokine	S.13
2.4.3 CXC-Chemokine	S.14
2.4.4 C-Chemokine	S.14
2.4.5 Der Einfluss von Chemokinen auf Dendritische Zellen	S.15
3. <u>Zielsetzung</u>	S.17
4. <u>Hilfsmittel</u>	S.18
4.1 Material und Geräte	S.18
4.2 Reagenzien	S.21
4.3 Zelllinien	S.25
4.4 Lösungen	S.25
4.5 PCR-Primersequenzen	S.26

<u>5. Methoden</u>	S.28
5.1 Isolierung von Monozyten	S.28
5.1.1 Herstellung der Kulturflaschen	S.28
5.1.2 Verarbeitung der Buffycoats	S.28
5.2 Kultivierung der Zellen	S.29
5.3 RNA-Isolierung aus mononukleären Zellen	S.29
5.4 Polymerase Ketten Reaktion	S.30
5.4.1 Reverse Transkription	S.31
5.4.2 β -Actin PCR	S.31
5.4.3 TRK-PCR	S.32
5.5 Agarose-Gel-Elektrophorese	S.33
5.6 Durchflusszytometrie	S.33
5.7 Stimulierung Dendritischer Zellen mit Neurotrophinen	S.36
5.8 Phagozytostest	S.36
5.8.1 Nachweis der Phagozytose auf Chamberslides	S.36
5.8.2 Quantitativer Phagozytosenachweis im FACScan	S.36
5.9 RNase Protection Assay	S.37
<u>6. Ergebnisse</u>	S.38
6.1 Definition der Dendritischen Zellen durch ihre Oberflächenmarker	S.38
6.2 Nachweis der m-RNA für die Rezeptoren der Neurotrophine	S.43
6.3 Stimulation der Dendritischen Zellen mit Neurotrophinen	S.46
6.4 Nachweis der Phagozytosefähigkeit der Dendritischen Zellen	S.50
6.4.1 Qualitativer Phagozytosenachweis auf Chamberslides	S.50
6.4.2 Quantitativer Nachweis der Phagozytose im FACS und deren Veränderung nach Stimulation mit NGF	S.51
6.5 Nachweis von Chemokinrezeptoren im RNase Protection Assay	S.55
<u>7. Diskussion</u>	S.59
<u>8. Zusammenfassung</u>	S.66
<u>9. Abkürzungsverzeichnis</u>	S.68
<u>10. Literaturverzeichnis</u>	S.69

1. Einleitung

Das Immunsystem ist zusammen mit Haut und Schleimhäuten der wichtigste Abwehrmechanismus des Menschen gegen verschiedene pathogene Einflüsse auf den Körper. Es verhindert nicht nur exogene und das erneute Aufflackern endogener Infektionen, sondern bildet auch, besonders über den so genannten zellulären Teil des Immunsystems, in Form der T-Lymphozyten, einen Schutz gegen maligne Erkrankungen.

Ein Eingriff in dieses System im Sinne einer verbesserten oder spezifischeren Wirkung könnte als selbständige bzw. adjuvante Therapie bei vielen Krankheiten hilfreich sein.

Mit diesem Ziel werden in den letzten Jahren zunehmend Dendritische Zellen, eine Zellpopulation, die sich durch Phagozytose und Antigen-Präsentation auszeichnet, untersucht. Sie wurden erstmals 1973 von Steinmann beschrieben¹ und erhielten ihren Namen durch ihre ungewöhnliche Form: Unter dem Mikroskop zeigen sie Ast-ähnliche Ausläufer (= Dendriten).

Es stellte sich heraus, dass Dendritische Zellen als Verbindungsglied der unspezifischen (in Form der Phagozytose) und der spezifischen (durch Antigen-Präsentation und Aktivierung von B- und T-Lymphozyten) Immunabwehr dienen² und damit für die Funktion des menschlichen Abwehrsystems eine entscheidende Bedeutung haben. Durch diese Zellen können wir vielleicht in Zukunft regulierend in das Immunsystem eingreifen und dem Körper helfen Krankheitserreger oder Krebszellen effektiver zu bekämpfen.

Dendritische Zellen können durch Isolierung aus Blut oder Knochenmark, Sensibilisierung auf den pathogenen Fokus und Rückgabe an den Körper zu einem wichtigen Bestandteil in der Therapie werden.

Besonders im Bereich der Onkologie laufen bereits zahlreiche klinische Phase-I- und Phase-II-Studien mit diesen Zellen.

Eine Einflussnahme auf Dendritische Zellen, z.B. in Form einer Verbesserung der Phagozytosefähigkeit oder einer Beschleunigung der Migration in die sekundären Lymphorgane, könnte eine Verbesserung der Therapie mit Dendritischen Zellen bewirken.

Möglichkeiten einer Einflussnahme auf einige „Funktionen“ dieser Zellen sollen in dieser Arbeit überprüft werden.

Als Einflussfaktoren wurden verschiedene Neurotrophine getestet. Besonderes Augenmerk wurde auf den Nerve Growth Factor (NGF) gerichtet, für den, über den TRKA-Rezeptor, auch auf andere Zellen des Immunsystems eine spezifische Wirkung nachgewiesen werden konnte.

Als „Funktionen“ wurden die Phagozytosefähigkeit und die Expression von verschiedenen Chemokinrezeptoren, die für das Migrationsverhalten der Zellen zuständig sind, überprüft.

2. Theoretische Grundlagen

2.1 Dendritische Zellen

2.1.1 Definition

Dendritische Zellen stellen eine sehr heterogene Zellpopulation dar, die aus pluripotenten CD34⁺ Stammzellen im Knochenmark entstehen.

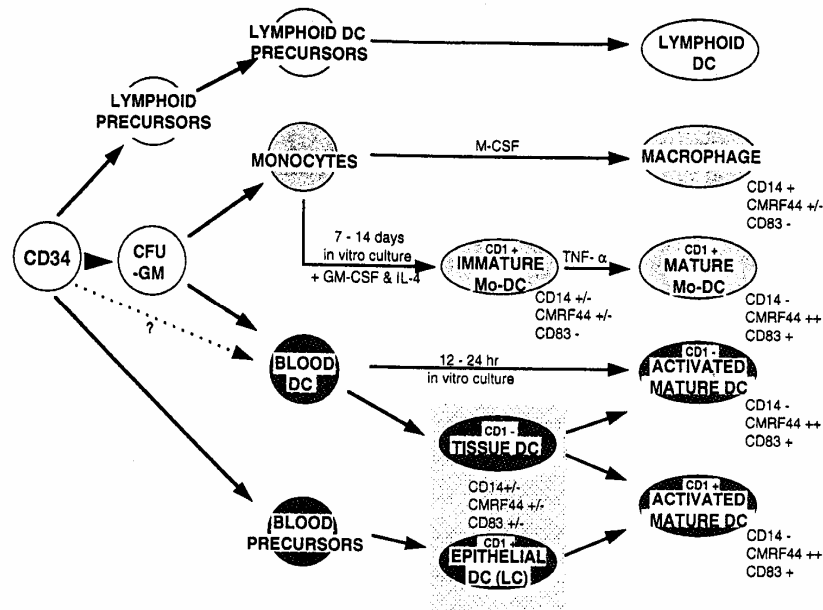
Gemeinsam und damit entscheidend für die Definition sind diesen Zellen bestimmte Oberflächenmarker, z.B.: CD83, CD11a, CD11c, CD80 und CD86 bzw. das Fehlen von Zelllinien-Markern wie CD14 (Monozytenmarker) und CD8 (T-Zellmarker) sowie die starke Potenz zur Aufnahme und Präsentation von Antigenen³.

2.1.2 Entwicklungsweg

Die Dendritischen Zellen können sich auf verschiedenen Wegen aus CD34⁺ Stammzellen entwickeln, abhängig davon, welche Aufgabe im Organismus sie zu erfüllen haben. Die Fig. 1 aus³ stellt einige Möglichkeiten dar. Der Entwicklungsschritt über Monozyten, der in vivo vermutlich nur eine geringere Rolle spielt, wurde in dieser Arbeit zur Gewinnung unreifer Dendritischer Zellen verwendet, da Monozyten relativ leicht in großer Menge aus Buffy Coats zu gewinnen sind und sich in Kultur zu Dendritischen Zellen entwickeln können.

Die Vorläufer der Dendritischen Zellen werden vom Knochenmark in das Blut abgegeben. Hier stellen sie etwa 1-3% der mononukleären Zellen⁴ und wandern von dort in verschiedene Gewebe ein, z.B. in die Haut als Langerhans'sche Zellen^{5,6}, in denen sie als residente „Wächter“ ruhen, um bei einem entsprechenden Reiz ihre Aufgaben im Abwehrsystem zu erfüllen. Ein kleiner Teil der Dendritischen Zellen wandert auch als eine Art lymphoide Dendritische Zelle in sekundäre Lymphorgane ein, um dort z. B. autoaggressive T-Zellen zu eliminieren.

Einige mögliche Entwicklungswege Dendritischer Zellen

Fig. 1: Entwicklungswege Dendritischer Zellen³

Dendritische Zellen unterteilt man heute in drei Stadien der Entwicklung mit unterschiedlichen Aufgaben. Die Zellen außerhalb der sekundären Lymphorgane sind **unreife** Dendritische Zellen, die Antigene aufnehmen, jedoch nicht präsentieren können. Diese Antigen-Aufnahme bewirkt zusammen mit dem Einwirken bestimmter Zytokine und Mediatoren den Stimulus zur Ausreifung. Diese Zytokine und Mediatoren werden in entzündeten Geweben z.B. von Endothelzellen, aber auch von den Dendritischen Zellen selbst ausgeschüttet^{7,8}. **Reifende** Dendritische Zellen migrieren in die Lymphknoten und stimulieren dort als **reife** Zellen eine starke T-Zell-^{9,10} und B-Zell-^{11,12} Proliferation, sensibilisiert auf das eingedrungene Antigen. Hierbei kann eine einzige Dendritische Zelle 100 bis 1000 T-Zellen stimulieren³. Dies stellt die Verbindung von unspezifischer und spezifischer Immunabwehr dar.

2.1.3 Wirkung und Aufgaben der Dendritischen Zellen

Unreife Dendritische Zellen wandern, gesteuert durch Entzündungsmediatoren, wie Interleukin-8 oder Tumor Nekrose Faktor (TNF), Bakterienbestandteile oder abgespaltene Komplement-Anteile, wie C5a,^{13,14} in entzündetes Gewebe ein und akkumulieren dort^{15,16}. Hier nehmen sie Antigene auf. Diese Aufnahme kann auf verschiedenen Wegen geschehen: durch Phagozytose^{17,18,19}, durch Makropinozytose²⁰ oder durch rezeptor-gesteuerte adsorptive Endozytose¹⁷. Nach der Aufnahme von Antigenen reifen die Dendritischen Zellen und migrieren in sekundäre Lymphorgane wie Milz, Lymphknoten oder Peyersche Plaques²¹. Diese Wanderung wird wiederum von Zytokinen und Chemokinen gesteuert, was durch einen „Switch“ in der Expression von Chemokin-Rezeptoren an der Oberfläche während des Reifungsvorganges ermöglicht wird²². Unreife Dendritische Zellen exprimieren zum Beispiel CCR1 und CCR5. Beides sind Rezeptoren für Zytokine, die in entzündetem Gewebe gebildet werden. Diese Rezeptoren werden im Verlauf der Reifung reduziert und es kommt zu einer stark vermehrten Expression des Rezeptors CCR7, dessen Ligand Makrophage Inflammatory Protein-3 β in sekundären Lymphorganen wie Lymphknoten, Milz oder Thymus produziert wird. Hierdurch kommt es zu der Migration aus dem entzündeten Gewebe zu den sekundären Lymphorganen. In den Lymphknoten präsentieren sie die Antigene mithilfe von „major histocompatibility complex-Molekülen“ (MHC) der Klasse MHC I und MHC II den Lymphozyten²³ und aktivieren diese durch die Ausschüttung bestimmter Zytokine, zum Beispiel Interleukin-1²⁴, Interleukin-6²⁵ und Interleukin-12²⁶ zur Proliferation .

Eine weitere Aufgabe der Dendritischen Zellen ist die Entwicklung der Toleranz von T-Zellen gegenüber körpereigenen Antigenen. Dazu präsentieren sie im Thymus, in dem die zentrale Toleranzentwicklung durch Apoptose von sich entwickelnden körpereigenen reaktiven T-Zellen stattfindet, körpereigene Antigene²⁷.

2.1.4 Die morphologische Struktur der Dendritischen Zellen

Unreife Dendritische Zellen sind große gelappte Zellen, deren lange schmale Ausläufer (Dendriten) sich elektronenmikroskopisch segelförmig darstellen (s. Fig. 2)²⁸.

Intracellulär befinden sich ein großer irregulär geformter Zellkern, auffallend viele Mitochondrien und Vesikel, jedoch wenige cytoplasmatische Granula²⁹.

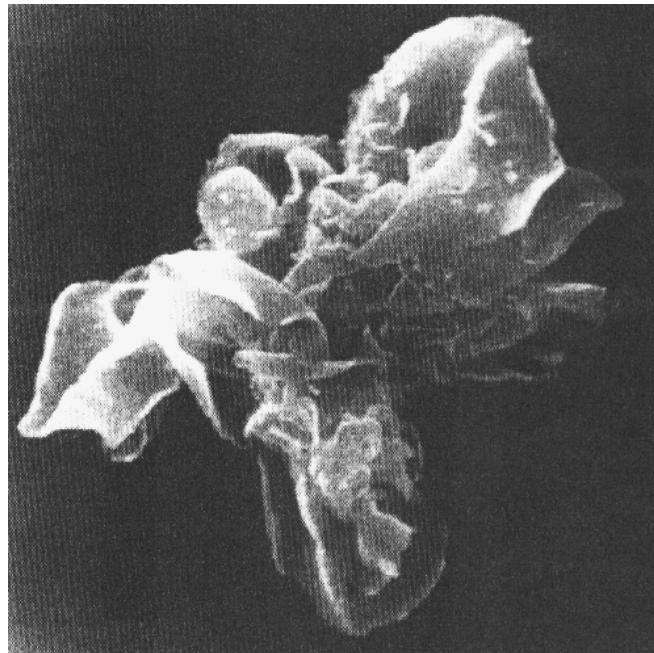


Fig. 2: Form einer Dendritischen Zelle unter dem Elektronenmikroskop²⁸

Reife und unreife Dendritische Zellen unterscheiden sich nicht nur in ihrer Fähigkeit zur Antigenaufnahme und -expression sowie in ihrem Migrationsverhalten, sondern auch in einigen weiteren Punkten.

Nach C. Winzler et al. gibt es drei funktionelle und morphologische Reifungsstadien:

Stadium eins zeigt eine deutliche Proliferationsrate, die typische dendritische Morphologie, organisierte Actinfilamente mit Adhensions-Plaques, cytoplasmatische Lokalisation der MHC Klasse II Moleküle und eine niedrige Expression von costimulierenden Proteinen.

Stadium zwei geht einher mit einer niedrigeren Proliferationsrate, mit einer Verlängerung der Zellausläufer, einer Depolimerisierung der Actinfilamente mit einem Verlust der Adhensions-Plaques, einer verstärkten Expression der MCH Klasse II und costimulierenden Molekülen auf der Zelloberfläche.

Das Stadium drei beinhaltet die Beendigung der Proliferation und Apoptose der Zellen³⁰.

Fig. 3 und 4 zeigen unreife und reife Dendritische Zellen in Kultur. Die Farbe der Abbildungen entsteht durch das Kulturmedium sowie die Präparation der Zellen.

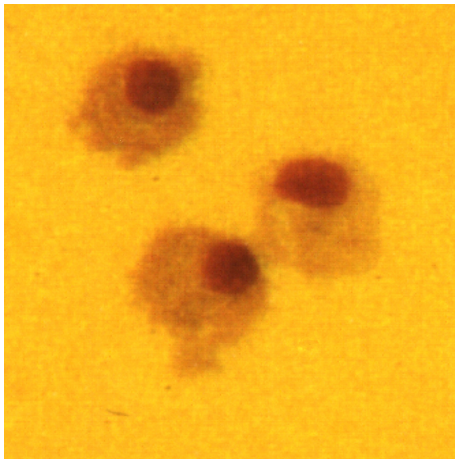


Fig. 3: unreife Dendritische Zellen in Kultur

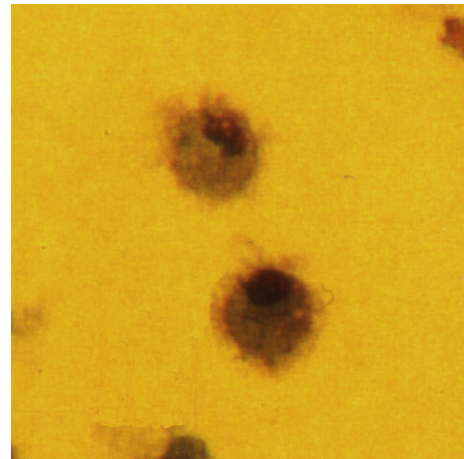


Fig. 4: reife Dendritische Zellen in Kultur

2.1.5 Therapeutische Ansätze mit Dendritischen Zellen

Dendritische Zellen haben ein sehr großes therapeutisches Spektrum.

Im Bereich der Forschung liegt der Focus derzeit auf der palliativen Onkologie.

Hier werden Dendritische Zellen auf verschiedene Weise in vitro auf Tumorzellen sensibilisiert und lösen in vivo eine Immunantwort der zytotoxischen CD8⁺ T-Lymphozyten aus. Die

Sensibilisierung kann erfolgen durch Peptide³¹, zelluläre Bestandteile der Tumorzellen³², apoptotische Zellen³³ oder gereinigte Proteine^{34, 35}.

Das größte Problem bei der Sensibilisierung ist das Vorhandensein tumorspezifischer Antigene, die den Dendritischen Zellen präsentiert werden können. Duane und Mitchell beschreiben, dass die RNA-Transfektion der Dendritischen Zellen mit RNA aus körpereigenen Tumorzellen die effektivste Methode sei³⁶.

Erfolgreich konnten Dendritische Zellen bereits bei der Behandlung von Melanomen³⁷, bei Ovarialkarzinomen³⁸, bei Prostatakarzinomen³⁹, Leukämie⁴⁰ sowie bei Mamma- und Bronchialkarzinomen⁴¹ eingesetzt werden. Bei einer Vielzahl weiterer Malignome laufen Versuche diese Immuntherapie in das Behandlungsschema einzubeziehen. Die Erfolge zeigten sich bisher jedoch oft nur von kurzer Dauer, da die Tumorzellen sich durch Veränderung der Oberflächenmoleküle (z. B. verminderte Expression von MHC Klasse II Molekülen) dem immunologischen Zugriff entziehen können.

Andere Gebiete, auf dem Dendritische Zellen versuchsweise eingesetzt werden, sind zum Beispiel die HIV-Infektion⁴², die Tuberkulose⁴³ und die Transplantationsmedizin⁴⁴.

2.2 Zytokine

2.2.1 Allgemein

Zytokine sind Mediatorsubstanzen, die zelluläre Interaktionen vermitteln. Sie werden hauptsächlich von Leukozyten und neuroektodermalen Zellen sezerniert. Es sind Proteine mit niedrigem Molekulargewicht (15-25 kDa) und kurzer Halbwertszeit, die auf Steuerung, Dauer und Stärke einer Immunreaktion Einfluss nehmen. Sie wirken aber auch als Botenmoleküle auf Wachstum, Differenzierung und Funktion von Immunzellen.⁴⁵

2.2.2 Granulozyten Makrophagen Kolonie stimulierender Faktor (GM-CSF)

GM-CSF besteht aus 127 Aminosäuren und wird unter anderem von T-Zellen und Makrophagen sezerniert. Er beeinflusst rezeptorvermittelt myeloide Zellen. Dadurch stimuliert er das Wachstum und die weitere Differenzierung von Granulozyten- und Makrophagen-

Progenitorzellen. Er wirkt jedoch auch, synergistisch mit weiteren Zytokinen (v.a. Erythropoetin), auf die Proliferation von erythroiden und megakaryozytären Vorläuferzellen.

Auf neutrophile Zellen wirkt er chemotaktisch und verbessert ihre mikrobizide und phagozytotische Aktivität.⁴⁶

In dieser Arbeit wurde GM-CSF dazu verwendet die Differenzierung der Monozyten zu Dendritischen Zellen zu aktivieren.

2.2.3 Interleukin-4 (IL-4)

IL-4 besteht aus 120 Aminosäuren und wird vor allem von einer Subpopulation aktivierter CD4⁺-Helfer-Zellen synthetisiert. Es wirkt über seinen Rezeptor z.B. auf die Differenzierung von aktivierten B-Zellen und verstärkt auf ihnen die Expression von MHC Klasse-II Antigenen. Hierdurch wird die klonale Expansion von spezifischen B-Zellen unterstützt⁴⁷.

In dieser Arbeit wurde IL-4 in Kombination mit GM-CSF zur Differenzierung der Dendritischen Zellen aus Monozyten benutzt.

2.2.4 Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α)

TNF- α , mit einer Länge von 157 Aminosäuren, wird unter anderem von Makrophagen, T-Zellen und Natürlichen Killer-Zellen (NK-Zellen) nach Stimulation durch Lipopolysaccharide sezerniert. Es wirkt über einen membranständigen Rezeptor auf sehr viele Zellgruppen. In vitro verursacht es eine Zytolyse oder Zytostase vieler Tumorzelllinien. Es verstärkt die Phagozytose und Zytotoxizität von polymorphkernigen Neutrophilen und wirkt chemotaktisch auf immunkompetente Zellen. TNF- α ist durch seine vielfältigen Wirkungen für die normale Immunantwort notwendig. Eine übermäßige Sekretion führt jedoch zu pathogenen Effekten (z.B. Kachexie bei Tumorpatienten)⁴⁷.

In dieser Arbeit bewirkte TNF- α die Ausreifung der Dendritischen Zellen.

2.2.5 Einfluss der Zytokine auf Dendritische Zellen

Dendritische Zellen können durch den Einfluss von Zytokinen aus CD14⁺- Monozyten, die aus peripherem Blut isoliert wurden, entstehen. Sie zeigen nach ihrer Entwicklung die gleiche Morphologie und die gleichen funktionellen Eigenschaften wie direkt aus Blut isolierte Dendritische Zellen^{27,47}.

Durch die Zugabe von IL-4 wird die Differenzierung in Gang gesetzt, erkennbar an einem Rückgang der Expression von CD14 auf der Zelloberfläche. Dieser Effekt benötigt jedoch die

gleichzeitige Anwesenheit von GM-CSF⁴⁸. Monozyten, die mit diesen beiden Zytokinen kultiviert werden, kommen in ein Intermediär-Stadium, in dem sie als „unreife Dendritische Zellen“ bezeichnet werden. Durch die Zugabe von z.B. TNF- α ⁴⁹ oder Monozytenüberstand⁵⁰ „reifen“ die Zellen aus. Dieser Effekt kann auch durch die Zugabe von Epithelzellen oder durch die Anregung der Phagozytose-Tätigkeit zum Beispiel durch LPS erreicht werden. Einige Autoren beschreiben eine Verstärkung des Effekts durch Interferon- γ , Interleukin-3 oder Interleukin-10⁵¹.

Monozyten, die nur mit IL-4 und GM-CSF kultiviert werden, verlieren in den ersten zwei Tagen ihre Plastikadhärenz und bilden am dritten Tag lichtmikroskopisch sichtbare Ausläufer, während die Zugabe von TNF- α die Adhärenz verstärkt und zu einer eher langgestreckten Form führt.

2.3 Neurotrophine und ihre Rezeptoren

2.3.1 Nerve Growth Factor (NGF)

NGF ist ein Peptid und wird z. B. in der Schilddrüse, dem Hypothalamus und der Hypophyse synthetisiert⁴⁷. Er stimuliert die Zielzellen über den TRK A Rezeptor und den p75^{LNGFR} (s.2.3.5). Über diese Rezeptoren bewirkt er die in 2.3.5 beschriebenen Aufgaben an neurologischen und hämatopoietischen Zellen.

2.3.2 Brain-derived neurotrophic factor (BDNF)

BDNF ist, ebenso wie NGF, mit dem es auch strukturelle Ähnlichkeit zeigt, ein neurotropher Faktor. Es wirkt über den Rezeptor TRK B und unterstützt zum Beispiel selektiv das Überleben von sensorischen Neuronen der Retina. Da der Rezeptor für BDNF auch auf myeloiden und lymphatischen Zellen vorhanden ist, wird auch eine immunologische Wirkung vermutet⁵².

2.3.3 Neurotrophin-3 (NT-3)

NT-3 hat eine Länge von 119 Aminosäuren und vermittelt seine neurotrophe Wirkung über den TRK C Rezeptor⁴⁷.

2.3.4 Neurotrophin-4 (NT-4)

NT-4 hat starke Ähnlichkeit mit NT-3 und wirkt ebenfalls neurotroph über den TRK B Rezeptor⁴⁷.

Sowohl TRK C als auch TRK B sind auf myeloiden und lymphatischen Zellen vorhanden, so dass auch NT-4 und NT-3 eine immunologische Rolle zukommen könnte.

2.3.5 Die Rezeptoren für Neurotrophine

2.3.5.1 Allgemein

Heute sind vier verschiedene Rezeptoren für Neurotrophine bekannt, die zur Familie der Tyrosinkinase Rezeptoren gehören. Dabei handelt es sich um TRK (tropomyosin receptor kinase) A, TRK B, TRK C und p⁷⁵^{LNGFR}, wobei es für TRK B und TRK C zwei verschiedene Varianten gibt, eine Tyrosin-Kinase positive und eine negative^{53,54}, die vermutlich keine katalytische Aktivität besitzt⁵⁵.

Sie wurden zunächst im Nervensystem, sowohl zentral als auch peripher, entdeckt. Dort sind sie, aktiviert durch ihre Liganden, verantwortlich für das Wachstum, die Differenzierung und das Überleben von Nervenzellen⁵⁶.

Aktiviert werden sie durch unterschiedliche Neurotrophine:

Nerve Growth Factor (NGF) stimuliert TRK A^{57,58}

Neurotrophin-4 (NT-4) und Brain Derived Neurotrophic Factor (BDNF) aktivieren TRK B^{59,60}

Neurotrophin-3 (NT-3) ist für die Aktivität von TRK C verantwortlich⁶¹.

Diese Mediatoren sind nicht absolut spezifisch, haben jedoch die jeweils stärkste Bindungskapazität zu den ihnen zugeordneten Rezeptoren.

Außerdem sind diese Rezeptoren auch auf nicht-neuronalen Zellen vorhanden, zum Beispiel auf Monozyten^{62,63}, auf Mastzellen⁶⁴ und auf B- oder T-Zell-Klonen^{65,66}.

2.3.5.2 Die Funktion im neurologischen System

TRK A ist an sympathischen Neuronen für die Nozizeption und die Temperaturbeurteilung zuständig.

TRK B, besonders stark auf den Hirnnerven vertreten, steuert die Nahrungsaufnahme, den Geruchssinn und die motorischen Funktionen des Nervus facialis.

TRK C ist für die Propriozeption über die Ia-Afferenzen verantwortlich.

Diese Funktionen wurden an Mäusen erforscht, denen der jeweilige Rezeptor fehlte⁶⁷.

2.3.5.3 Die Funktion auf hämatopoietischen Zellen

Zusätzlich zu der Wirkung auf Nervenzellen konnten für die Neurotrophine auch Effekte auf das immunologische und hämatopoietische System nachgewiesen werden. Besonders erforscht ist hier der Nerve Growth Factor der eine Proliferation von B-Zellen^{68,69}, zusammen mit einer verstärkten Produktion von IgM, IgA und IgG⁷⁰ bewirkt. Ebenfalls bewirkt er die Proliferation von T-Zellen⁵⁰ und deren Expression von IL-2-Rezeptoren⁷¹. Bei Thrombozyten bewirkt er eine Formveränderung⁷² und er fördert die Entwicklung und die Degranulation von Mastzellen⁷³.

Interessant für diese Arbeit ist die Wirkung von NGF über den TRK A Rezeptor auf Makrophagen. Hier bewirkt NGF eine Triggerung der Phagozytose und damit eine Verstärkung der Abwehr gegen Parasiten sowie die Aktivierung der Interleukin1 β -Produktion. Es wurde nachgewiesen, dass verschiedene inflammatorisch wirksame Substanzen die Expression von TRK A auf der Oberfläche von Mastzellen verstärken⁷⁴. Zudem stimuliert NGF die Chemotaxis von polymorphkernigen Zellen⁷⁵.

Die Expression von TRK B konnte auf Thymozyten während der Entwicklung sowie auf eosinophilen Metamyelozyten belegt werden⁷⁶.

TRK C soll durch NT-3 eine Differenzierung der Megakaryozyten bewirken⁷⁷, außerdem ist es auf (Pro-) Myelozyten vorhanden.

2.3.5.4 Die molekulare Struktur

Bei allen Rezeptoren handelt es sich um Tyrosin Kinase Rezeptoren. Dies bedeutet, dass durch die Bindung des Liganden zunächst eine Konformationsänderung einsetzt, in diesem Fall durch eine Dimerisierung zweier einzelner Rezeptoren. Dadurch kommt es zu einem „Auffalten“ des cytosolischen Bereichs, an dem dann eine Autophosphorylierung stattfindet, wodurch wiederum das Zielprotein phosphoryliert wird. Hierdurch wird die katalytische Funktion in Gang gesetzt⁷⁸.

TRK A beinhaltet zwei Tyrosin Kinase Isoformen; eine enthält 790, die andere 796 Aminosäuren. Der Rezeptor besteht aus einem Signalpeptid, gefolgt von einer Ektodomaine, die für die

Interaktion mit NGF verantwortlich ist. Eine transmembranöse Domäne verbindet den äußeren Teil mit der zytoplasmatischen Region, welche die katalytische Funktion hat⁷⁹.

Als TRK B werden mindestens zwei verschiedene Klassen von Rezeptoren bezeichnet^{80,81,82}. Eine davon, TRK B^{TK+}, besteht aus 821 Aminosäuren und enthält alle entscheidenden Bereiche des Tyrosin Kinase Rezeptors. Die extrazelluläre Domäne gleicht bis zu 57% der von TRK A⁸³. In der katalytischen Domäne besteht eine Ähnlichkeit bis zu 88%⁸¹. Die zweite Rezeptor-Klasse, TRK B^{TK-}, hat denselben extrazellulären und intramembranären Aufbau wie TRK B^{TK+}, jedoch nur eine sehr kurze cytoplasmatische Domäne und der katalytische Teil fehlt völlig⁸¹.

TRK C wird ebenfalls in zwei Versionen von Zell-Oberflächen Rezeptoren exprimiert. Die erste Klasse, mit einer kataklytischen cytoplasmatischen Domäne ähnelt wiederum TRK A und TRK B^{TK+}. Sie unterscheiden sich untereinander durch verschieden lange Aminosäure-Reste in dem Bereich, der für die Autophosphorilierung zuständig ist^{84,85}. Die zweite Klasse zeigt Übereinstimmungen mit TRK B^{TK-}. Die extrazelluläre und intramembranäre Domäne gleicht TRK C^{TK+}, aber es fehlt wiederum der katalytische Teil⁸⁵.

2.4 Chemokine

2.4.1 Allgemein

Chemokine gehören zu der Familie der Zytokine, sie sind jedoch kleiner und haben ähnliche Aminosäuresequenzen. Sie werden von phagozytierenden Zellen, Endothelzellen, Keratinozyten und einigen weiteren Zellen gebildet. Sie dienen als Lockstoffe für immunologisch aktive Zellen, besonders für Lymphozyten. Sie können in die drei folgenden Untergruppen eingeteilt werden⁸⁶.

2.4.2 CC-Chemokine

CC-Chemokine enthalten zwei aneinanderhängende Cysteinreste. Zu ihnen gehört zum Beispiel RANTES, Macrophage inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β und Monocyte Chemotactic Protein 1 (MCP-1), MCP-2 und MCP-3. Diese Chemokine wirken chemotaktisch auf fast alle mononukleären Zellen, einschließlich den Dendritischen Zellen⁸⁷.

2.4.3 CXC-Chemokine

Diese Gruppe zeichnet sich durch eine Trennung der Cysteinreste durch eine andere Aminosäure aus. CXC-Chemokine sind zum Beispiel Interleukin-8 (IL-8) und PBP, welches von Blutplättchen produziert wird. Sie wirken als chemotaktischer Faktor vor allem auf Neutrophile⁸⁷.

2.4.4 C-Chemokine

C-Chemokine enthalten nur einen Cysteinrest und sie erfüllen „Spezialaufgaben“. Zu ihnen gehört Eotaxin als chemotaktischer Faktor für Eosinophile und Lymphotaktin, das T-Zell-Vorläufer zum Thymus „lockt“⁸⁷.

Die Tabelle 1 zeigt die Chemokinrezeptoren mit den zugehörigen Chemokinen.

Receptor	Ligands
CXC Receptors	
CXCR1	IL-8
CXCR2	IL-8, GRO- α , GRO- β , GRO- γ , NAP-2, ENA-78
CXCR3	IP-10, MIG
CXCR4	SDF-1 α
CC Receptors	
CCR1	MIP-1 α , RANTES, MCP-3
CCR2	MCP-1, MCP-3, MCP-5
CCR3	Eotaxin, RANTES, MCP-2, MCP-3, ?MCP-4
CCR4	MIP-1 α , RANTES, MCP-1, TARC
CCR5	MIP-1 α , MIP-1 β , RANTES
CCR6	MIP-3 α /LARC
CCR7	MIP-3 β /ELC

Tabelle 1: Chemokinrezeptoren und ihre Liganden⁸⁷

2.4.5 Der Einfluss von Chemokinen auf Dendritische Zellen

Die Migration der Dendritischen Zellen wird vor allem durch Chemokine gesteuert^{88,89,90,91}.

Reife und unreife Dendritische Zellen reagieren auf verschiedene Chemokine, dies liegt an der Expression unterschiedlicher Chemokin-Rezeptoren an ihrer Oberfläche.

Unreife Dendritische Zellen exprimieren neben anderen Rezeptoren CCR1, CCR2, CCR5, und CXCR1⁸⁶. Diese werden durch Liganden aktiviert, die in entzündetem Gewebe gebildet werden, zum Beispiel Makrophage Inflammatory Protein-1 α (MIP-1 α), Monocyte-Chemotactic Protein-3 (MCP-3) und RANTES⁸⁷. Durch die Aktivierung dieser Rezeptoren wandern die Dendritischen Zellen in Entzündungsgebiete ein, um dort Antigene aufzunehmen.

Mit dem Beginn der Reifung, ausgelöst durch die Antigenaufnahme, ändert sich die Rezeptorexpression auf ihrer Oberfläche. Innerhalb sehr kurzer Zeit wird CCR1 und CCR5 verringert. Dies wird vermutlich nicht durch eine Abnahme der mRNA für diese Rezeptoren gesteuert, sondern anscheinend über eine Selbst-Desensibilisierung, ausgelöst durch eine verstärkte Ausschüttung von entsprechenden Liganden durch die reifenden Dendritischen Zellen selbst⁸⁹. Hierdurch wird die Chemotaxis in „Richtung“ entzündetes Gewebe verringert und die Dendritischen Zellen „können es verlassen“.

Gleichzeitig beginnt eine sehr starke Vermehrung des CCR7/EBI1/BLR2 Rezeptors an der Oberfläche^{87,89}. Dessen Ligand EBI1 ligand chemokine (ELC)/ Macrophage Inflammatory Protein-3 β (MIP3- β) wird hauptsächlich in sekundären Lymphorganen wie Lymphknoten, Milz oder Thymus produziert. Dies bewirkt eine Migration der reifen Dendritischen Zellen zu den sekundären Lymphorganen, wo sie die dort ruhenden T- und B-Zellen aktivieren.

Fig. 5 zeigt den Einfluss der Reifung der Dendritischen Zellen, hier eingeleitet durch CD40-Ligand, auf die Migration in Richtung der verschiedenen Chemokine, abhängig von der Zeit der Reifung.

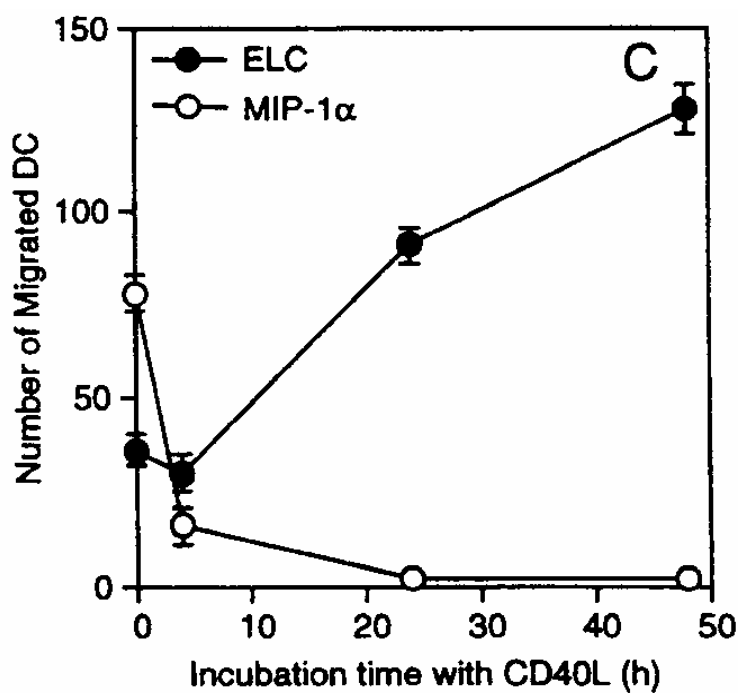


Fig. 5: Einfluss von ELC und MIP-1 α auf die Migration Dendritischer Zellen im Laufe der Reifung⁸⁷

3. Zielsetzung

Dendritische Zellen, die lange Zeit keine große Beachtung fanden, da sie schwer zu isolieren waren, spielen heute eine zunehmende Rolle in der Behandlung von Malignomen und einem breiten Spektrum von immunologisch beeinflussbaren Erkrankungen. Dies wurde möglich durch die Kenntnis des Entwicklungsweges von Monozyten zu Dendritischen Zellen. So können nun Dendritische Zellen in großen Mengen „gezüchtet“ und therapeutisch eingesetzt werden.

Für diesen Einsatz ist es wichtig die Funktionsweise der Dendritischen Zellen zu kennen und verschiedene Möglichkeiten der Einflussnahme zu berücksichtigen.

So könnte die Wirksamkeit der Dendritischen Zellen durch eine Verstärkung der Phagozytosefähigkeit verbessert werden, wodurch das Immunsystem leistungsfähiger würde.

Auch ein Einfluss auf das Migrationsverhalten durch Veränderungen der Expression von Chemokinrezeptoren auf der Oberfläche der Zellen könnte zu einem veränderten Verhalten in vivo führen.

In dieser Arbeit sollte eine mögliche Veränderung dieser Funktionen der Dendritischen Zellen überprüft werden. Einflussgrößen waren verschiedene Neurotrophine und hier besonders der Nerve Growth Factor (NGF). Es wurden unreife und reife Dendritische Zellen verglichen sowie in Beziehung zu ihren Vorläuferzellen, den Monozyten, gesetzt. Dafür wurden die Zellen zunächst durch Identifikation einiger Oberflächenmarker definiert, anschließend auf das Vorhandensein von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren untersucht und daraufhin mit den entsprechenden Neurotrophinen inkubiert. Nach der Inkubation wurden sie auf eine Veränderung im Bereich der Oberflächenmarker, der Phagozytosefähigkeit und der Chemokinrezeptoren untersucht.

4. Hilfsmittel

4.1 Material und Geräte

6-well-plate	GREINER, Solingen
Ampli Wax PCR GEM 100	PERKIN ELMER CETUS, Norwalk, USA
Blue caps (15ml, 50ml) Falcon Blue Max	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Buffy-Coat	INSTITUT FÜR KLINISCHE IMMUNOLOGIE UND TRANSFUSIONSMEDIZIN, Gießen
Cytofunnel	SHANDON, Frankfurt
Cytospin	SHANDON, Frankfurt
Deckgläschen	MENZEL-GLÄSER, Braunschweig
Disposable Cell Scraper	GREINER, Solingen
DNA-Thermal Cycler	PERKIN ELMER CETUS, Norwalk, USA
DNA-Thermal Cycler	STRATAGENE, Gebouw, California
Elektrophorese Kammer	KEUTZ, Reiskirchen
FACScan	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Falcon Blue Max (15ml, 50ml)	BECTON DICKINSON, Heidelberg

Einmalpipetten: Costar (2ml,25ml,50ml)	TECNOMARA, Fernwald
Kämme für Elektrophoreseegel	KEUTZ, Reiskirchen
Latexbeads	SHANDON, Frankfurt
Liquipette	ELKAY, Galway
Microlane Kanülen	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Mikroskop Labovert FS	LEITZ, Wetzlar
Mikrotiterplatte, Flexibel	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Mikrozentrifuge	EPPENDORF, Hamburg
Neubauer Kammer	GERMANY NUCLON, Marienfeld
Objektträger (Normal und Super Frost Puis)	MENZEL-Gläser, Germany
Oligotex small spin column	QIAGEN, Hilden
Oligotex Mikrozentrifugentubes	QIAGEN, Hilden
Perfusorspritze	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Pipetten	GILSON, Viliers-le-Bel, Frankreich
Varipetten	EPPENDORF, Hamburg

Pipettenspitzen:

Multi Guard Filter Tips	ROTH, Karlsruhe
Comfort Tips gelb, blau (autoklaviert)	EPPENDORF, Hamburg
Polaroid-Film Typ 667 (ASA 3000)	POLAROID, Niederlande
Polaroid-Kamera	POLAROID CU5, USA
Power Supply	BIOMETRA, Göttingen
RNA-Workstation	UNI EQUIP, Martinried
Safe Seal Microcentrifuge Tubes	SORENSEN, Utah, USA
Shredder	QIAGEN, Hilden
Spritzen (5ml, 12ml)	BRAUN, Melsungen
Steril-Filter (0,2µm/0,45µm)	SCHLEICHER&SCHUELL, Dassel
UV-Transiluminator	MAGV GMBH, Rabenau-Lohndorf
Wärmekammer	BIOMETRA, Göttingen
Zell-Kultur-Flaschen (Falcon 75cm ²)	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Zentrifuge, Rotixa/KS	HETTICH, Tuttlingen
Zuschnitte für Cytospin	SCHLEICHER&SCHUELL, Dassel

4.2 Reagenzien

123 bp-Längenstandard	GIBCO BRL, Eggenstein
2- β -Mercaptoethanol	SIGMA, Deisendorf
AB Serum (humanes)	INSTITUT FÜR KLINISCHE IMMUNOLOGIE UND TRANSFUSIONSMEDIZIN, Gießen
Agarose	GIBCO BRL, Eggenstein
Ampli Taq DNA Polymerase	PERKIN ELMER CETUS, Norwalk, USA
Antikörper für FACS	
CD1a, Klon B17	IMMUNOTECH, Marseille, France
CD3, Klon SK7	BECTON DICKINSON, Heidelberg
CD4, Klon SK 4	BECTON DICKINSON, Heidelberg
CD8, Klon SK1	BECTON DICKINSON, Heidelberg
CD11b, Klon M522	IMMUNOTECH, Marseille, France
CD14/MY4, Klon 322	IMMUNOTECH, Marseille, France
CD19, Klon 4G7	BECTON DICKINSON, Heidelberg
CD80, Klon SK3	PHARMINGEN, San Diego, USA
CD83, Klon HB15A	IMMUNOTECH, Marseille, France
CD86/B70/b7-2, Klon IT2.2	PHARMINGEN, San Diego, USA
HLA-DR, Klon L243	BECTON DICKINSON, Heidelberg
Brain Derived Neurotrophic Factor (Recombinant Human BDNF)	TEBU, Frankfurt
Bromphenol w/v (0,1%)	SIGMA, Deisendorf
dATP 100mM Gene Amp	PERKIN ELMER CETUS, Norwalk, USA

dCTP 100mM Gene Amp	PERKIN ELMER CETUS, Norwalk, USA
dGTP 100mM Gene Amp	PERKIN ELMER CETUS, Norwalk, USA
dTTP 100mM Gene Amp	PERKIN ELMER CETUS, Norwalk, USA
DTT	GIBCO BRL, Eggenstein
EDTA (Triplex)	MERCK, Darmstadt
Ethidiumbromid	ROTH, Karlsruhe
Fetales Kälber Serum (BSA)	GIBCO BRL, Eggenstein
Ficoll Paque Dichtegradient	PHARMACIA BIOTECH
First Strand Buffer (5x)	GIBCO BRL, Eggenstein
Gelatine	SIGMA, Steinheim
Glycergel	DAKO, Hamburg
Glycerol v/v (50%)	MERCK, Darmstadt
GM-CSF (Recombinant Human GM-CSF)	GENZYME, Cambridge, USA
H ₂ O ₂ (30% Gew-%)	SIGMA, Steinheim
Hexanucleotid-Random-Primer	BOEHRINGER, Mannheim
Interleukin-4 (Recombinant Human IL-4)	GENZYME, Cambridge, USA

LiChrosolv (Wasser für die Chromatographie)	MERCK, Darmstadt
Makrophagen-SFM-Medium ohne Ca/Mg	GIBCO BRL, Eggenstein
Methanol	RIEDEL DE HAEN, Seelze
Meyers Hämalaun	MERCK, Darmstadt
Mineralöl	SIGMA, Deisendorf
MgCl Gene Amp	PERKIN ELMER CETUS, Norwalk, USA
M-MLV Reverse Transcriptase	GIBCO BRL, Eggenstein
mRNA Pack (Oligotex) ODB Buffer (dilution buffer) OEB Buffer (elution buffer) OL 1 Buffer (lysis buffer) OW 1 Buffer (wash buffer 1) OW 2 Buffer (wash buffer 2) Oligotex Suspension	QIAGEN, Hilden
Na-Azid	SIGMA, Deisendorf
NaCl	MERCK, Darmstadt
Nerve Growth Factor 7S (NGF 7S)	BOEHRINGER, Mannheim
Neurotrophin-3 (Recombinant Human NT-3)	TEBU, Frankfurt

Neurotrophin-4 (Recombinant Human NT-4)	TEBU, Frankfurt
Octagam®	OCTAPHARMA, Langenfeld
PBS 10x (Phosphat-buffered-saline)	GIBCO BRL, Eggenstein
PCR-Puffer 1x10 Gene Amp	PERKIN ELMER CETUS, Norwalk, USA
Penicillin/Streptomycin	GIBCO BRL, Eggenstein
Primer für PCR:	
BDNF	GIBCO BRL, Eggenstein
β-Actin	CLONTECH-LABORATORIES, Palo Alto
TRK-A	GIBCO BRL, Eggenstein
TRK-B	GIBCO BRL, Eggenstein
TRK-C	GIBCO BRL, Eggenstein
RNasin (RNase-Inhibitor)	PROMEGA, Madison, USA
RPMI 1640 Medium	GIBCO BRL, Eggenstein
SDS w/v (0,5%)	ROTH, Karlsruhe
Sekundärantikörper PE für FACS	DAKO, Hamburg
Tris- Puffer	USB, Cleveland, USA
Türk'sche Lösung	MERCK, Darmstadt

4.3 Zelllinien

HEL	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
HL-60 (Human Acute myeloid leukemia)	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig
K562	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen, Braunschweig

4.4 Lösungen

Agarose-Gel-Elektrophorese:

TAE einfach: 0,04M Tris-Acetat
 0,001M EDTA

Agaroseladepuffer: 50% Glycerol v./v.
 0,5% SDS w./v.
 0,1% Bromphenol w./v.
 10mM EDTA

Agarosegel (1,5%): 1,5g Agarose
 100 ml TAE Puffer
 7µl Ethidiumbromid

Waschpuffer für FACS: 500ml PBS
 5g BSA
 0,02% Na-Azid

4.5 PCR-Primersequenzen

β-Actin Primer

3`Primer: 5`-CGT CAT ACT CCT GCT TGC TGA TCC ACA TCT GC-3`

5`Primer: 5`-CGA GCG GGA AAT CGT GCG TGA CAT TAA GGA GA-3`

PG: 479bp

TRK A Primer

ECD1 5`: GAG AGA GAC TCC AGA GCG TTG

ECD1 3`: CCT GCT GGC TTG GCT GAT ACT

PG: 329bp

ECD2 5`: ACA TCC TTG ATG CTG TGG CGT

ECD2 3`: CTG GCC ACA CGC AAC TGT CTA

PG: 379bp

TRK B Primer

ECD 5`: TAC ATC TGT ACT AAA ATA CA

ECD 3`: GTG TCC CCG ATG TCA TTC GC

PG: 245bp

Kin 5`: AGG GCA ACC CGC CCA CGG AA

Kin 3`: GGA TCG GTC TGG GGA AAA GG

PG: 571bp

Trunc 5`: TAA AAC CGG TCG GGA ACA TC

Trunc 3`: ACC CAT CCA GTG GGA TCT TA

PG: 161bp

TRK C Primer

ECD 5': CAT CCA TGT GGA ATA CTA CC

ECD 3': TGG GTC ACA CTG ATA GGA GG

PG:204/228bp

Kin 5': CAC GCC AGG CCA AGG GTG AG

Kin 3': GAA TTC ATG ACC ACC AGC CA

PG:571/613bp

Trunc 5': AGG GAC ACA ACT GCC ACA AG

Trunc 3': AGC CAT GAC GTC CTT TGC TG

PG:279/144bp

5. Methoden

5.1 Isolierung von Monozyten

Als Ausgangsmaterial wurden Buffy Coats von gesunden Blutspendern der Blutbank Gießen verwendet.

5.1.1 Herstellung der Kulturflaschen

Als erster Schritt wurden am Tag vor der Isolierung Zell-Kultur-Flaschen mit Gelatine beschichtet und über Nacht bei 56°C in einer Wärmekammer getrocknet. Auf diese Flaschen wurde am Tag der Isolierung Plasma aus den jeweiligen Buffy Coats gegeben, welches zuvor 2x bei 3000 U/min abzentrifugiert wurde. Dieses Plasma wurde ca. 10 min belassen und dann mit PBS abgespült.

5.1.2 Verarbeitung der Buffy Coats

Für die Isolierung wurden die Buffy Coats zunächst im Verhältnis 1:1 mit PBS verdünnt und davon 25ml über 25ml Ficoll in einem 50ml Bluecap geschichtet. Dies wurde 30min bei 2400 U/min zentrifugiert, wobei sich eine Schicht von mononukleären Zellen zwischen dem Ficoll und dem Plasma bildete. Dieser Gradient wurde sorgfältig abgenommen und dreimal bei 1600 U/min mit PBS „gewaschen“, wobei dazwischen die Zellen stets wieder dekantiert wurden. Im weiteren Verlauf kamen die Zellen in Makrophagen-Medium auf die vorbereiteten Flaschen und wurden 45 min im Brutschrank inkubiert. In dieser Zeit wurden die Monozyten auf dem beschichteten Untergrund adhären. Die nicht adhären Zellen wurden mit PBS abgespült bis unter dem Mikroskop nur noch adhären Zellen in den Flaschen zu sehen waren. Hierauf wurde PBS mit EDTA (7ml PBS + 3ml EDTA) in die Flaschen gegeben, um die Monozyten abzulösen. Diese wurden wiederum mit PBS abgespült, bei 1600 U/min abzentrifugiert und in RPMI-Medium aufgenommen. Die Zellen wurden in einer Neubauer Zählkammer gezählt und für den jeweils folgenden Versuch vorbereitet. Es ergaben sich im Durchschnitt $10\text{-}12 \times 10^6$ Zellen.

Für die Polymerase Ketten-Reaktion wurden 5×10^6 Zellen (Monozyten) in 600µl OL1 Puffer + β -Mercaptoethanol bei -80°C eingefroren. Weitere 5×10^6 Zellen wurden in Kultur genommen (siehe 5.2) und 7 Tage später ebenfalls eingefroren.

Für das FACScan konnten die Zellen nativ verwendet werden.

5.2 Kultivierung der Zellen

Zur Kultivierung der Zellen wurden jeweils 1×10^6 Zellen in eine Vertiefung einer Sechs-Loch Platte mit 2ml RPMI-Medium angesetzt. Um eine Entwicklung zu Dendritischen Zellen zu erreichen, wurden GM-CSF und Il-4 in einer Konzentration von 10^3 U/ml am ersten und dann jeden zweiten Tag zugegeben. Für die Entwicklung reifer Dendritischer Zellen kamen zudem noch 10^2 U/ml TNF- α im gleichen Rhythmus dazu.

Für die Stimulation der Dendritischen Zellen mit Neurotrophen wurde folgende Konzentration verwendet:

NGF: 100 ng/ml

BDNF, NT-3 und NT-4: 50 ng/ml

5.3 RNA-Isolierung aus mononukleären Zellen

Für die RNA-Isolierung wurde das Oligotex mRNA Kit von Qiagen mit dem dazugehörigen Protokoll benutzt und maximal fünf Millionen Zellen eingesetzt.

Dieses Verfahren basiert darauf, dass mRNA mit einem Homopolymer von 20-250 Adenosin-Nukleotiden endet. Dadurch kann die mRNA durch die Hybridisierung an Oligo dT Primer von der r-RNA und der t-RNA getrennt werden. Nach Hybridisierung der mRNA an die Oligo dT Säulen unter hohen Salzbedingungen kann sie durch die Reduzierung der Ionenstärke eluiert werden.

Hierzu werden die Zellen zunächst „gewaschen“, lysiert und mit der Oligotex-Suspension vermischt. Anschließend wird die Lösung mehrmals „gewaschen“, abzentrifugiert und eluiert. Wichtig ist dabei stets darauf zu achten, dass es sich um RNase-freie Arbeitsgefäße (z. B. Zentrifugationsröhrchen) handelt.

5.4 Polymerase Ketten Reaktion (PCR)

Die PCR ist ein Verfahren zur experimentellen Amplifikation eines definierten DNA-Fragments. Hierdurch ist es möglich einen bestimmten DNA-Abschnitt so oft zu vervielfältigen, dass er mit einfachen Methoden detektiert werden kann.

Die PCR ist abhängig von einer thermostabilen DNA-Polymerase, die neue DNA an einer vorhandenen Nukleinsäure-Matrize synthetisieren kann. Für den Beginn benötigt die Polymerase ein kurzes Stück doppelsträngiger DNA, das in vivo durch den sich öffnenden Doppelstrang gebildet wird. In vitro werden dafür künstlich synthetisierte Oligonukleotidprimer, die sich an die Matrize-DNA anlegen, verwendet. Zwischen diesen liegt das zu amplifizierende DNA-Stück.

Die PCR besteht aus drei Teilschritten, die mehrfach wiederholt werden. Die Menge der Zyklen ist unter anderem abhängig von der DNA-Menge zu Beginn der PCR.

Der erste Schritt ist die Denaturierung bei 94°C. Bei dieser Temperatur werden die Wasserstoffbrücken zwischen den Nukleotiden zerstört und die DNA-Doppelstränge teilen sich. Die nun vorliegenden Einzelstränge dienen als Matrize.

Der nächste Schritt ist das Annealing, das Hybridisieren der Primer an die Matrize. Dies erfolgt bei 56-60°C und ist für die Spezifität der PCR entscheidend.

Für den letzten Schritt, die Polymerisation, wird eine Temperatur von 72°C benötigt, die die optimale Temperatur für die thermostabile Taq Polymerase darstellt.

Bei jedem Zyklus wird die DNA-Menge verdoppelt.

In dieser Arbeit wurde als Ausgangsmaterial nicht DNA sondern mRNA verwendet, die zunächst mit dem Enzym Reverse Transcriptase in c-DNA umgeschrieben wurde. Dieses kombinierte Verfahren wird als RT-PCR bezeichnet.

Die Nachteile der PCR liegen in ihrer hohen Störanfälligkeit durch Kontamination mit Fremd-DNA. Daher wurde neben einer Positivkontrolle für den korrekten Ablauf der RT-PCR auch stets eine Negativkontrolle (H₂O) zum Ausschluss einer Kontamination mit Fremd-DNA mitgeführt. Um diese typische Komplikation zu vermeiden, wurden die Herstellung der c-DNA und die Amplifikation in streng voneinander getrennten Räumen und unter regelmäßigem Handschuhwechsel durchgeführt.

5.4.1 Reverse Transkription

Das Umschreiben der mRNA in c-DNA wurde mit folgendem Ansatz durchgeführt:

1,0µl dNTP
 1,0µl Reverse Transcriptase
 1,5µl Random Primer
 0,5µl RNasin
 5,0µl 5x Puffer
 2,5µl DTT
 +13µl RNA

Dieser Ansatz wurde in einem PCR-Reaktionsgefäß 60 min bei 37°C und 15 min bei 99°C in einem PCR-Cycler inkubiert. Bis zur Weiterverarbeitung wurden die Proben bei -20°C gelagert.

5.4.2 β-Actin PCR

β-Actin, ein so genanntes „housekeeping gene“, das in fast allen Körperzellen exprimiert wird, diente als Kontrolle für die RNA-Isolierung und die Reverse Transkription.

Ein 30µl Ansatz besteht aus:

2,0µl 3`-Primer
 2,0µl 5`-Primer
 1,0µl dNTP
 3,0µl 10x PCR- Puffer
 0,9µl MgCl
 0,3µl AmpliTaq DNA Polymerase
 15,8µl H₂O
 +5,0µl C-DNA

Dieser Ansatz wurde in ein extra dünnwandiges PCR-Reaktionsgefäß pipettiert, mit Öl bedeckt und in einem PCR-Cycler zunächst 3 min bei 94°C inkubiert. Daran schlossen sich direkt 22 Amplifikationszyklen an.

Ein Zyklus wurde wie folgt durchgeführt:

1 min bei 94°C,

1 min bei 60°C

1 min bei 72°C an.

Danach erfolgten zum Abschluss noch 10 min bei 72°C.

5.4.3 TRK-PCR

Die TRK-PCR wurde in „Hot-Start“-Technik durchgeführt. Bei dieser Methode wird der Reaktionsansatz in zwei nicht reagible Teile gesplittet, die durch eine Wachsschicht voneinander getrennt sind. Beim Aufheizen zu Beginn des PCR-Cycler-Programms schmilzt die Wachsschicht bei ca. 80°C und die beiden Ansätze können sich vermischen. Dies führt dazu, dass vor Erreichen der Annealing-Temperatur kein reaktionsfähiger Ansatz vorliegt und so die unspezifische Amplifikation vermindert wird.

Ein 30µl Ansatz für TRKA besteht aus:

2,0µl 3`-Primer

2,0µl 5`-Primer

1,0µl dNTP

2,0µl 10x PCR-Puffer

0,9µl MgCl

12,1µl H₂O

→ Wachsschicht

1,0µl 10x PCR-Puffer

0,3µl AmpliTaq DNA Polymerase

3,7µl H₂O

+ 5,0µl C-DNA

Für TRKC wurden 8,0µl C-DNA verwendet und dafür im ersten Ansatz nur 8,1µl H₂O.

Das Programm für die Amplifizierung im PCR-Cycler bestand aus:

3 min 94°C, dann für TRKA und B:

1 min 94°C, 1min 60°C und 1 min 72°C
dieser Schritt wurde 35x wiederholt

für TRKC:

1 min 94°C, 1 min 61°C und 1 min 72°C
dieser Schritt wurde 37x wiederholt

5.5 Agarose-Gel-Elektrophorese

Für die Elektrophorese wurden 1,5-prozentige Agarose-Gele verwendet.

Für die Zuordnung der PCR-Produkte muss auf jedem Gel ein Längenstandard mit aufgetragen werden. In dieser Arbeit wurde hierfür ein Basenpaarleiter von 123 bp Länge verwendet.

Zur Darstellung der PCR-Produkte mittels Elektrophorese wurden 20µl des jeweiligen PCR-Produkts mit 5µl Laufpuffer verdünnt und in die, durch die vorher eingesetzten Kämme gebildeten, Geltaschen pipettiert. TAE wurde als Elektrophoresepuffer verwendet. Die Laufzeit betrug bei einer Spannung von 10 Volt pro cm Gellänge ca. drei bis vier Stunden.

Zur Anfärbung der PCR-Amplifikationsprodukte wurde Ethidiumbromid verwendet, das zwischen die Basen der Nukleinsäuren interkaliert und nach Anregung mit UV-Licht sichtbares Licht emittiert.

Die Agarosegele wurden mit einer Polaroidkamera fotografiert und dokumentiert.

5.6 Durchflusszytometrie (FACS)

Mit der Durchflusszytometrie können Zellen durch ihre Größe und Komplexität identifiziert werden, zudem können bestimmte Antigene mithilfe von fluoreszenzmarkierten Antikörpern detektiert werden. Die resultierenden Werte stellen keine absoluten Zahlen dar, sondern stehen in Relation zu dem vorher festgesetzten Referenzwert.

Für die Messung werden suspendierte Einzelzellen in einem laminaren Hüllstrom an einem fokussierten Lichtstrahl (Laser) vorbei geleitet. Dabei kommt es in Abhängigkeit vom Zelltyp zu einer charakteristischen Streuung des Lichts, die mittels geeigneter Detektoren nachgewiesen wird.

Die Größe wird durch den „forward scatter“ (FSC) erfasst. Dies bedeutet, dass der Lichtstrahl entlang des einfallenden Lichts gemessen wird. Die Größe der Zellen wird durch das Ausmaß der Lichtbeugung bestimmt, die proportional zur Zellgröße ist.

Die Granuliertheit oder Komplexität wird mit dem „side scatter“ (SSC) gemessen. Hierbei wird der Laserstrahl gebrochen und reflektiert und im 90°-Winkel aufgefangen. Das aufgefangene Signal ist proportional zu Granuliertheit.

Für den FSC und den SSC wird das Licht der Anregungswellenlänge (488nm) gemessen.

Die Fluoreszenz der markierten Antikörper zur Detektion von Oberflächenantigenen wird ebenfalls im 90°-Winkel gemessen, die Wellenlänge ist jedoch vom Fluorchrom abgänglich. Die Stärke des Signals ist proportional zur Zahl der gebundenen Fluorchrome. Fig.6 zeigt eine Zusammenfassung der Messgrößen des FACS.

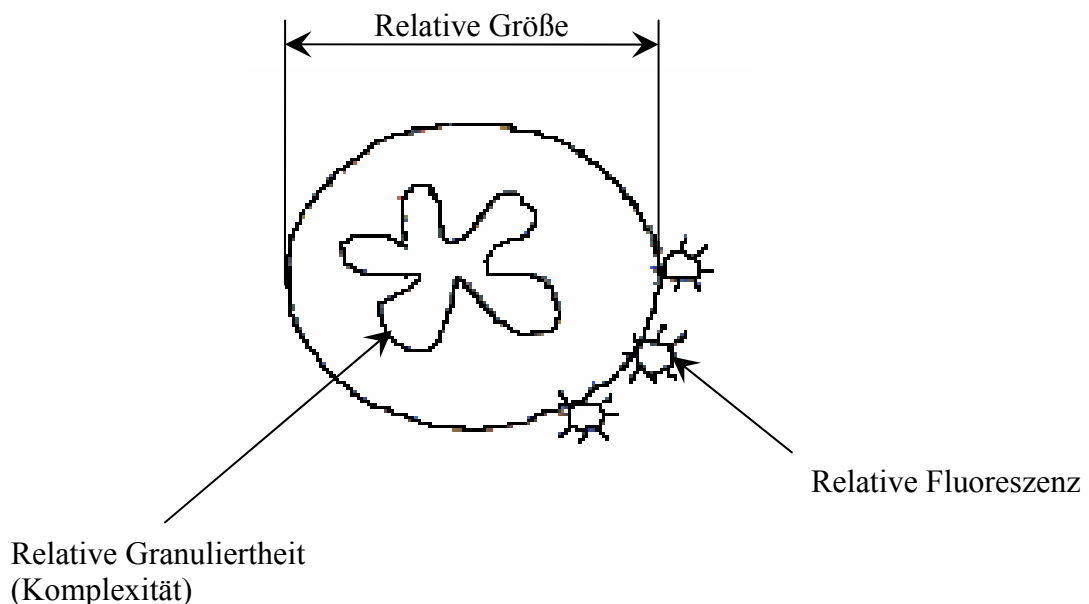


Fig. 6: Graphische Darstellung der Messgrößen des FACS

Fig. 7 zeigt ein Beispiel für die Punktwolkendarstellung einer Leukozytenmessung.

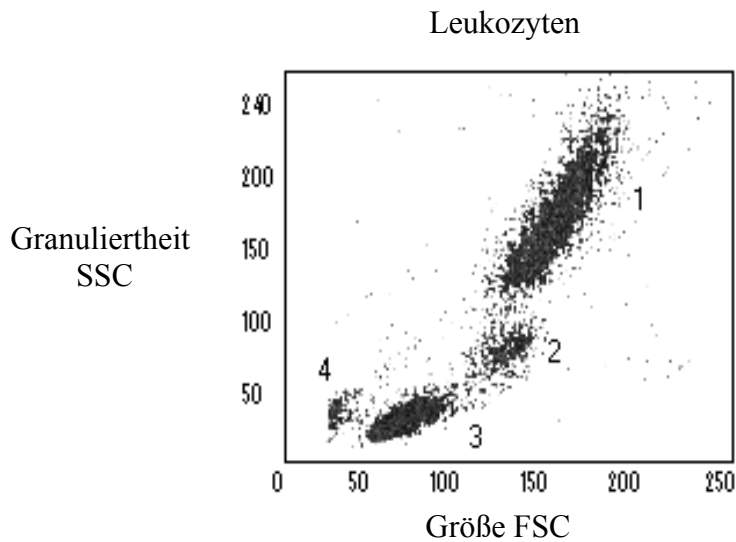


Fig. 7: Punktwolkendarstellung einer Leukozytenmessung:
 Wolke 1: Granulozyten; 2: Monozyten;
 3: Lymphozyten; 4: Debris

Durchführung:

Es wurden 200.000 Zellen pro Höhlung einer Mikrotiterplatte verwendet, die bei 4°C für 3 Minuten bei 1200 U/min zentrifugiert wurde. Dann wurden 20µl Octagam® (1:5 mit Waschlösung verdünnt) und die entsprechenden Antikörper zugegeben. Dies wurde 30 Minuten auf Eis inkubiert und dreimal mit Waschlösung gewaschen, wie oben beschrieben zentrifugiert und 20µl fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper (1:20 in Waschlösung verdünnt) dazugegeben. Nach 30-minütiger Inkubation auf Eis wurden sie erneut mit Waschlösung gewaschen.

Danach wurde die Messung in einem FACscan durchgeführt

5.7 Stimulierung Dendritischer Zellen mit Neurotrophinen

In diesem Versuch wurden zusätzlich zu GM-CSF und IL-4 während der Kultivierung der Zellen noch Neurotrophine zugegeben. Diese waren: Nerve Growth Factor (Konzentration 100ng/ml), Brain-derived Neurotrophic Factor, Neurotrophin-3 und -4, alle in einer Konzentration von 50ng/ml. Die Zugabe erfolgte am 2., 4. und 6. Tag nach der Isolierung.

Nach einer Kultivierungsdauer von 7 Tagen wurden verschiedene Oberflächenantigene, die typisch für bestimmte Zellreihen sind (**CD1a** – Dendritische Zellen, **CD3** – T-Lymphozyten, **CD4** – T-Helferzellen, **CD8** – T-Suppressorzellen und Natürliche Killerzellen, **CD14** – Monozyten, **CD19** – B-Lymphozyten und **CD45** – B- und T-Lymphozyten, Monozyten) im FACS bestimmt. Hier sollte sich ein eventueller Einfluss der Neurotrophine auf die Entwicklung der Monozyten zu Dendritischen Zellen zeigen.

5.8 Phagozytose-Test

Mit diesem Versuch sollte gezeigt werden, dass Dendritische Zellen eine große Phagozytose-Fähigkeit besitzen, und es sollte ein Unterschied zwischen reifen und unreifen Dendritischen Zellen und eine eventuelle Einflussnahme des NGF gezeigt werden.

5.8.1 Nachweis der Phagozytose auf Chamberslides

Hier sollte zunächst die Phagozytose qualitativ nachgewiesen werden.

Dafür wurden reife und unreife Dendritische Zellen auf Chamberslides in der entsprechenden Konzentration von Medium und Wachstumsfaktoren kultiviert. Am 7. Tag wurden Latex-Beads bzw. oppsonierte und nicht oppsonierte Erythrozyten zugegeben. Nach einer halben Stunde wurden die Chamberslides mit PBS abgespült und unter dem Mikroskop ausgewertet.

5.8.2 Quantitativer Phagozytosenachweis im FACScan

Für einen quantitativen Nachweis im FacScan wurden die Zellen wie in 5.2 beschrieben in Sechs-Loch-Platten kultiviert. Als Proben dienten Monozyten sowie reife und unreife Dendritische Zellen mit und ohne NGF. Am 7. Tag wurden fluoreszierende Latexbeads zugegeben. Nach einer einstündigen Inkubation wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und die verbleibende Fluoreszenz im FACScan gemessen.

5.9 Der RNase Protection Assay (RPA)

Der RPA ist eine sehr spezifische und sensitive Methode für den quantitativen Nachweis von RNA. Er beruht auf einer DNA-abhängigen RNA Polymerase der Bakteriophagen SP6, T7 und T3.

Hierzu wird die Probe, welche die isolierte RNA enthält, mit der „Ziel-RNA“ hybridisiert, danach werden die nicht hybridisierten Einzelstrang RNA-Sequenzen durch Zugabe von RNasen zerstört. Die übrig gebliebenen „vor der RNase geschützten“ (RNase protected) Sequenzen werden aufgereinigt, auf einem Polyacrylamid-Gel zur Elektrophorese aufgetragen und mithilfe der Autoradiographie dargestellt.

Durch die erhältlichen SONDENSSETS ist es möglich mit einer Probe verschiedene RNA-Sequenzen zu erfassen. Durch ein Abgleichen der „Housekeeping genes“ mit optischen Geräten ist ein quantitativer Vergleich zwischen den Proben möglich. Dies konnte jedoch in dieser Arbeit aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden, daher erfolgte die Auswertung lediglich visuell.

Die Isolierung der Gesamt-RNA wurde mit dem entsprechenden Kit von Qiagen durchgeführt, die SONDENSYNTHE und der RPA sowie die Behandlung der Proben mit RNase und das Auftragen der Gele nach dem Protokoll von Pharmingen.

Bei der Auswertung ist zu beachten, dass die „geschützten“ Proben ca. 29 Nukleotide kürzer sind als die Standardproben und deshalb schneller als diese migrieren. Deshalb wird die Migrationsdistanz der Proben mit einer Standardkurve verglichen um eine Identifizierung der jeweiligen RNA zu erreichen.

Für die einzelnen Proben wurden stets Dendritische Zellen aus verschiedenen Isolationsansätzen vermischt, um eine gute Vergleichbarkeit und eine genügende Zellzahl von ca. 20×10^6 Zellen zu erreichen.

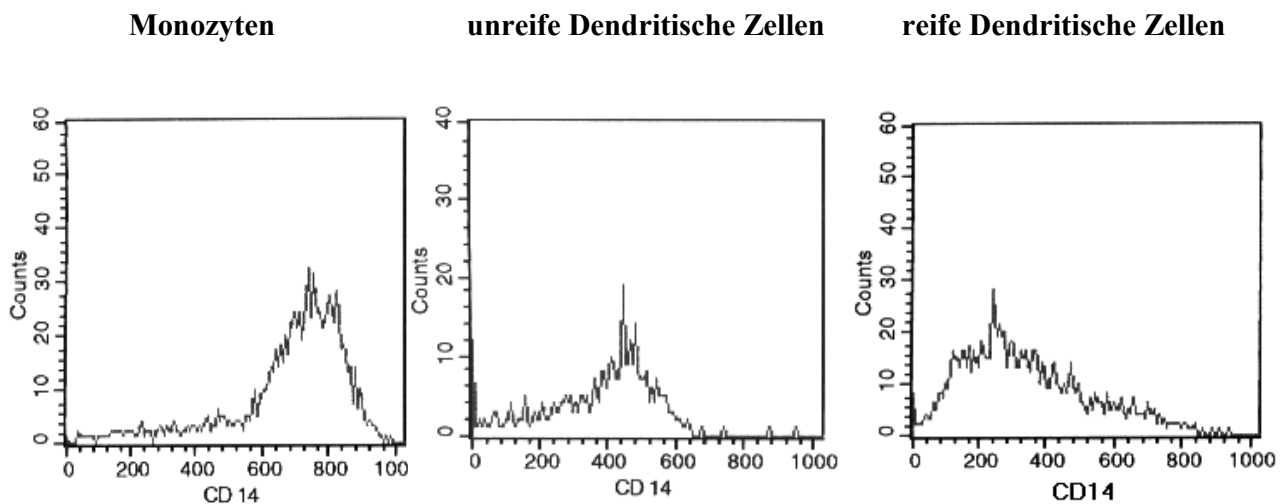
6. Ergebnisse

6.1 Definition der Dendritischen Zellen durch ihre Oberflächenmarker

Zunächst sollten die isolierten und inkubierten Zellen, die für die weiteren Versuche verwendet wurden, definiert werden. Hierzu wurden die Zellen im FacScan auf bestimmte Oberflächenmarker getestet. Es wurden für die Monozyten sieben, für die unreifen Dendritischen Zellen acht und für die reifen fünf Testreihen durchgeführt.

Ausgewertet wurde die „Mean Fluorescence Intensity“ (MFI), die sich ergibt, indem die logarithmische Skala der Fluoreszenz auf eine lineare Skala mit 1024 Kanälen überführt wird. Die MFI ist dann der Kanal mit den meisten Ereignissen. So kann durch eine Verschiebung der MFI eine Veränderung in der Expression der Oberflächenantigene gut erkannt werden.

Fig. 8 zeigt die MFI von CD14, CD1a, CD80, CD83 und CD86 in Form von Histogrammen, hierdurch kann die Veränderung der Oberflächenmarker besonders gut gezeigt werden.



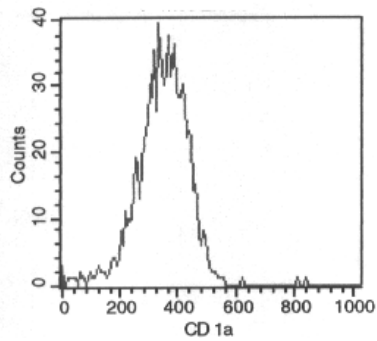
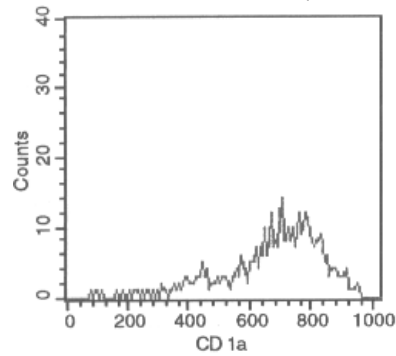
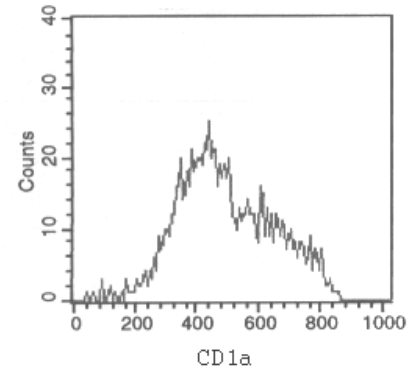
Die Ergebnisse der MFI ergaben für CD14 in diesen drei Histogrammen:

Monozyten: 788

Unreife Dendritische Zellen (DC): 433

Reife DC: 314

Deutlich erkennt man hier die Linksverschiebung der Kurve, was eine verminderte Expression des Oberflächenantigens zeigt.

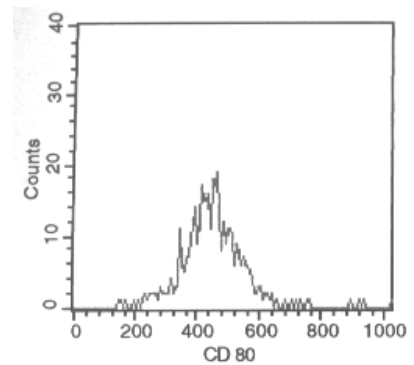
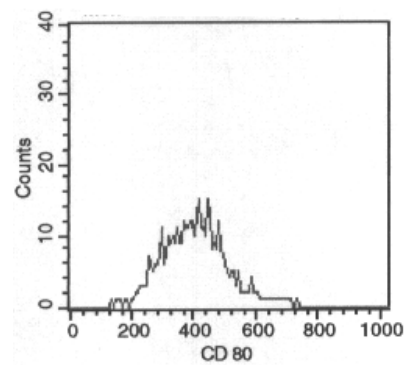
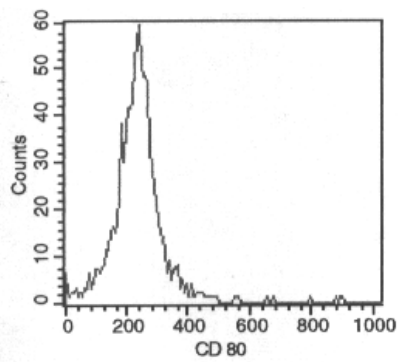
Monozyten**Unreife Dendritische Zellen****Reife Dendritische Zellen**

Die MFI ergab hier für CD1a:

Monozyten: 347

Unreife DC: 688

Reife DC: 483

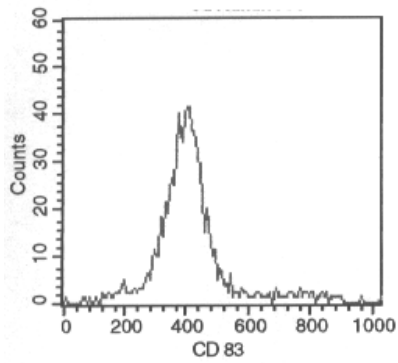
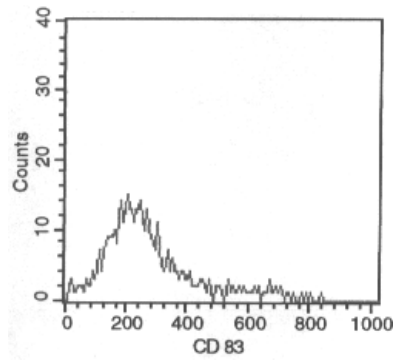
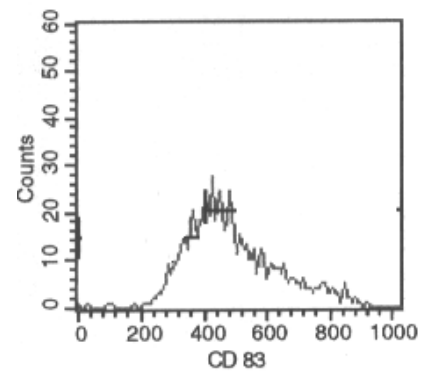


Die MFI ergab hier für CD80:

Monozyten: 231

Unreife DC: 443

Reife DC: 392

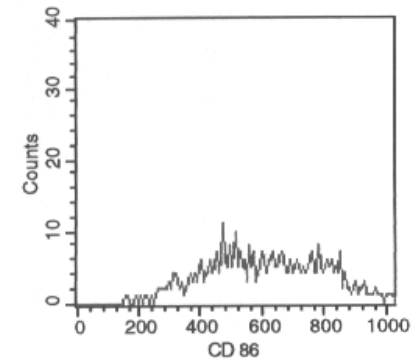
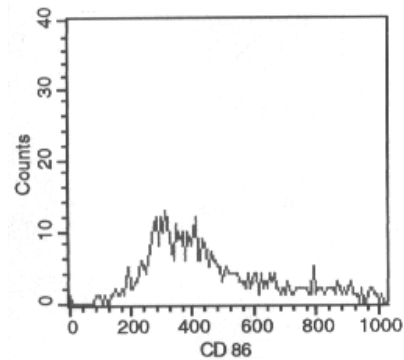
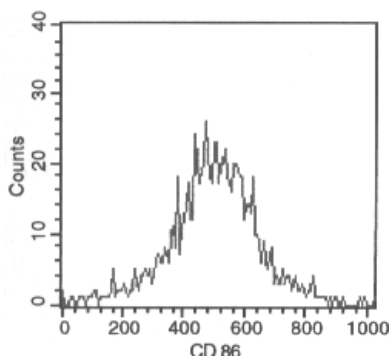
Monozyten**Unreife Dendritische Zellen****Reife Dendritische Zellen**

Die MFI ergab hier für CD83

Monozyten: 399

Unreife DC: 249

Reife DC: 475



Die MFI ergab hier für CD86:

Monozyten: 496

Unreife DC: 425

Reife DC: 595

In Tabelle 2 sind die entsprechenden Ergebnisse der Testreihen dargestellt. Die Werte in der Tabelle entsprechen dem Median und der errechneten Standardabweichung der jeweiligen Testreihe. Es wurde hier der Median dem Mittelwert wegen der geringen Versuchszahl vorgezogen. Die Zahlen sind nicht absolut auswertbar, sondern müssen stets im Vergleich von Monozyten, unreifen und reifen Dendritischen Zellen gesehen werden. Entscheidend ist also ein Anstieg oder Abfall der Werte.

Oberflächenmarker	Monozyten n=7	Unreife DC n=8	Reife DC n=5
CD1a	420 +/- 100	688 +/- 54	513 +/- 144
CD11b	656 +/- 45	769 +/- 68	641 +/- 111
CD14	788 +/- 42	367 +/- 90	439 +/- 71
CD80	231 +/- 98	384 +/- 68	375 +/- 118
CD83	399 +/- 67	282 +/- 56	367 +/- 64
CD86	497 +/- 47	412 +/- 57	528 +/-100

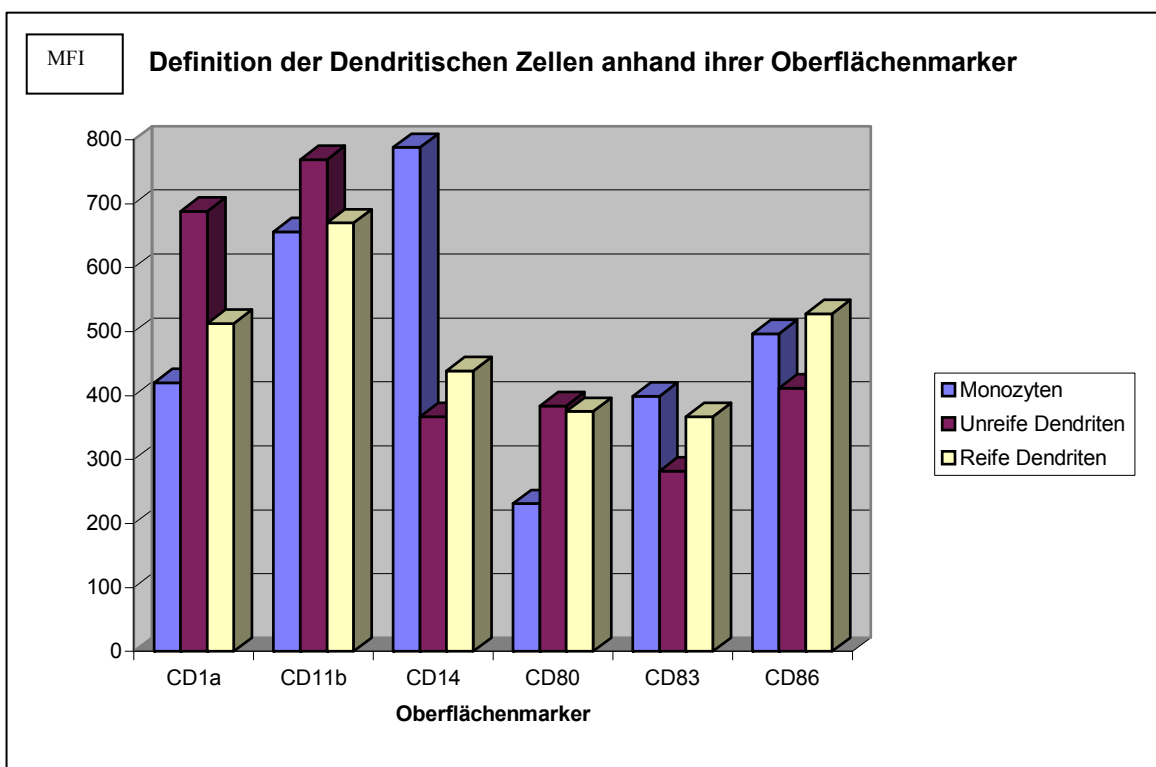
Tabelle 2: Definition der Dendritischen Zellen anhand ihrer Oberflächenmarker

Es zeigte sich das erwartete Absinken von CD14 um etwa 50% bei der Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen, dies ist nach Angaben in der Literatur im Bereich der Oberflächenmarker die entscheidende Veränderung in der Differenzierung von Monozyten zu Dendritischen Zellen. Ebenso zeigte sich der weitgehend einheitlich beschriebene Anstieg von CD1a, der bei den unreifen Dendritischen Zellen im Vergleich zu Monozyten stärker ausgeprägt war (ca. 40%) als bei den Reifen (ca. 20%). Auch CD80 stieg im Vergleich zu Monozyten bei den Dendritischen Zellen an (ca.40%), während CD83 und CD86 eher abfielen, jedoch untereinander (unreif-reif) die beschriebene Entwicklung zeigten, nämlich dass beide bei den reifen Dendritischen Zellen stärker exprimiert (ca. 25%) werden. CD11b hingegen zeigte keine

eindeutige Veränderung. Aufgrund der relativ kleinen Testreihe und der zum Teil auch großen Standardabweichungen sind die angegebenen Prozentzahlen nur orientierend zu sehen.

Die so definierten Dendritischen Zellen wurden für alle weiteren Versuche verwendet.

Die Grafik 1 soll die Veränderungen der Oberflächenmarker im Laufe der Entwicklung der Dendritischen Zellen verdeutlichen.



Grafik 1: Definition der Dendritischen Zellen durch ihre Oberflächenmarker

6.2 Nachweis der mRNA für die Rezeptoren der Neurotrophine

Der Nachweis der mRNA für die verschiedenen Domänen der Rezeptoren der Neurotrophine wurde mithilfe der RT-PCR durchgeführt. Diese Methode erlaubt uns, aus technischen Gründen, hier nur einen qualitativen Nachweis der mRNA, es gab keine Möglichkeit zu einer quantitativen Aussage. So wurde lediglich positiv (1) und negativ (0) unterschieden. In der Tabelle 3 wurde der Anteil der positiven und negativen Ergebnisse dargestellt. Verglichen wurden dabei reife und unreife Dendritische Zellen mit den zugehörigen Monozyten aus demselben Isolierungsansatz. Es wurden jeweils acht Testreihen mit korrekter positiver und negativer Kontrolle durchgeführt.

PCR	Monozyten		unreife Dendritische Zellen		PCR	Monozyten		reife Dendritische Zellen	
	+	-	+	-		+	-	+	-
TRKA ECD	7	1	7	1	TRKA ECD	7	1	7	1
TRKA KIN	6	2	6	2	TRKA KIN	7	1	5	3
TRKB ECD	1	7	0	8	TRKB ECD	0	8	2	6
TRKB KIN	1	7	3	5	TRKB KIN	4	4	5	3
TRKB	2	6	5	3	TRKB	8	0	7	1
TRUNC					TRUNC				
TRKC ECD	0	8	5	3	TRKC ECD	1	7	3	8
TRKC KIN	6	2	7	1	TRKC KIN	8	0	7	1
TRKC	4	4	5	3	TRKC	2	6	6	2
TRUNC					TRUNC				

Tabelle 3: Nachweis von TRK-Rezeptoren auf Dendritischen Zellen mithilfe der PCR
n=8 jeweils für reife und unreife Dendritische Zellen

ECD: extrazelluläre Domäne
KIN: Kinase Domäne
TRUNC: Verkürzte (Truncated) Domäne

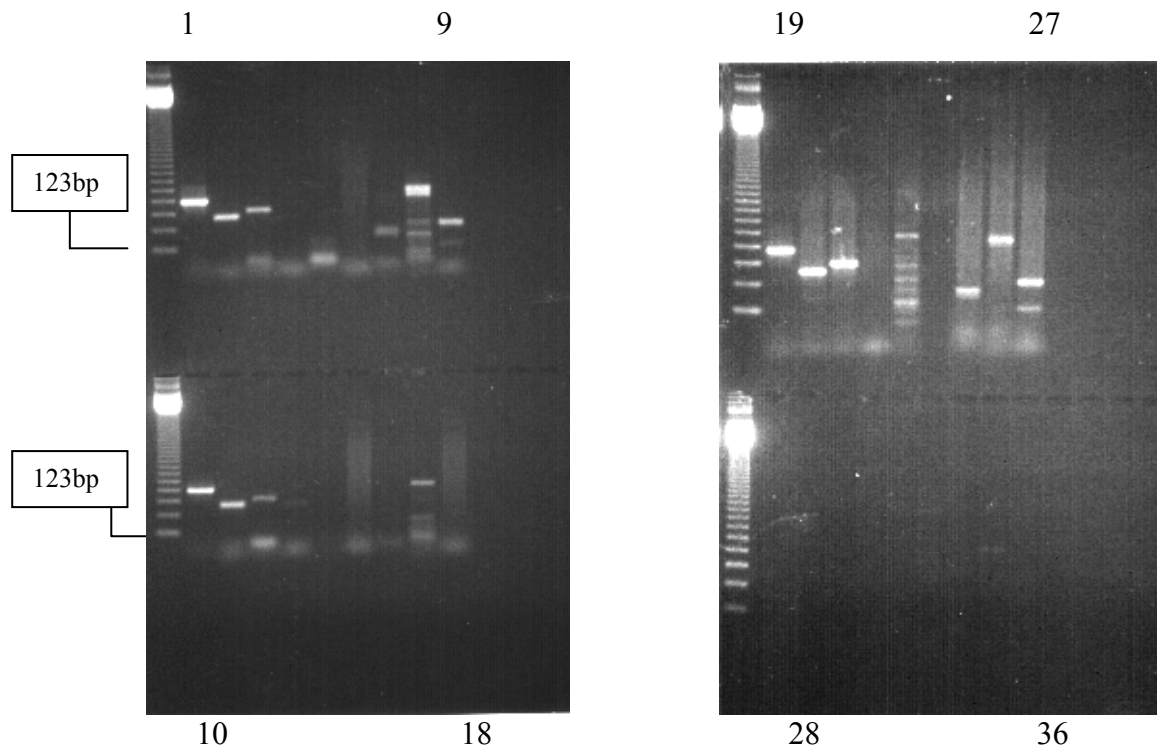
Es zeigte sich, dass sowohl reife als auch unreife Dendritische Zellen ebenso wie die Monozyten positiv für die extrazelluläre Domäne von TRKA waren (jeweils 7 von 8 Testreihen). Der „Kinase“-Anteil von TRKA war ebenfalls bei den Dendritischen Zellen sowie bei den Monozyten deutlich positiv. Wohingegen von TRKB und TRKC nur mRNA für Teilbereiche der Rezeptoren nachgewiesen werden konnte. So war die extracelluläre Domäne von TRKB bei den unreifen nicht und bei den reifen Dendritischen Zellen nur bei 25% vorhanden. Bei TRKC ergaben sich für diesen Rezeptorteil 37,5% bei den reifen und 62,5% bei den unreifen Dendritischen Zellen. Die Kinase-Domäne von TRKB war bei den unreifen Dendritischen Zellen zu 37,5% und bei den reifen zu 62,5% positiv, während bei TRKC hier 87,5% positiv gegenüberstehen. Die „verkürzte“ Form beider Rezeptoren zeigte bei den unreifen 62,5% und bei den reifen 87,5% bzw. 75% (TRKC) Expression.

Die Monozyten waren ebenfalls für TRKA weitgehend positiv. Bei TRKB sind die Ergebnisse nicht einheitlich, es scheint jedoch zumindest teilweise nachweisbar zu sein. Für TRKC ließ sich die Kinase-Domäne gut nachweisen (mit 100 bzw. 75%), der extrazelluläre Teil war praktisch nicht belegbar (0 bzw. 12,5%), hier zeigte sich ein deutlicher Unterschied zu den Dendritischen Zellen, bei denen gerade die mRNA für den extrazellulären Teil von TRKC gut nachweisbar war. Für den verkürzten Rezeptor von TRKC ließ sich in etwa der Hälfte der Fälle mRNA darstellen.

Daraus lässt sich schließen, dass der Rezeptor für NGF (TRKA) höchstwahrscheinlich auf Dendritischen Zellen exprimiert wird, ebenso dürfte TRKC vorhanden sein. Für TRKB ließ sich praktisch keine mRNA für die extracelluläre Domäne aufzeigen, jedoch war sowohl für die Kinase Domäne als auch für die verkürzte Version mRNA nachweisbar. So dass die Zelle eventuell einen zusätzlichen Reiz benötigt, um den Rezeptor für BDNF vollständig zu exprimieren. Allerdings gab es für diesen Rezeptor auch das Problem, dass die positiv Kontrolle (K562) nicht immer optimal nachweisbar war. Eine sichere Auswertung der Ergebnisse ist daher nicht möglich. Es müsste eventuell eine neue Testreihe mit einer spezifischeren Kontroll-Zellreihe für TRKB durchgeführt werden.

Im Folgenden (Figur 9) werden eine RT-PCR aus Monozyten (1-9) und unreifen Dendritischen Zellen (10-18) dazu positive (19-27) und negative Kontrollen (28-36) dargestellt.

Fig. 9: RT-PCR zur Darstellung der TRK Rezeptoren auf Monozyten und unreifen Dendritischen Zellen
123bp: Basenpaarleiter



Legende:	β-Actin (Housekeeping-Gen):	1,10,19,28
	TRKA ECD:	2,11,20,29
	TRKA KIN:	3,12,21,30
	TRKB ECD:	4,13,22,31
	TRKB KIN:	5,14,23,32
	TRKB TRUNC:	6,15,24,33
	TRKC ECD:	7,16,25,34
	TRKC KIN:	8,17,26,35
	TRKC TRUNC:	9,18,27,36

Für die Negativkontrolle wurde statt der c-DNA hochreines Wasser verwendet. Positivkontrollen waren für β -Actin, TRKA und TRKB die humane Leukämie Zelllinie K562 und für TRKC die humane Leukämie Zelllinie HEL.

6.3 Stimulation der Dendritischen Zellen mit Neurotrophinen

Als Stimulatoren wurden die verschiedenen Liganden der TRK-Rezeptoren verwendet:

Nerve Growth Factor (NGF) für den TRK A Rezeptor

Brain Derived Nerve Factor (BDNF) für den TRK B Rezeptor

Neurotrophin-3 für den TRK A und den TRK C Rezeptor

Neurotrophin-4 für den TRK C Rezeptor

Nach der Stimulation wurden im FacScan wieder bestimmte Oberflächenmarker getestet. Die ausgewählten Oberflächenmarker stehen für verschiedene hämatologische Zellreihen. Es wurde lediglich eine kleine Testreihe mit unreifen Dendritischen Zellen durchgeführt (mit jedem Neurotrophin wurde zweimal getestet). Die Ergebnisse der mit den Neurotrophinen stimulierten Dendritischen Zellen wurden mit Monozyten und unstimulierten Dendritischen Zellen verglichen (Tabelle 4). Die Prozentzahlen in der Tabelle geben den Anteil der für diesen Oberflächenmarker im Durchschnitt positiv dargestellten Zellen im Vergleich zu allen gemessenen Zellen und zugehörige Standardabweichung wieder.

	CD1a	CD3	CD4	CD8	CD14	CD19	CD45	HLA_DR
Monozyten		77,28% +/- 5,76%	44,31% +/- 25,11%	30,39% +/- 9,90%	35,00% +/- 21,12%	82,23% +/- 5,06%	45,00% +/- 5,66%	
Dendritische Zellen (DC)	92,75% +/- 4,75%	9,09% +/- 7,43%	84,95% +/- 8,67%	2,48% +/- 0,76%	2,15% +/- 4,13%	17,03% +/- 32,59%	93,56% +/- 2,06%	96,39% +/- 1,68%
DC+BDNF	92,15% +/- 3,16%	5,19% +/- 4,29%	85,79% +/- 6,42%	1,46% +/- 2,01%	1,82% +/- 2,31%	0,35% +/- 0,44%	92,83% +/- 6,34%	97,25% +/- 0,15%
DC+NT3	84,77% +/- 4,62%	13,12% +/- 3,59%	78,62% +/- 9,67%	6,74% +/- 5,64%	2,88% +/- 3,57%	41,80% +/- 57,66%	92,91% +/- 0,76%	94,93% +/- 4,95%
DC+NT4	90,13% +/- 7,11%	12,70% +/- 12,27%	87,31% +/- 16,83%	0,44% +/- 0,49%	0,28% +/- 0,32%	0,18% +/- 0,20%	97,11% +/- 0,77%	94,89% +/- 3,13%
DC+NGF	92,57% +/- 3,40%	1,97% +/- 8,21%	90,47% +/- 11,43%	0,07% +/- 1,04%	24% +/- 5,84%	0,60% +/- 0,94%	95,00% +/- 1,38%	96,80% +/- 2,68%

Tabelle 4: Vergleich von Oberflächenmarkern vor und nach Stimulation
n=2

Für **CD14** stellte sich die erwartete Entwicklung von Monozyten zu Dendritischen Zellen dar, so konnte hier ein deutlicher Abfall der Expression nachgewiesen werden. Es zeigte sich praktisch kein Einfluss von BDNF, NT-3 und NT-4, jedoch war bei der Inkubation mit NGF ein deutlich geringerer Abfall erkennbar. Dies könnte auf einen Einfluss des NGF auf Dendritische Zellen schließen lassen, jedoch kann man hierzu aufgrund der sehr geringen Versuchszahl keine definitive Aussage machen.

Es konnte von Monozyten zu Dendritischen Zellen ein Anstieg des **CD4** nachgewiesen werden, ohne dass ein Neurotrophin darauf deutlich Einfluss nehmen würde.

Hingegen fielen **CD3** und **CD8** im Vergleich zu Monozyten deutlich ab, lediglich unter dem Einfluss von NT-3 war der Abfall geringer.

Auch **CD19** sank in der Entwicklung von Monozyten zu Dendritischen Zellen ab. Hier zeigte sich ebenfalls unter NT-3 ein geringerer Abfall der Expression, während unter Inkubation mit BDNF, NT-4 und NGF das Absinken stärker ausfiel als bei den unstimulierten Dendritischen Zellen. Der Effekt von NT-3 auf CD19 wird jedoch durch die enorme Standardabweichung relativiert, sodass er nicht berücksichtigt werden kann.

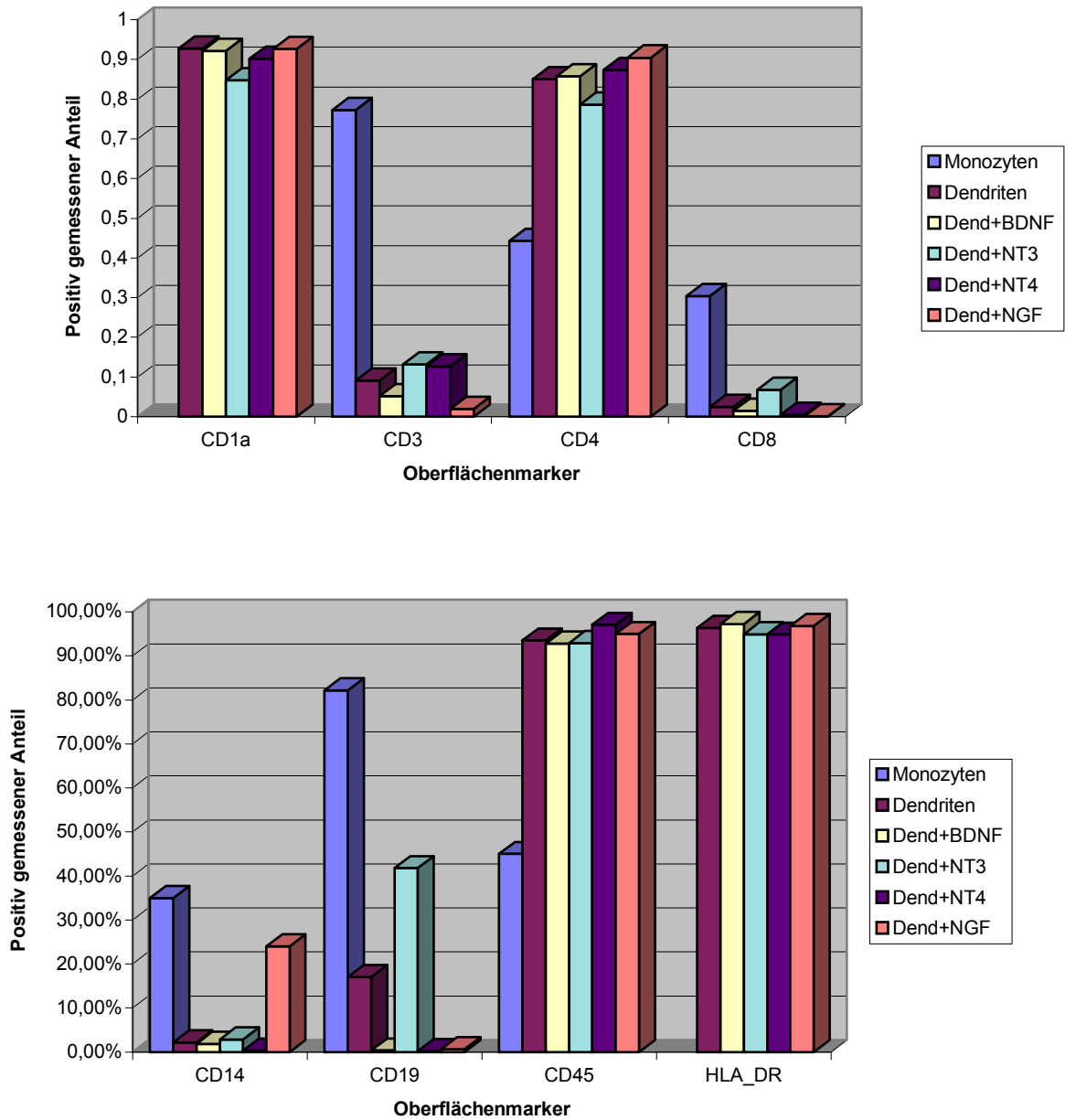
Für **CD45** konnte von Monozyten zu Dendritischen Zellen ein Anstieg in der Expression nachgewiesen werden, dieser wurde von der Inkubation mit Neurotrophinen praktisch nicht beeinflusst.

Die Ergebnisse von **CD1a** und **HLA_DR**, zu denen keine Werte für die Monozyten vorhanden sind, wurden bei den Dendritischen Zellen durch Neurotrophine nicht beeinflusst.

Insgesamt zeigte von den Neurotrophinen vor allem NGF eine Wirkung auf die Dendritischen Zellen, besonders ausgeprägt war die Wirkung auf die Expression von CD14. Auf Grund der geringen Versuchszahl kann hier jedoch nur von einer eventuellen Veränderung gesprochen werden, da die Veränderung nicht statistisch belegbar ist. Trotzdem stellt sich hierdurch die Frage, ob NGF die Ausreifung bzw. die Differenzierung der Zelle verlangsamt. Aber auch NT-3 zeigt eine Wirkung, hier besonders auf CD8, ein Oberflächenmarker für B- und T-Lymphozyten. Welche Auswirkung dies auf Dendritische Zellen hat, müsste in weiteren Versuchen überprüft werden, da in dieser Arbeit alle folgenden Versuche nur mit NGF durchgeführt wurden. Insgesamt müsste jedoch für eine sichere Aussage über die Veränderung der Expression hier eine deutlich größere Versuchsreihe angelegt werden.

Grafik 2 stellt die Veränderungen der Oberflächenmarker unter Inkubation dar.

Darstellung der Oberflächenmarker bei Monozyten, unreifen Dendritischen Zellen ohne und mit Stimulation mit Neurotrophinen



Grafik 2: Darstellung einiger Oberflächenmarker bei Monozyten, unreifen Dendritischen Zellen mit und ohne Inkubation mit Neurotrophinen

6.4 Nachweis der Phagozytosefähigkeit Dendritischer Zellen

6.4.1 Qualitativer Phagozytosenachweis auf Chamberslides

Zunächst sollte die Phagozytosefähigkeit der Dendritischen Zellen qualitativ auf einem Chamberslide dargestellt und unter dem Mikroskop ausgewertet werden. Hierbei konnte man erkennen, dass sowohl unreife als auch reife Dendritische Zellen Latexbeads und oppsonierte Erythrozyten sehr gut aufnehmen. Es konnte jedoch mikroskopisch kein Unterschied zwischen reifen und unreifen Dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Auch ein Einfluss des NGF war nicht objektiv sichtbar. Daher wurde ein Versuch der Objektivierung im FacScan durchgeführt.

Fig. 10 und 11 zeigen reife bzw. unreife Dendritische Zellen mit phagozytierten Latexbeads aus eigenen Versuchen, die Farbe der Darstellungen ergibt sich aus dem Kulturmedium und der anschließenden Präparation

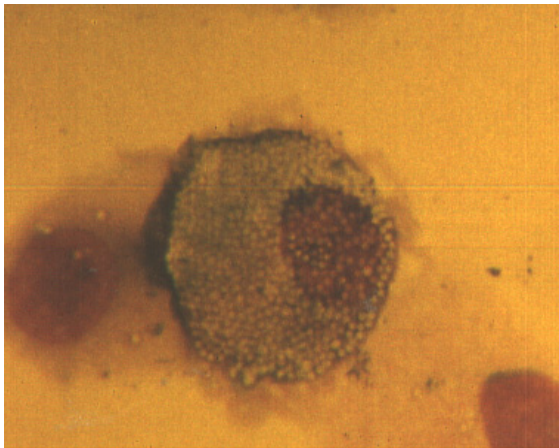


Fig. 10: unreife Dendritische Zelle mit phagozytierten Latexbeads



Fig. 11: reife Dendritische Zelle mit phagozytierten Latexbeads

6.4.2 Quantitativer Nachweis der Phagozytose im FACS und deren Veränderung nach Stimulation mit NGF

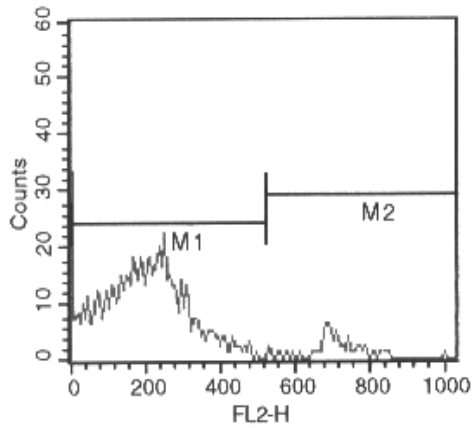
Der Versuch diente dazu, die Phagozytosefähigkeit der unreifen und der reifen Dendritischen Zellen quantitativ zu vergleichen. Außerdem sollte untersucht werden, wie sich eine Stimulation der TRKA Rezeptoren durch NGF auf das Phagozytoseverhalten auswirkt.

Es wurden für alle Untergruppen fünf Ansätze mit je 1×10^6 Zellen durchgeführt.

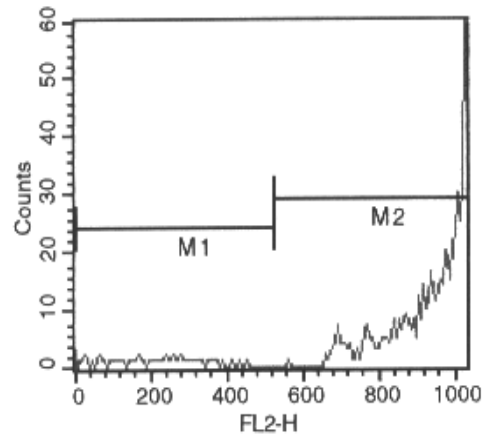
Es konnten hier wiederum keine absoluten Werte bestimmt werden, daher wurden die positiven Ereignisse prozentual zueinander dargestellt.

In den folgenden Histogrammen (12.1-12.4) soll zunächst die bildliche Darstellung der Veränderung der Fluoreszenz entsprechend der Phagozytoseaktivität von reifen zu unreifen Dendritischen Zellen nach Inkubation mit Latexbeads dargestellt werden. Sowie, um den Unterschied darzulegen, die Scans von reifen und unreifen Dendritischen Zellen ohne Beads.

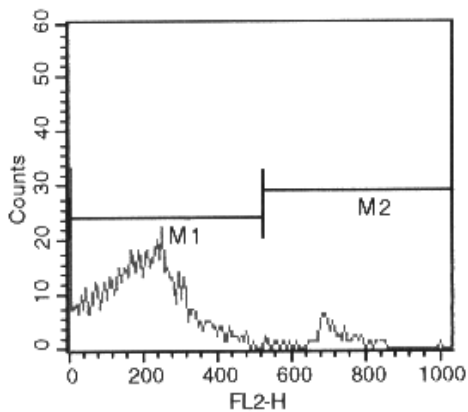
12.1) unreife DC „ohne Beads“



12.2) unreife DC „mit Beads“



12.3) reife DC „ohne Beads“



12.4) reife DC „mit Beads“

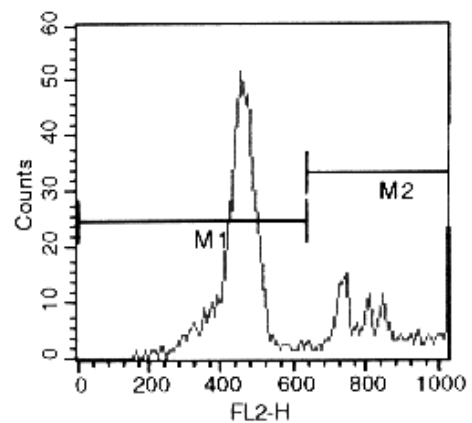


Fig. 12: Histogramme von Dendritischen Zellen vor und nach Phagozytose

In diesen Histogrammen zeigt sich für 12.1 eine positive Fluoreszenz von 0,04, dies entspricht dem Anteil der Zellen, der sich im Sektor M2 befindet.

12.2 zeigt eine Fluoreszenz von 97%,

12.3 von 0,05% und

12.4 von 24,0%.

Insgesamt ergibt die Auswertung der Ergebnisse, dass, wie in der Literatur beschrieben und durch die Funktion der Zellen erklärt, die unreifen Dendritischen Zellen deutlich stärker phagozytierten (97,4% positive Ereignisse) als die reifen (46,6%).

Monozyten zeigten eine Phagozytose von 96,0%.

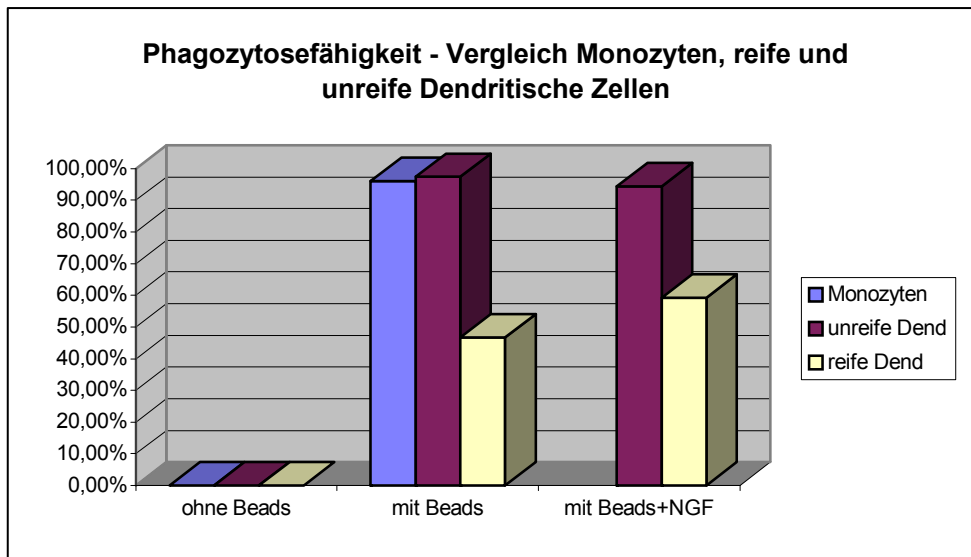
Bei Inkubation mit Nerve Growth Factor ergab sich bei den unreifen Dendritischen Zellen ein sehr geringer Abfall der Phagozytose um etwa 4%, bei den reifen hingegen ein Anstieg um 22%. Die beiden Werte der reifen Dendritischen Zellen sind jedoch durch eine hohe Streubreite belastet, sodass diese Ergebnisse nicht so eindeutig zu verwerten sind. Es wurde daher für diesen Versuch eine statistische Auswertung der Ergebnisse durchgeführt, um zu klären, wie hoch die Wahrscheinlichkeit für einen tatsächlichen Einfluss des NGF ist.

	ohne Beads	mit Beads	mit Beads+NGF
Monozyten	0,00% +/- 0,00%	95,52% +/- 3,56%	
Unreife Dendritische Zellen	0,02% +/- 0,02%	96,15% +/- 2,92%	94,10% +/- 2,39%
Reife Dendritische Zellen	0,01% +/- 0,01%	46,64% +/- 29,18%	59,20% +/- 19,62%

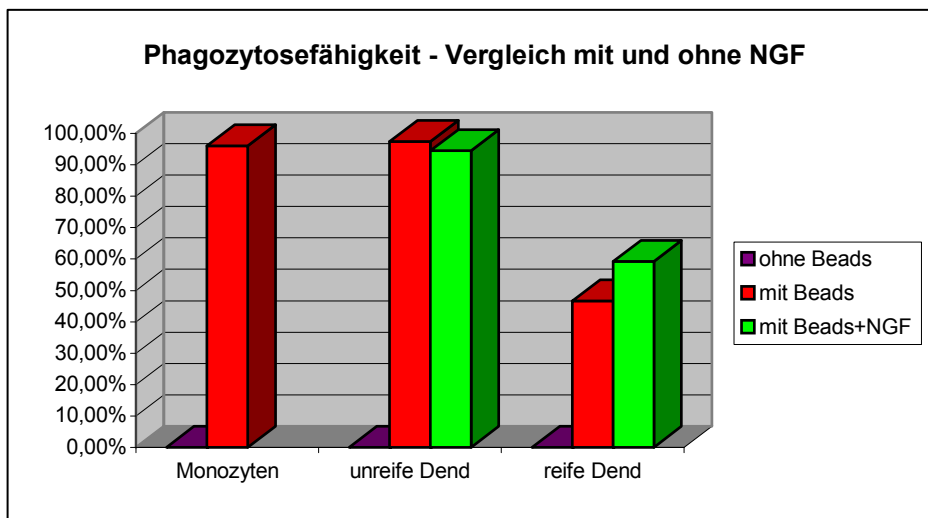
Tabelle 5: Phagozytosenachweis der Dendritischen Zellen
n = 5

Die in der Tabelle 5 dargestellten Prozentzahlen verdeutlichen die durchschnittliche positiv gemessene Fluoreszenz der Zellen im FACScan und die zugehörige Standardabweichung.

Die folgenden Grafiken 3 und 4 sollen das verdeutlichen.



Grafik 3: Vergleich Phagozytosefähigkeit zwischen Monozyten, reifen und unreifen Dendritischen Zellen



Grafik 4: Vergleich der Phagozytosefähigkeit Dendritischer Zellen mit und ohne Inkubation mit NGF

Für die Auswertung entschieden wir uns für eine zweifaktorielle Varianzanalyse, wodurch die Möglichkeit entstand die Ergebnisse aus verschiedenen Gesichtspunkten auszuwerten: einmal der Einfluss der Reife, zum anderen die Wirkung von NGF auf die Phagozytosefähigkeit und zusätzlich ein Einfluss von NGF in Abhängigkeit von der Reife.

Die zweifaktorielle Varianzanalyse mit den Variablen „Reife“ und „NGF“ ergab einen signifikanten Unterschied der Phagozytosefähigkeit zwischen reifen und unreifen Dendritischen Zellen bei einem Signifikanzniveau (α) von 0,05 mit einem p-Wert von 0,016 .

Es lässt sich ebenfalls ein Einfluss des NGF besonders auf reife Dendritische Zellen in Hinsicht auf eine verstärkte Phagozytose nachweisen, der jedoch mit einem p-Wert von 0,9 über dem Signifikanzniveau liegt. Daher zeigt sich hier eine zu große Irrtumswahrscheinlichkeit, die durch eine größere Versuchsreihe bestätigt oder widerlegt werden müsste.

Ein Einfluss von NGF in Abhängigkeit von der Reife zeigt mit einem p-Wert von 0,185 kein sinnvoll verwertbares Ergebnis.

6.5 Nachweis von Chemokinrezeptoren im RNase Protection Assay (RPA)

Mit diesem Versuch sollte eine Veränderung der Genexpression von Chemokinrezeptoren in den Dendritischen Zellen und damit eine Veränderung der Chemotaxis im Laufe ihrer Ausreifung belegt werden. Außerdem sollte untersucht werden, ob NGF einen Einfluss auf diese Veränderung nehmen kann.

Es wurden hierzu zwei verschiedene Sondensets des RiboQuant® Systems von Pharmingen verwendet: hcr5 und hcr6. Die eingesetzte Gesamt-RNA wurde von Dendritischen Zellen aus sechs verschiedenen Isolationsansätzen gewonnen, um eine genügende Menge von ca. 20×10^6 Zellen und eine gute Vergleichbarkeit der Banden zu erreichen.

Es wurden insgesamt sechs Versuchsreihen durchgeführt.

Dabei zeigte es sich, dass die Dendritischen Zellen positiv waren für CCR1, CCR5, CXCR1 (schwach), CXCR4 und BLR2 (CCR7) und negativ für CCR3, CCR4, TER1, CCR2, CXCR2, CXCR3, BLR1 und V28.

Das Probenmaterial bestand aus reifen und unreifen Dendritischen Zellen, die unterschiedlich lange (zwischen 1h und 40h) mit NGF inkubiert wurden. Sowie reife und unreife Dendritische Zellen zum Zeitpunkt „0“ und nach 40h ohne Inkubation mit NGF als Kontrollwerte.

Die Auswertung erfolgte qualitativ vergleichend:

Bei den unreifen Dendritischen Zellen (siehe Fig. 13) konnte für CCR1 und CCR5 keine Wirkung des NGF nachgewiesen werden, jedoch stieg die Expression sowohl von CXCR4 und CCR7(BLR2) nach Inkubation mit NGF an. Um diese Ergebnisse zu verifizieren, müsste jedoch ein Abgleich der „House keeping genes“ GAPDH und L32 erfolgen. Dies ist allerdings aus technischen Gründen hier nur visuell möglich und daher nicht mit Zahlen belegbar. Da sich dieser Effekt aber in allen fünf durchgeführten Versuchen zeigt, ist es wahrscheinlich, dass NGF einen Einfluss auf die Chemokinexpression zeigt.

Fig. 13 und 14 zeigen beispielhaft zwei RNase Protection Assays mit unterschiedlichen Probenansätzen.

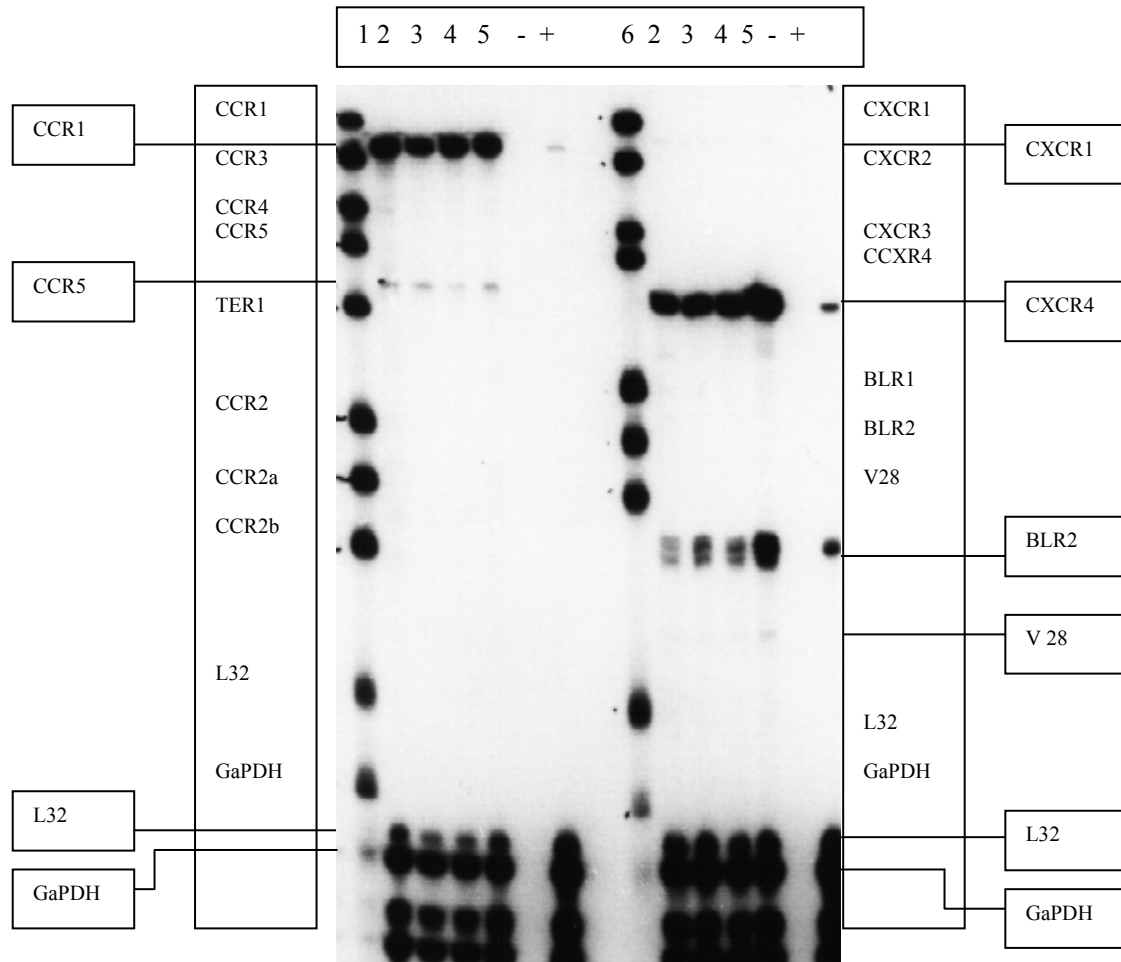


Fig. 13 Nachweis der Chemokinrezeptoren bei unreifen Dendritischen Zellen mithilfe des RPA

- Legende:
- 1: Sondenset hcr-5
 - 2: unreife Dendritische Zellen nach 1h ohne NGF
 - 3: unreife Dendritische Zellen nach 1h mit NGF
 - 4: unreife Dendritische Zellen nach 40h ohne NGF
 - 5: unreife Dendritische Zellen nach 40h mit NGF
 - 6: Sondenset hcr-6
 - : Negativ-Kontrolle
 - +: Positiv-Kontrolle

Bei den reifen Dendritischen Zellen (siehe Fig. 14) stellte sich der bereits beschriebene Abfall der Rezeptoren CCR1 und CCR5 sowie ein Anstieg von CXCR4 und BLR2/CCR7 im Vergleich zu den Unreifen dar. Ein Einfluss von NGF auf die Chemokinrezeptorexpression der reifen Dendritischen Zellen war nicht deutlich zu erkennen. CXCR1 war so schwach ausgeprägt, dass eine Beurteilung über verstärkte oder verminderte Expression nicht möglich war.

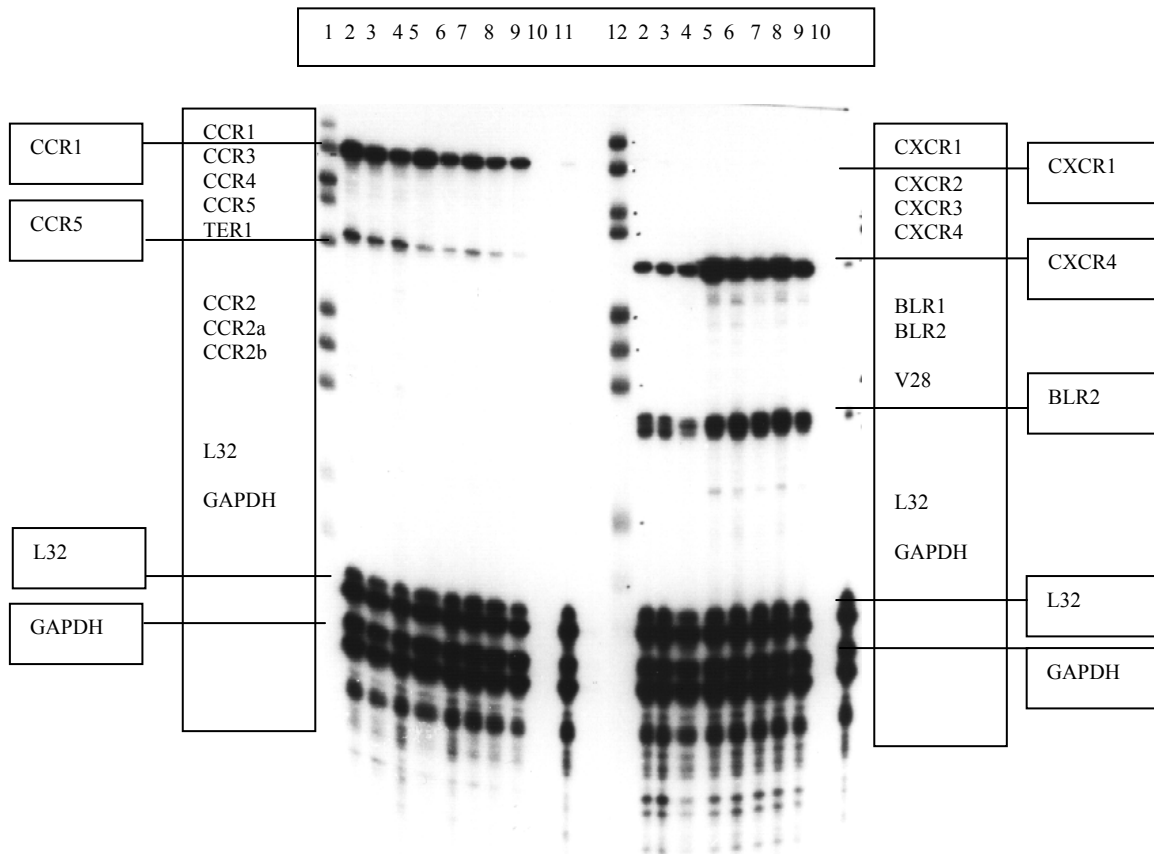


Fig. 14: Nachweis von Chemokinrezeptoren bei reifen Dendritischen Zellen durch RPA

- Legende:
- | | |
|---------------------------|-----------------------------------|
| 1: Sondenset hcr - 5 | 7: Reife DC mit 1h NGF |
| 2: Unreife DC ohne NGF | 8: Reife DC mit 4h NGF |
| 3: Unreife DC mit 1h NGF | 9: Reife DC mit 40h NGF |
| 4: Unreife DC mit 4h NGF | 10: Negative Kontrolle yeastF RNA |
| 5: Unreife DC mit 40h NGF | 11: positiv Kontrolle CKT + |
| 6: Reife DC ohne NGF | 12: Sondenset hcr - 6 |

7. Diskussion

Dendritische Zellen werden zunehmend als adjuvante Therapiemöglichkeit bei vielen infektiösen und malignen Erkrankungen getestet und es zeigen sich in klinischen Versuchen erste Erfolge. Umso wichtiger ist es Einflussmöglichkeiten auf die Funktionen dieser Zellen zu finden, um die Therapie zu optimieren.

Die Familie der Neurotrophine, die, über ihre Rezeptoren (Tyrosin kinase Rezeptoren TRK A, B und C) vor allem im Zusammenhang mit der Entwicklung, Differenzierung und Vermeidung der Apoptose von Nervenzellen bekannt sind^{92,93}, zeigen in neueren Forschungsergebnissen auch Einfluss auf Zellen des Immunsystems. Hierfür am häufigsten nachgewiesen wurde die Wirkung des Nerve Growth Factors (NGF). Dieser wirkt z.B. auf phagozytierende bzw. antigen-präsentierende Zellen, wie Makrophagen, wirkungsverstärkend⁹².

In dieser Arbeit sollte nun an Hand der aus Monozyten gewonnenen unreifen und reifen Dendritischen Zellen überprüft werden, ob die Neurotrophine auch auf diese Zellen eine Wirkung zeigen.

Hierzu mussten zunächst die Dendritischen Zellen definiert werden, um die Ergebnisse nachvollziehbar und reproduzierbar zu machen.

Dies erfolgte durch Darstellung der Oberflächenantigene mit Hilfe der Durchflusszytometrie (FACS).

Die Angaben über die Veränderung der Oberflächenmarker der Dendritischen Zellen im Laufe ihrer Entwicklung sind nicht homogen, sie unterliegen starken Variationen, die nicht nur von den Kulturbedingungen, sondern auch von den Spendern abhängig zu sein scheinen^{94,95,96}.

Einheitlich wird in der Literatur eine Abnahme der CD14-Expression^{92,93,97} von Monozyten zu Dendritischen Zellen beschrieben. Dies konnte auch in dieser Arbeit nachgewiesen werden. Die Expression von CD14 verringerte sich bei den unreifen Dendritischen Zellen um 54% und bei den reifen um 44%.

CD1a, das bei unreifen Dendritischen Zellen als stärker positiv als bei reifen beschrieben wird⁹⁸, zeigte eben diese Tendenz. Es stieg bei unreifen Dendritischen Zellen im Vergleich zu

Monozyten um 39% und fiel bei den reifen um 26% im Vergleich mit den unreifen Dendritischen Zellen ab.

Ebenfalls ließ sich ein Anstieg des T-Lymphozyten stimulierenden Oberflächen-Antigens CD80 um 40% im Vergleich von Monozyten zu Dendritischen Zellen nachweisen.

CD86, das zusammen mit CD80 für die Stimulierung von T-Lymphozyten zuständig ist, fiel im Vergleich zu den Monozyten bei den unreifen Dendritischen Zellen leicht, stieg bei den reifen jedoch leicht an, was analog in der Literatur so beschrieben wurde⁹⁹.

Bei CD83, das in einigen Arbeiten^{100,98} als spezifisch für reife Dendritische Zellen beschrieben wird, in anderen¹⁰¹ aber von negativ bis stark positiv variiert, konnte in dieser Arbeit ein Absinken von 29% bei den unreifen Dendritischen Zellen nachgewiesen werden, bei den reifen stieg er dagegen um 22% im Vergleich zu den unreifen an.

Die so anhand ihrer Oberflächenmarker sowie ihrer unter dem Mikroskop dargestellten makroskopischen Morphologie, die sich in Übereinstimmung mit der Literatur³ veränderte, als Dendritische Zellen definierten Zellen wurden in dieser Arbeit für alle Versuche verwendet.

Die Angabe der Prozentzahlen dient hier lediglich der Orientierung, insgesamt unterliegt die Expression der Oberflächenmarker einer großen Streubreite, die in einer derart kleinen Versuchsreihe nicht ausgeglichen werden kann. Daher ist hier lediglich die Tendenz zu verwerthen.

Weiterhin sollte nun dargestellt werden, dass diese Dendritischen Zellen Rezeptoren für Neurotrophine (TRKA, TRKB und TRKC) exprimieren. Dies wird in der Literatur bereits für Dendritische Zellen¹⁰², wie auch für andere Zellen des hämatopoietischen Systems beschrieben⁷⁶.

Dazu wurden mit Hilfe der Reverse Transkriptase - Polymerase Ketten Reaktion (RT-PCR) die Dendritischen Zellen auf das Vorhandensein von mRNA für diese Rezeptoren untersucht.

Hierbei zeigte sich, dass zumindest die mRNA für den TRKA-Rezeptor, den Rezeptor für NGF, regelmäßig vorhanden war (der positive Nachweis schwankte zwischen 62,5% und 87,5%). Damit kann man davon ausgehen, dass Dendritische Zellen, wie bereits 1997 von Labouyrie et al. beschrieben¹⁰³, diesen Rezeptor exprimieren.

Von TRKB, den Rezeptor für BDNF, ließ sich praktisch keine mRNA für die extracelluläre Domäne nachweisen, jedoch war die verkürzte Rezeptorform (Truncated) bei den unreifen zu 62,5% und bei den reifen zu 87,5% vorhanden. Auch die Kinase Domäne ließ sich bei den reifen Dendritischen Zellen gut nachweisen (87,5%), jedoch schwankten hier die Monozytenwerte als Ausgangspunkt sehr stark: 12,5% bei den unreifen Dendritischen Zellen und 62,5% bei den reifen, so dass eine Aussage über eine vermehrte Bildung der mRNA für diesen Rezeptorteil bei den reifen Dendritischen Zellen nicht möglich ist. Da die extracelluläre Domäne dieses Rezeptors in der mRNA-Untersuchung nicht nachweisbar war, könnte es sein, dass dieser Rezeptor lediglich im Cytoplasma vorhanden ist und eventuell einen bestimmten Reiz benötigt um eine extracelluläre Domäne zu exprimieren. Damit ist in dem untersuchten Stadium keine katalytische Wirkung durch BDNF auf Dendritische Zellen zu erwarten. Dieser Aspekt muss jedoch kritisch betrachtet werden, da es sich auch um ein „Nachweisproblem“ handeln könnte, da auch die positiv-Kontrolle nicht durchgehend nachweisbar war.

TRKC, der Rezeptor für NT-3, zeigte eine gute Expression der mRNA für die Kinase Domäne in allen getesteten Zellen. Jedoch zeigte sich hier interessanterweise ein deutlicher Anstieg der mRNA für die extracelluläre Domäne von Monozyten zu Dendritischen Zellen. Dieser Anstieg ist bei den unreifen Dendritischen Zellen (0,0% bei den Monozyten, -75% bei den unreifen Dendritischen Zellen, 37,50% bei den reifen) noch stärker ausgeprägt als bei den reifen. Dies könnte auf einen „Switch“ in der Reaktion auf NT-3 hinweisen. Einen Anstieg zeigte jedoch auch die „verkürzte“ Form von TRKC, die keine katalytische Wirksamkeit besitzt, jedoch eventuell regulierend in andere Regelkreise eingreifen kann¹⁰⁴. Dies hat zur Folge, dass auch NT-3 eine Wirkung auf Dendritische Zellen haben könnte.

Um zu zeigen, dass die Neurotrophine eine Wirkung auf Dendritische Zellen haben können, wurde mit Hilfe des FACScan eine Veränderung in der Antigen-Expression nach Zugabe der verschiedenen Neurotrophine überprüft. Eine Veränderung dieser Antigene konnte Chang YC. et al. 2004 durch Zugabe von decoy receptor 3 nachweisen¹⁰⁵. Getestet wurden in dieser Arbeit Monozyten und unreife Dendritische Zellen ohne und nach Inkubation mit den verschiedenen Neurotrophinen.

Dargestellt werden konnte hier im Vergleich von Monozyten zu Dendritischen Zellen ohne Neurotrophin-Zugabe, dass wiederum CD14 deutlich abfiel, dass CD4 und CD45 anstiegen, CD3, CD8 und CD19 hingegen abfielen.

Nach den Ergebnissen der PCR war ein Einfluss von BDNF und NT-4 (beide wirken hauptsächlich über TRKB) nicht zu erwarten. Dies konnte auch bestätigt werden, da die so inkubierten Zellen, außer bei CD19, das abfiel, praktisch mit den unreifen Dendritischen Zellen übereinstimmten.

NGF hingegen zeigte bei CD3, CD8 und CD19 ein vermehrtes Absinken, interessanterweise konnte bei CD14 ein Anstieg (bei der sehr kleinen Versuchsreihe - über 20% mit einer Standardabweichung von ca. 5%) festgestellt werden. Dies könnte auf eine Veränderung der Oberflächenantigene durch NGF hinweisen, jedoch sollte dies durch eine größer angelegte Versuchsreihe bestätigt werden.

NT-3, das seine Wirkung über TRKC vermittelt, zeigte bei CD19 einen Anstieg von über 25%; dieser Wert zeigt jedoch eine extreme Standardabweichung, sodass hieraus keine Schlussfolgerung gezogen werden kann.

Die folgenden Versuche auf weitere Funktionsbereiche der Dendritischen Zellen wurden nur mit dem Nerve Growth Factor durchgeführt, da die mRNA für dessen Rezeptor (TRKA) am stabilsten nachweisbar war. Effekte des NGF sind bereits auf viele hematopoietische Zellreihen wie Mastzellen oder basophile Zellen und Granulozyten beschrieben. Bei diesen Zellen moduliert NGF die Ausreifung und die Vermehrung, und stimuliert die Expression bestimmter Oberflächenantigene^{106,107}. Zudem zeigt sich ein deutlicher Anstieg der Synthese des NGF in verletztem oder entzündlich verändertem Gewebe, so dass von einem Einfluss des NGF auf Reparaturvorgänge im Körper ausgegangen werden kann¹⁰⁸.

Als erste Funktion sollte nun die Phagozytosefähigkeit als grundlegender Baustein und erster Schritt in der Entwicklung der Dendritischen Zellen auf eine Veränderung durch NGF untersucht werden. Eine Zunahme der Phagozytose von Makrophagen durch NGF konnten schon 1991 Kannan Y. et al.¹⁰⁹, sowie 1996 Susaki Y. et al.⁹² nachweisen.

Es wäre von Vorteil, wenn diese Fähigkeit der Dendritischen Zellen effizienter genutzt werden könnte. In vivo könnten die unspezifische wie auch die spezifische Abwehr verbessert werden. Auch in vitro wäre es günstig, die Antigenaufnahme zur Sensibilisierung der von einem Patienten isolierten Dendritischen Zellen durch NGF modulieren zu können. Die Immunisierung mit Dendritischen Zellen könnte so effektiver gestaltet werden.

Zunächst wurde ein qualitativer Test auf Chamberslides mit Latexbeads und mit oppsonierten und nicht oppsonierten Erythrozyten durchgeführt. Dieser zeigte, dass Dendritische Zellen eine

gute Phagozytosefähigkeit haben. Es lies sich hier jedoch kein quantitativer Unterschied zwischen reifen und unreifen Zellen feststellen.

Die Ergebnisse sollten daher im FACScan mit fluoreszierenden Latexbeads objektiviert werden. Dabei zeigte sich der bereits in der Literatur¹¹⁰ beschriebene und durch den Entwicklungsweg der Zellen leicht verständliche Effekt, dass die reifen Dendritischen Zellen eine deutlich geringere Phagozytose zeigten. Es lag hier ein Unterschied von 51% zu den unreifen Zellen vor. Eine Varianzanalyse belegte einen statistisch signifikanten Unterschied. Trotz einer relativ großen Streubreite bei den reifen Dendritischen Zellen.

Der Einfluss von NGF war bei den ohnehin sehr stark phagozytierenden unreifen Dendritischen Zellen kaum vorhanden, dies zeigt sich in der geringen Abnahme von 3%.

Bei den reifen Dendritischen Zellen hingegen zeigte sich eine Zunahme der Phagozytose um 26%, dies könnte tatsächlich auf eine Verbesserung der Phagozytosefähigkeit bei den reifen Dendritischen Zellen hinweisen. Eine Varianzanalyse dieser Daten war jedoch mit einem p-Wert von 0,09 bei einem Signifikanzniveau von 0,05 nicht signifikant. Jedoch kann man von einer Tendenz sprechen.

Dieser Effekt sollte im Hinblick auf eine weitere Funktion der Dendritischen Zellen, nämlich der Migration überprüft werden. Eine reine Verbesserung der Phagozytosefähigkeit könnte, besonders auch in Kombination mit der verminderten Suppression von CD14 durch NGF, wie in dem Stimulationstest bei leider sehr niedriger Versuchszahl gezeigt, ein Zeichen für eine Verzögerung der Ausreifung sein.

Ebenso sollten in weiteren Arbeiten andere Funktionen, wie Antigen-Präsentation und Stimulation von Lymphozyten, getestet werden.

Das Migrationsverhalten der Dendritischen Zellen wird durch die Expression von Chemokinrezeptoren gesteuert. Hervorzuheben sind besonders der CCR 1 und der CCR 5 bei unreifen Dendritischen Zellen, die durch ihre Liganden, z.B. MIP-1 α und MCP-3 in Richtung entzündlich verändertes Gewebe migrieren¹¹¹. Bei den reifen Dendritischen Zellen, ist der entscheidende Rezeptor der CCR 7, dessen Ligand MIP-3 β die Zellen in die sekundären Lymphorgane „lockt“¹¹².

Chemokine und ihre Rezeptoren sind für das Migrationsverhalten aller immunkompetenten Zellen verantwortlich, dies wurde auch bereits von Sozzani et al. für die Dendritischen Zellen nachgewiesen¹¹³. Im Rahmen der Entwicklung der Dendritischen Zellen – zunächst Antigenaufnahme im geschädigten Gewebe, anschließend Präsentation der Antigene in sekundären Lymphorganen – haben diese Rezeptoren eine besondere Bedeutung. Die Expression der Rezeptoren muss sich im Laufe der Reifung verändern.

In Übereinstimmung mit der Literatur^{114,115} konnte die Entwicklung der Chemokinrezeptoren im RNase Protection Assay nachgewiesen werden. Die Menge der Gesamt-RNA für die verschiedenen Chemokinrezeptoren zeigte einen deutlichen „Switch“. Dieser konnte jedoch nur qualitativ ausgewertet werden, da ein Abgleich der Expression der „House keeping genes“ aus technischen Gründen nicht möglich war. Die Ergebnisse waren jedoch in allen fünf Versuchsreihen einheitlich.

Es konnte gezeigt werden, dass im Laufe der Reifung CCR1 und CCR5 abfielen. Durch dieses Absinken kommt es zu einem verminderten Reiz durch Entzündungsmediatoren und die Dendritischen Zellen „können das geschädigte Gebiet verlassen“.

Der parallel zu diesem Abfall erfolgende Anstieg von CXCR4 und CCR7/BLR2, den Rezeptoren für die von sekundären Lymphorganen, wie Lymphknoten, Milz oder Peyersche Plaques ausgeschütteten Liganden EBI1 Ligand Chemokine (ELC) und Macrophage Inflammatory Protein-3 β (MIP3- β), bewirkt einen Migrationsreiz zu diesen Organen.

Genau diese Entwicklung ist bereits mehrfach beschrieben worden^{22,87-89} und konnte ebenfalls in allen Versuchen dargestellt werden.

NGF zeigte bei den unreifen Dendritischen Zellen keinen Einfluss auf die Rezeptoren der Entzündungsmediatoren CCR1 und CCR5. Jedoch stiegen CXCR4, der Rezeptor für SDF-1 α , welches eine Rolle im Schutz der Zelle vor einer HIV-1-Infektion spielt¹¹⁶, und CCR7, der Rezeptor für MIP-3 β , scheinbar an und erreichten bei visueller Auswertung ähnliche Werte wie bei den reifen Dendritischen Zellen. Dies zeigt eventuell eine Beschleunigung der Migration in Richtung sekundärer Lymphorgane. Es müsste überprüft werden, ob die entsprechenden Rezeptoren auch wirklich früher an der Zelloberfläche exprimiert oder eventuell nur verstärkt im Cytoplasma gebildet werden um bei der Ausreifung, ausgelöst durch Entzündungsmediatoren, schneller exprimiert zu werden.

Bei den reifen Dendritischen Zellen konnte keine Veränderung der Gesamt-RNA für Chemokinrezeptoren unter NGF-Inkubation nachgewiesen werden.

Sollte der Nerve Growth Factor tatsächlich die Expression von CCR7 und CXCR4 bei den unreifen Dendritischen Zellen beschleunigen, könnte dies, zusammen mit der verbesserten Phagozytose der reifen Dendritischen Zellen unter NGF Inkubation, die Wirkung der Dendritischen Zellen intensivieren.

Die Ergebnisse sind jedoch nicht statistisch signifikant und zumeist auch nur in kleinen Versuchsreihen nachgewiesen, sodass leider keine definitive Aussage zu einer Wirkung von NGF auf Dendritische Zellen getroffen werden kann. Die Ergebnisse müssten in größer angelegten Versuchsreihen überprüft werden.

8. Zusammenfassung

Dendritische Zellen verbinden die unspezifische mit der spezifischen Abwehr. Damit sind sie vielleicht die wichtigsten Zellen in unserem Immunsystem. Während ihrer Reifung verändert sich ihr Funktionsprofil. Sie entwickeln sich von stark phagozytierenden Zellen, also Zellen der unspezifischen Abwehr, zu speziellen Antigen-präsentierenden und T-Lymphozyten stimulierenden Zellen, wodurch sie eine spezifische Immunantwort auslösen.

Durch die Möglichkeit diese Zellen zu isolieren und sie in vitro auf ein bestimmtes Antigen zu sensibilisieren, könnten diese Zellen in naher Zukunft zu einem wichtigen Bestandteil in der Therapie verschiedenster Erkrankungen werden, indem sie, wieder in den Körper eingebracht, eine spezifische Immunantwort gegen dieses Antigen auslösen.

In dieser Arbeit wurde nun eine mögliche Einflussnahme des Nerve Growth Factor über seinen Rezeptor TRKA auf die Phagozytose und das Migrationsverhalten der Dendritischen Zellen bzw. auf Veränderungen der Oberflächeneigenschaften getestet.

Dazu wurden die Dendritischen Zellen zunächst an Hand ihrer Oberflächenantigene charakterisiert. Anschließend erfolgte mit diesen Zellen, in Übereinstimmung mit der Literatur, die Darstellung der Veränderung der Phagozytose und der Genexpression für Chemokinrezeptoren im Laufe der Entwicklung der Dendritischen Zellen.

Um nachzuweisen, ob eine Einflussnahme der Neurotrophine auf die Dendritischen Zellen zu erwarten ist, wurde zunächst, mithilfe der RT-PCR, das Vorhandensein von mRNA für die entsprechenden TRK-Rezeptoren auf Dendritischen Zellen nachgewiesen. Dies gelang am zuverlässigsten für den TRK-A-Rezeptor, so dass die wichtigsten Versuche nur mit NGF, welches auch bei anderen phagozytierenden Zellen eine modulierende Wirkung zeigt, durchgeführt wurden.

Unter NGF-Inkubation konnte eine Verbesserung der Phagozytose der reifen Dendritischen Zellen nachgewiesen werden. Dieser Einfluss ließ sich jedoch in einer Varianzanalyse nicht eindeutig statistisch belegen.

NGF veränderte auch die Genexpression für Chemokinrezeptoren: Besonders interessant ist hier der regelmäßige Anstieg des CCR7 bei den unreifen Dendritischen Zellen. Hierdurch könnte

eine Veränderung im Migrationsverhalten ausgelöst werden. Sollten unreife Dendritische Zellen hierdurch schneller zu den sekundären Lymphorganen gelangen können, wäre dies ein guter Ansatz zur Modulation der Therapie mit Dendritischen Zellen.

Ein anderer Aspekt ist die Veränderung der Expression des Oberflächenmarkers CD14 durch NGF. Dieser Marker fällt im Laufe der Reifung der Dendritischen Zellen deutlich ab, wobei der Abfall scheinbar durch NGF behindert wird, was eine verlangsamte Ausreifung bedeuten könnte. Jedoch ist auch dieser Effekt nicht statistisch belegbar und nur in kleinen Versuchsreihe nachgewiesen.

Dieser Verlangsamung der Ausreifung steht die Vermehrung der Genexpression für die Chemokinrezeptoren, welche bei den unreifen Dendritischen Zellen die Migration in Richtung sekundärer Lymphorgane steuern, entgegen. Dies wäre ein Zeichen für eine beschleunigte Reifung.

Durch die Kombination dieser Effekte kann man vielleicht auch auf eine insgesamt verbesserte Wirkung der Dendritischen Zellen durch Inkubation mit NGF schließen, wodurch die Wirkungen von unreifen und reifen Dendritischen Zellen miteinander kombiniert werden könnten.

Ob dies wirklich eine Verbesserung der Funktionsweise der Dendritischen Zellen bringt, müsste jedoch durch Untersuchung weiterer Funktionen der Dendritischen Zellen wie zum Beispiel tatsächliches Migrationsverhalten oder Veränderungen in der Stimulation von T- und B-Zellen definitiv dargestellt werden.

9. Abkürzungsverzeichnis

(m-) RNA:	(Messenger-) Ribonukleinsäure
(RT-) PCR:	(Reverse Transkriptase-) Polymerase Ketten Reaktion
BDNF:	Brain Derived Neurotrophic Factor
bp:	Basenpaar
CCR:	Chemokinrezeptor
CD:	Cluster of Differentiation
DC:	Dendritische Zelle
DNA:	Desoxyribonukleinsäure
ECD:	Extrazelluläre Domäne
ELC:	EBI1 (CCR7) Ligand Chemokin
FACS :	Fluorescence activated cell sorter
FSC:	Forward Scatter
GM-CSF:	Ganulozyten-Makrophagen Kolonie Stimulierender Faktor
IL:	Interleukin
KIN:	Kinase Domäne
MCP3:	Monocyte Chemotactic Protein-3
MFI:	Mean Fluorescence Intensity
MHC:	Major Histocompatibility complex
MIP:	Macrophage Inflammatory Protein
NGF:	Nerve Growth Factor
NK-Zellen:	Natürliche Killerzellen
NT:	Neurotrophin
RPA:	RNase Protection Assay
SSC:	Side Scatter
TNF- α :	Tumor-Nekrose Faktor α
TRK:	Tropomyosin Rezeptor Kinase
TRUNC:	Truncated (verkürzte) Domäne

10. Literaturverzeichnis

- ¹ Steinmann R.M., Cohn Z.A. (1973): Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. *J. Exp Med.* 137:1142-1162
- ² Rescigno M., Granucci F., Ricciardi-Castagnoli.(1999): Dendritic cells at the end of the millenium. *Immunol. Cell. Biol.* 77:404-410
- ³ Hart D.N.J. (1997): Dendritic cells: Unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 90:3245-3287
- ⁴ Steinmann R.M., Pack M., Inaba K. (1997): Dendritic cell development and maturation. *Adv. Exp. Med. Biol.*417:1-6
- ⁵ Romani N., Schuler G. (1992): The immunologic properties of epidermal langerhans cells as part of the dendritic cell system. *Springer. Semin. Immunopathol.* 13:265-279
- ⁶ Austyn J.M. (1992): Antigen uptake and presentation by dendritic leukocytes. *Semin. Immunol.* 4:227-236
- ⁷ Matsuno K., Ezaki T., Kudo S., Uehara Y. (1996): A life stage of particle-laden rat dendritic cells in vivo: their division, active phagozytosis and translocation from the liver to the draining lymph. *J. Exp. Med.* 183:1856-1878
- ⁸ Barfoot R., Denham S., Gyure L.A., Hall J.G., Hobbs S.M., Jackson L.E., Robertson D. (1989): Some properties of dendritic makrophages from peripheral lymph. *Immunol.* 68:233-239
- ⁹ Egner W., Andreesen R., Hart D.N.J. (1993): Allostimulatory cells in fresh human blood: Heterogeneity in antigen presenting cell populations. *Transplantation* 56:945-950
- ¹⁰ Thomas R., Avis L.S., Lipsky P.E. (1993): Comparative accessory cell function of human peripheral blood dendritic cells and monocytes. *J. Immunol.* 151:6840-6852
- ¹¹ Caux C., Massacrier C., Vanbervliet B., Dubois B., Durand I-Cella M., Lanzavecchia A., Banchereau J. (1997): CD34+ hematopoietic progenitors from human cord blood differentiate along two independent dendritic cell pathways in response to GM-CSF + TNF- α : II functional analysis. *Blood* 90: 1458-1470
- ¹² Dubois B., Vanbervliet B., Fayette J., Massacrier C., Van Kooten C., Briere F., Banchereau J., Caux C. (1997): Dendritic cells enhance growth and differentiation of CD40 activated B-lymphocytes. *J. Exp.Med.* 185:941-951
- ¹³ Bagglioni M., Dewald B., Moser B. (1994): Interleukin-8 and related chemotactic cytokines: CXC- and CC- chemokines. *Adv Immunol.* 55:97-179

-
- ¹⁴ Strieter R.M., Koch A.E., Antony V.B., Fick R.B., Standiford T.J., Kunkel S.L. (1994): The immunopathology of chemotactic cytokines: the role of interleukin-8 and monocyte chemoattractant protein-1. *J. Lab. Clin. Med.* 123:183-197
- ¹⁵ Freudenthal P.S., Steinmann R.M. (1990): The distinct surface of human blood dendritic cells, as observed after an improved isolation method. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:7698-7702
- ¹⁶ McWilliam A.S., Nelson D., Thomas J.A., Holt P.G. (1994): Rapid dendritic cell recruitment is a hallmark of the acute inflammatory response at mucosal surfaces. *J. Exp. Med.* 179:1331-1336
- ¹⁷ Inaba K., Inaba M., Naito M., Steinmann R.M. (1993): Dendritic cell progenitors phagocytose particulate, including bacillus Calmette-Guerin organisms, and sensitize mice to mycobacterial antigens in vivo. *J. Exp. Med.* 178:479-488
- ¹⁸ Moll H., Fuchs H., Blank C., Rollinghoff M. (1993): Langerhans cells transport *Leishmania major* from the infected skin to the draining lymph node for presentation to antigen specific T-cells. *Eur. J. Immunol.* 23:1595-1601
- ¹⁹ Reis e Sousa C., Stahl P.D., Austyn J.M. (1993): Phagocytosis of antigens by Langerhans cells in vitro. *J. Exp. Med.* 178:509-519
- ²⁰ Sallusto F., Cella M., Daniel C., Lanzavecchia A. (1995): Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the MHC class II compartment. Downregulation by cytokines and bacterial products. *J. Exp. Med.* 182:389-400
- ²¹ Drexhage HA., Mullink H., de Groot J., Clarke J., Balfour BM. (1979): A study of cell present in peripheral lymph of pigs with special reference to a type of cell resembling the Langerhans cell. *Cell Tissue Res.* 202:407-430
- ²² Sozzani, S., Allavena, P., D'Amico, G., Luini, W., Bianchi, G., Kataura, M., Imai, T., Yoshie, O., Bonocchi, R., Mantovani, A. (1998): Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J Immunol* 161:1083-1086
- ²³ Boes M., Cerny J., Massol R., Op den Brouw M., Kirchhausen T., Chen J., Ploegh H.L. (2002): T-cell engagement of dendritic cells rapidly rearranges MHC class II transport. *Nature* 418(6901): 983-988
- ²⁴ Mizel S.B. (1982): Interleukin-1 and T-cell activation. *Immunol. Rev.* 63:51-72
- ²⁵ Kishimoto T. (1989): The biology of interleukin-6. *Blood* 74:1-10
- ²⁶ Koch F., Stanzl U., Jennewein P., Janke K., Heufler C., Kampagem E., Romani N., Schuler G. (1996): High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10. *J. Exp. Med.* 184: 741-747
- ²⁷ Brocker T., Karjalainen K. (1997) Target expression of MHC class II molecules demonstrates that dendritic cells can induce negative but no positive selection of thymocytes in vivo. *J. Exp. Med.* 185:541-550

-
- ²⁸ Steinbach F., Gieseler R., Soruri A., Krause B., Peters JH. (1997): Myeloid DCs deduced from monocytes. *Adv. Exp. Med. Biol.* 417:27-32
- ²⁹ Zhou LJ., Tedder FT. (1996): CD14+ Blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 93(6): 2588-2592
- ³⁰ Winzler C., Rovere P., Zimmermann V.S., Davoust J., Rescigno M., Citterio S., Ricciardi-Castagnoli P. (1997) Checkpoint and functional stages in DC maturation. *Adv. Exp. Med. Biol.* 417:59-64
- ³¹ Mayordomo JL., Zorina T., Storkus WJ., Zitvogel L., Celluzzi C., Falo LD., Melief CJ., Ildstad ST., Kast WM., Deleo AB. (1995): Bone marrow derived dendritic cells pulsed with synthetic tumor peptides elicit protective and therapeutic antitumor immunity. *Nat. Med.* 1:1297-1302.
- ³² Nestle, FO., Alijagic S., Gilliet M., San Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G., Schadendorf D. (1998): Vaccination of melanoma patients with peptide- or tumor lysate-pulsed dendritic cells. *Nat. Med.* 4:328-332
- ³³ Albert ML., Pearce SF., Francisco LM., Sauter B., Kery P., Silverstein RL., Bhardwaj JH. (1998): Immature dendritic cells phagocytose apoptotic cells via $\alpha\beta 5$ and CD36, and cross-presenting antigens to cytotoxic T-lymphocytes. *J. Exp. Med.* 188:1359-1368
- ³⁴ Paglia, P., Chiodoni C., Rodolfo M., Colombo MP. (1996): Murine dendritic cells loaded in vitro with soluble protein prime cytotoxic T-Lymphocytes against tumor antigen in vivo. *J. Exp. Med.* 183:317-322
- ³⁵ Boczkowski D., Nair SK., Snyder D., Gilboa E. (1996): Dendritic cells pulsed with RNA are potent antigen-presenting cells in vitro and in vivo. *J. Exp. Med.* 184:465-472
- ³⁶ Duane AM., Smita KN. (2000): RNA-transfected dendritic cells in cancer immunotherapy. *J. Clin. Invest.* 106(9):1065-1069
- ³⁷ Bellone M., Cantarella D., Castiglioni P., Crosti MC., Ronchetti A., Moro M., Garancini MP., Casorati G., Dellabona P. (2000): Relevance of tumor antigen in the validation of three vaccination strategies for melanoma. *J. Immunol.* 165(5):2651-2656
- ³⁸ Santin AD., Bellone S., Ravaggi A., Pecorelli S., Annon MJ., Parham GP. (2000): Induction of ovarian tumor-specific CD8+ cytotoxic T lymphocytes by acid-eluted peptide-pulsed autologous dendritic cells. *Obstet. Gynecol.* 96(3):422-430
- ³⁹ Pirtskhalaishvili G., Shurin GV., Gambotto A., Esche C., Wahl M., Yurkovetsky ZR., Robbins PD., Shurin MR. (2000): Transduction of dendritic cells with Bcl-xL increases their resistance to prostate cancer-induced apoptosis and antitumor effect in mice. *J. Immunol.* 165(4):1956-1964
- ⁴⁰ Galea-Lauri J., Darling D., Mufti G., Harrison P., Farzaneh F. (2002): Eliciting cytotoxic T lymphocytes against myeloid leukemia-derived antigens: evaluation of dendritic cell-leukemia cell hybrids and other antigen-loading strategies for dendritic cell-based vaccination. *Cancer Immunol. Immunother.* 51(6):299-310

-
- ⁴¹ Katsenelson N.S., Shurin G.V., Bykvsckaya S.N. et al. (2001): Human small cell lung carcinoma and carcinoid tumor regulate dendritic cell maturation and function. *Mod. Pathol.* 14(1):40-45
- ⁴² Piguet V., Blauvelt A. (2002): Essential roles for dendritic cells in the pathogenesis and potential treatment of HIV disease. *J. Invest. Dermatol.* 119(2):365-369
- ⁴³ Lewinsohn D.A., Lines R.A., Lewinsohn D.M. (2002): Human dendritic cells presenting adenovirally expressed antigen elicit mycobacterium tuberculosis – specific CD8+ T cells. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 166(6):843-848
- ⁴⁴ Morelli AE., O'Connell PJ., Khanna A., Logar AJ., Lu L., Thomson AW. (2000): Preferential induction of Th1 responses by functionally mature hepatic (CD8alpha- and CD8alpha+) dendritic cells: association with conversion from liver transplant tolerance to acute reaction. *Transplantation* 69(12):2647-2657
- ⁴⁵ Jung E. (1992): *Lehrbuch der Dermatologie, Duale Reihe*
- ⁴⁶ Ibelgaufts H. (1992): *Lexikon der Zytokine.* Medikon Verlag, S. 101-105
- ⁴⁷ Steinbach F., Gieseler R., Soruri A., Krause B., Peters JH. (1997): Myeloid DCs deduced from Monocytes. In-vitro and in vivo support a monocytic origin of DCs. *Adv. Exp. Med. Biol.* 417:27-32
- ⁴⁸ Ruppert J., Schütt C., Ostermeier D., Peters J. H. (1993) Down-regulation and release of CD14 on human monocytes by IL-4 depends on the presence of serum or GM-CSF. *Adv. Exp. Med. Biol.* 329:275-280
- ⁴⁹ Caux C., Dezutter-Dambuyant C., Schmitt D., Banchereau J. (1992) GM-CSF and TNF- α cooperate in the generation of dendritic langerhans cells. *Nature* 360:258-261
- ⁵⁰ Romani N., Reider D., Heuer M., Abner S., Kampgen E., Eibl B., Niederwieser D., Schuler G. (1996): Generation of mature dendritic cells from human blood: an improved method with special regard to clinical applicability. *J. Immunol. Meth.* 196:137-151
- ⁵¹ Xu H., Kramer M., Spengler HP., Peters JH. (1995): Dendritic cells differentiated from human monocytes through a combination of IL-4, GM-CSF and IFN- γ exhibit phenotype and function of blood dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 378:75-78
- ⁵² Matsuda H., Coughlin M.D., Bienenstock J., Denburg J.A. (1988) Nerve growth factor promote human hemopoietic colony growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:6508-6512
- ⁵³ Valenzuele D., Maisonpierre P., Galss D., Rojas E., Nunez L., Kong Y., Gies D., Stitt T., Ip N., Yancopoulos G. (1993): Alternative forms of rat trkC with different functional capabilities. *Neuron* 10:963-974

-
- ⁵⁴ Klein R., Conway D., Barbacid M. (1990): The TRKB tyrosine protein kinase codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* 61:647-656
- ⁵⁵ Jing S., Tapley B., Barbacid M. (1992): Nerve growth factor mediates signal transducing through Trk homodimer receptors. *Neuron* 9(6) :1067-1079
- ⁵⁶ Lindsay RM., Wiegand SJ., Di Stefano PS. (1994): Neurotrophic factors: from molecule to man. *Trends Neurosci.* 17:182-190
- ⁵⁷ Kaplan D.R., Hempstead B.L., Martin-Zanca D., Chao M.V., Parada L.F. (1991): The TRK proto-oncogene product: a signal transducing receptor for nerve growth factor. *Science* 252:554-558
- ⁵⁸ Klein R., Jing S.Q., Nanduri V., O'Rourke E., Barbacid M. (1991): The TRK proto-oncogene encodes a receptor for nerve growth factor. *Cell* 65:189-197
- ⁵⁹ Klein R., Nanduri V., Jing S.Q., Lamballe F., Tapley P., Bryant S., Cordon-Cardo C., Jones K.R., Reichardt L.F., Barbacid M. (1991): The TRKB tyrosine protein kinase is a receptor for brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3. *Cell* 1991 66:967-979
- ⁶⁰ Ip N., Ibanez C., Nyc S., McClain J., Jones P., Gies D., Belluscio L., Le Beu M., Espinosa M.I., Squinto R., Persson H., Yancopoulos G.D. (1992): Mammalian neurotrophin-4: structure, distribution and receptor specificity. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:3060-3064
- ⁶¹ Lamballe F., Klein R., Barbacid M. (1991): TrkC, a new member of the trk family of tyrosine protein kinases, is a receptor for neurotrophin-3. *Cell* 66:967-979
- ⁶² Ehrhard P.B., Ganter U., Bauer J., Otten U. (1993): Expression of functional trk-proto-oncogene in human monocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:5423-5427
- ⁶³ Horigome K., Pryor J.C., Bullock E.D., Johnson E.M. (1993): Mediator release from mast cells by nerve growth factor. Neurotrophin specificity and receptor mediation. *J. Biol. Chem.* 268:1481-1487
- ⁶⁴ Tam S.Y., Tsai M., Yamaguchi M., Yano K., Butterfield J.H., Galli S.J. (1997): Expression of functional TRKA receptor tyrosine kinase in the HMC-1 human mast cell line and in human mast cells. *Blood* 90:1807-1820
- ⁶⁵ Ehrhard P.B., Erb P., Graumann U., Otten U. (1993): Expression of nerve growth factor and nerve growth factor receptor tyrosine kinase TRK in activated CD4 positive T-cell clones. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:10984-10988
- ⁶⁶ Otten U., Scully J.L., Ehrhard P.B., Gadiant R.A. (1994): Neurotrophins: signals between the nervous and immune system. *Prog. Brain Res.* 103:293-305
- ⁶⁷ Barbacid M. (1994): The TRK family of neurotrophin receptors. *J. of Neurobiology.* 25:1379
- ⁶⁸ Ehrhard P.B., Erb P., Graumann U., Schmutz B., Otten U. (1994): Expression of functional trk tyrosine kinase receptors after T-cell activation. *J Immunol.* 152:2705-2709

-
- ⁶⁹ Torcia M., Bracci-Lauderio L., Lucibello M., Nencioni L., Labardi D., Rubarteli A., Cozzolino F., Aloe L., Garci E. (1996): Nerve growth factor is an autocrine survival factor for memory B lymphocytes. *Cell* 85:245-356
- ⁷⁰ Otten U., Ehrhard P., Peck R. (1989): Nerve growth factor induces growth and differentiation of human B Lymphocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86:10059-10063
- ⁷¹ Thorpe L.W., Werrbach-Perez W.K., Perez-Polo J.R. (1987): Effects of nerve growth factor on the expression of Interleukin-2 Receptors on cultured human lymphocytes. *Ann. NY Acad. Sci.* 496:310-311
- ⁷² Gudat F., Laubscher A., Otten U., Pletschner A. (1981): Shape changes induced by biologically active peptides and nerve growth factor in blood platelets of rabbits. *Br. J. Pharmacol.* 74:533-538
- ⁷³ Leon A., Buriani A., Dal Toso R., Fabris M., Romanello S., Aloe L., Levi-Montalcini R. (1994): Mast cells synthesize, store and release nerve growth factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:2739-2743
- ⁷⁴ Susaki Y., Shimizu S., Katakura K., Watanabe N., Kawamoto K., Matsumoto M., Tsudzudi M., Furusaka T., Kitamura Y., Matsuda H. (1996): Functional Properties of murine macrophages promoted by nerve growth factor. *Blood* 88:4630-4637
- ⁷⁵ Gee A.P., Boyle M.D., Munger K.L., Lawman M.J.P., Young M. (1983): Nerve growth factor: Stimulation of polymononuclear leukocyte chemotaxis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:7215-7218
- ⁷⁶ Maroder M., Bellavia D., Meco D., Napolitano M., Stigliano A., Alessa E., Vacca A., Giannini G., Frati L., Gulino A., Scrpanti I. (1996): Expression of trkB neurotrophine receptor during T-cell development: role of brain derived neurotrophic factor on thymocyte survival. *J Immunol*, 157:2864-2872
- ⁷⁷ Benjamin Lewin (1994): *Genes V*. Oxford University Press S.330ff
- ⁷⁸ Cunningham M.E., Greene L.A. (1998): A function-structure model for NGF-activated TRK. *EMBO J.* 17(24):7282-7293
- ⁷⁹ Frade J.M., Barde Y.A. (1998): Nerve growth factor: two receptors, multiple functions. *Bioessays* 20(2):137-145
- ⁸⁰ Middlemas D.S., Lindberg R.A., Hunter T. (1991): TRKB, a neural receptor protein-tyrosin kinase: evidence for a full-length and two truncated receptors. *Moll. Cell. Biol.* 11:143-153
- ⁸¹ Klein R., Parada L.F., Coulier F., Barbacid M. (1989): TRKB, a novel tyrosin protein kinase receptor expressed during mouse neural development. *EMBO J.* 8:3701-3709

-
- ⁸² Klein R., Conway D., Parada L.F., Barbacid M. (1990): The TRKB tyrosine protein kinase gene codes for a second neurogenic receptor that lacks the catalytic kinase domain. *Cell* 61:647-656
- ⁸³ Schneider R., Schweiger M. (1991): A novel modular mosaic of cell adhesion motifs in the extracellular domains of the neurogenic trk and trkB tyrosinekinase receptors. *Oncogene* 6:1807-1811
- ⁸⁴ Lamballe F., Tapley P., Barbacid M. (1993): Trk C encodes multiple neurotrophin-3 receptors with distinct biological properties and substrate specificities. *EMBO J.* 12:3083-3094
- ⁸⁵ Tsoulfas P., Soppet D., Escandon E., Tessarollo L., Mendoza-Ramirez J.L., Rosenthal A., Nikolics K., Parada L.F. (1993): The rat trkC locus encodes multiple neurogenic receptors that exhibit differential response to neurotrophin-3 in PC12 cells. *Neuron* 10:975-990
- ⁸⁶ Oppenheim J.J. (1993): Overview of chemokines. *Adv. Exp. Med. Biol.* 351:183-186
- ⁸⁷ Rollins B.J. (1997): Chemokines. *Blood* 90:909-928
- ⁸⁸ Sozzani S., Allavena P., D'Amico G., Luini W., Giancarlo B., Motoji K., Imai T., Yoshi O., Bonecchi R., Mantovani A. (1998): Cutting Edge: Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* 161:1083-1086
- ⁸⁹ Sallusto F., Schaerli P., Loetscher P., Schaniel C., Lenig D., Mackay C. M., Qin S., Lanzavecchia A., (1998): Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 28:2760-2769
- ⁹⁰ Yanagihara S., Komura E., Nagafune J., Watari H., Yamaguchi Y. (1998): EB11/CCR7 is a new member of dendritic cell chemokine receptor that is up-regulated upon maturation. *J. Immunol.* 161:3096-3102
- ⁹¹ Xu L., Warren K., Rose W. L., Gong W., Wang J. M. (1996): Human recombinant monocyte chemotactic protein and other c-c chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 60:365-371
- ⁹² Liuzzi F.J., Tedeschi B. (1991): Peripheral nerve regeneration. *Neurosurg. Clin. N. Am.* 2(1):31-42
- ⁹³ Assouline J.G., Pantazis N.J. (1989): Localization of nerve growth factor on fetal human schwann cells in culture. *Exp. Cell Res.* 182(2): 499-512
- ⁹⁴ Xu H., Krämer M., Spengler H.P., Peters J.H. (1995): Dendritic cells differentiated from human monocytes through a combination of IL-4, GM-CSF and IFN- γ exhibit phenotype and function of blood dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 378:75-58
- ⁹⁵ Chapuis F., Rosenzweig M., Yagello M., Ekman M., Biberfeld P., Gluckmann J.C. (1997): Differentiation of human dendritic cells from monocytes in vitro. *Eur. J. Immunol.* 27(2): 431-441

-
- ⁹⁶ Steinbach F., Krause B., Thiele B. (1995): Monocyte derived dendritic cells (MODC) present phenotype and functional activities of langerhans cells/dendritic cells. *Adv. Exp. Med. Biol.* 378:151-153
- ⁹⁷ Randolph GJ., Beaulieu S., Lebecque S., Steinmann RM., Muller WA. (1998): Differentiation of Monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282:480-483
- ⁹⁸ Steckel F., Degwert J., Hoppe U. (1995): Phenotype and alloactivating capacity of dendritic cells generated under different culture conditions from human peripheral blood. *Adv. Exp. Med. Biol.* 378: 355-357
- ⁹⁹ McLellan A., Starling GC., Williams LA., Hock B., Hart DNJ. (1995): Activation of human peripheral blood dendritic cells induces the CD86 costimulatory molecule. *Eur. J. Immunol.* 25:2064-2068
- ¹⁰⁰ Zhou LJ., Tedder F. (1996): CD14+ blood monocytes can differentiate into functionally mature CD83+ dendritic cells. *Proc Natl. Acad. Sci. USA* 93:2588-2592
- ¹⁰¹ Weissman D., Li Y., Ananworanich J., Zhou LJ., Adelsberger J., Tedder TF., Baseler M., Fauci AS.(1995): Three populations of cells with dendritic morphology exist in peripheral blood, only one which is infectable with human immunodeficiency virus type 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92:826-830
- ¹⁰² Pezzati P., Stanisz AM., Marshall JS., Bienenstock J., Stead RH. (1992): Expression of nerve growth factor receptor immunoreactivity on follicular dendritic cells from human mucosa associated lymphoid tissues. *Immunology* 76(3):485-490
- ¹⁰³ Labouryie E., Parrens M., de Mascarel A., Bloch B., Merlio JP. (1997): Distribution of NGF receptors in normal and pathologic human lymphoid tissues. *J. Neuroimmunol.* 77(2):161-173
- ¹⁰⁴ Palko ME., Coppola V., Tessarola L. (1999): Evidence for a role of truncated trkC receptor isoforms in mouse development. *J. Neurosci.* 19:775-782
- ¹⁰⁵ Chang YC., Hsu TL., Lin HH., Chio CC., Chiu AW., Chen NJ., Lin CH., Hsieh SL. (2004): Modulation of macrophage differentiation and activation by decoy receptor 3. *J. Leukoc. Biol.* 75(3): 486-494
- ¹⁰⁶ Aloe L., Simone MD., Properzi F. (1999): Nerve growth factor: a neurotrophine with activity on cells of the immune system. *Microsc. Res. Tech.* 45 (4-5): 285-291
- ¹⁰⁷ Bischoff SC., Dahinden CA. (1992): Effect of nerve growth factor on the release of inflammatory mediators by mature human basophils. *Blood* 79(10): 2662-2669
- ¹⁰⁸ Matsuda H., Coughlin MD., Bienenstock J., Denburg JA. (1988): Nerve growth factor promotes human hemopoietic colony growth and differentiation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85(17):6508-6512

-
- ¹⁰⁹ Kannan Y., Ushio H., Koyama H., Okada M., Oikawa M., Yoshihara T., Kaneko M., Matsuda H. (1991): 2.5S nerve growth factor enhances survival, phagozytosis, and superoxide production of murine neutrophils. *Blood* 77(6). 1320-1325
- ¹¹⁰ Granucci F., Ferrero E., Foti M., Aggujaro D., Vettoretto K., Ricciardi-Castagnoli P. (1999): Early events in dendritic cell maturation induced by LPS. *Microbes Infect.* 1:1079-1084
- ¹¹¹ Power CA., Church DJ., Meyer A., Alouani S., Proudfoot AE., Clark-Lewis I., Sozzani S., Mantovani A., Wells TN. (1997): Cloning and characterization of a specific receptor for the novel CC chemokine MIP-3 α from lung dendritic cells. *J- Exp. Med.* 186:825-835
- ¹¹² Sallusto F., Lanzavecchia A. (2000): Understanding dendritic cell and T-lymphocyte traffic through the analysis of chemokine receptor expression. *Immunol. Rev.* 177:134-140
- ¹¹³ Sozzani S., Sallusto F., Luini W., Zhou D., Piemonti L., Allavena P., van Damme J., Valitutti S., Lanzavecchia A., Mantovani A. (1995): Migration of dendritic cells in response to formyl peptides, C5a, and a distinct set of chemokines. *J. Immunol.* 55:97-179
- ¹¹⁴ Dieu MC., Vanbervliet B., Vicari A., Bridon JM., Oldham E., Ait-Yahia S., Briere F., Zlotnik A., Lebecque S., Caux C. (1998): Selective recruitment of immature and mature dendritic cells by distinct chemokines expressed in different anatomic sites. *J. Exp.Med* 188(2): 373-386
- ¹¹⁵ Xu LL., Warren MK., Rose WL., Gong W., Wang JM. (1996): Human recombinant monocyte chemotactic protein and other C-C chemokines bind and induce directional migration of dendritic cells in vitro. *J. Leukoc. Biol.* 60:365-371
- ¹¹⁶ Bleul CC., Farzan M., Choe H., Parolin C., Clark-Lewis I., Sodroski J., Springer T.A. (1996): The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV entry. *Nature* 382:829-833

8. Abstract

Dendritic cells represent the link between specific and non-specific, or innate, immunity. They may thus be the most important cells in the human immune system. Their functional profile changes as they mature. They develop from strongly phagocytic non-specific immune cells to become special antigen presenting and T-lymphocyte stimulating cells, which enables them to set off a specific immune response.

By isolating these cells and sensitising them in vitro to a specific antigen, they could, in the near future, become an important element in the treatment of a broad range of pathologies by setting off a specific immune response against the relevant antigen once they have been reintroduced into the body.

This research tested the possible effects of Nerve Growth (Neurotrophic) Factor on the phagocytosis and migration behaviour of dendritic cells and/or changes in their surface properties.

First, the dendritic cells were characterised by means of their surface antigens. Then the change in phagocytosis and gene expression for chemokine receptors over the course of their development was represented in accordance with the literature.

In order to determine whether an effect of the Neurotrophic Factor on the dendritic cells could be expected, the researchers first proceeded to prove the presence of mRNA for the pertinent TRK receptors on dendritic cells by means of RT-PCR. This was most successfully proven for the TRK-A receptor, so that the most important experiments were only conducted with NGF, which also enhanced the effect of other phagocytic cells.

A distinct improvement in mature dendritic cell phagocytosis could be demonstrated under NGF incubation, even if this effect could not definitely be statistically supported by means of variance analysis.

NGF also modified the chemokine receptor gene expression: The increase of CCR7 in the immature dendritic cells was of special interest in this context, as it could trigger a change in the migration pattern. If as a result immature dendritic cells would be able to reach the secondary lymph organs, this would be a good approach to dendritic cell therapy modulation.

Another aspect is the NGF mediated CD14 surface marker expression modification. This marker undergoes a distinct decline in the dendritic cells' maturation process, and it is this decline that is apparently impeded by the NGF, which could result in a slowdown in maturation.

This delayed maturation is juxtaposed to the multiplication of gene expression for the chemokine receptors, which control the migration of the immature dendritic cells towards the secondary lymph organs. This would be a sign of accelerated maturation.

The combination of these effects could perhaps also lead to an assumption of an overall improved effect of dendritic cells due to incubation with NGF, thus combining the effects of mature and immature dendritic cells.

Whether or not this would truly bring about an improvement in the functioning of dendritic cells would require authoritative demonstration by means of research into further dendritic cell functions such as for example their actual migration pattern or changes in the stimulation of T and B cells.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Privat-Dozent Dr. med. Andreas Käbisch für die Überlassung des Themas, die Unterstützung bei der Durchführung der Arbeit, die wissenschaftliche Beratung und die freundschaftliche Betreuung.

Herrn Prof. Pralle, dem Leiter der Abteilung Hämatologie und Onkologie danke ich für die gründliche Durchsicht der Arbeit.

Frau Ulrike Seay und Frau Regina Maus danke ich für die hilfsbereite Unterstützung bei der Ausführung der Laborversuche.

Ganz besonders möchte ich mich auch bei meiner Mitdotorandin Isabell Beppler für die konstruktive Zusammenarbeit sowie die stete Motivation und Unterstützung bedanken.

Danken möchte ich auch ganz besonders meinem Mann und meinen Eltern, ohne deren Unterstützung und Zuversicht die Fertigstellung der Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Christ, geb. Hamp
Vorname: Ingrid, Stefanie
Geburtsdatum/-ort: 29.04.1975, Hof
Anschrift: Untere Wart 27
95028 Hof
Familienstand: verheiratet

Schulbildung:

09/1981-07/1985 Grundschule/ Krötenbrucker Schule Hof
09/1985-05/1994 Gymnasium/ Johann-Christian-Reinhart-Gymnasium Hof
01.06.1994 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulausbildung:

10/1994-05/2001 Justus-Liebig-Universität Giessen, Studiengang Medizin
10.09.1996 Ärztliche Vorprüfung
18.09.1997 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
10.04.2000 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
08.05.2001 Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

AIP:

01.06.01- 30.11.02 An der Frauenklinik des Klinikums Hof

Eheschließung mit Michael Christ am 27.07.2002

Assistenzärztin:

Seit 30.11.02 An der Frauenklinik des Klinikums Hof
25.10.2006 Facharztprüfung

Ich erkläre, ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig, ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten 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.

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
ST AU FEN BER GRING 15
D - 3 5 3 9 6 G I E S S E N

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

ISBN 3-8359-5206-4



9 783835 195206 >